



## Središnja medicinska knjižnica

**Lazić Mosler, Elvira (2012) *Uloga receptora Fas u sazrijevanju osteoblasta sinovijaskoga podrijetla i artritisu potaknutom antigenom u miša [The role of the Fas/Fas ligand system in synovia-derived osteoblasts and murine model of antigen induced arthritis].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1611>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Elvira Lazić Mosler**

**Uloga receptora Fas u sazrijevanju  
osteoblasta sinovijskoga podrijetla i  
artritisu potaknutom antigenom u  
miša**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2012.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Elvira Lazić Mosler**

**Uloga receptora Fas u sazrijevanju  
osteoblasta sinovijskoga podrijetla i  
artritisu potaknutom antigenom u  
miša**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2012.

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

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima znanstvenoistraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske 108-1080229-0140 (voditelj: prof. dr. sc. Ana Marušić), 108-1080229-0142 (voditelj prof. dr. sc. Danka Grčević) i 108-1080229-0341 (voditelj: prof. dr. sc. Vedran Katavić).

Voditelj rada: doc. dr. sc. Nataša Kovačić

Zahvaljujem doc. dr. sc. Nataši Kovačić na poučavanju, usmjeravanju, pomoći, savjetima, ohrabrenju i strpljenju pri izradi i pisanju ovoga rada. Osobito zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Marušić na mogućnosti izrade ovoga rada, povjerenju, ohrabrenju i savjetima. Zahvaljujem (abecedno) prof. dr. sc. Danki Grčević i prof. dr. sc. Vedranu Kataviću na velikoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovoga rada. Veliko hvala suradnicama (abecedno) Sanji Ivčević, bacc. med. lab. dg. i Katerini Zrinski-Petrović, med. lab. teh. na pomoći pri izvođenju pokusa, strpljenju pri poučavanju radu u laboratoriju i trajnoj podršci, te kolegama (abecedno): dr. sc. Hrvoju Cviji, ing. mol. biol., Marini Ikić, dr. med., dr. sc. Tomislavu Kelavi, dr. med., i Saniji Kuzmac, ing. mol. biol. na pomoći pri izvođenju pokusa. Na kraju, zahvaljujem Domagoju na trajnoj i neupitnoj podršci, pomoći i strpljenju.

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	i
1. UVOD .....	1
1.1. Reumatoidni artritis.....	1
1.1.1. Sinovijalna ovojnica.....	2
1.1.2. Sinovijalna upala.....	2
1.1.3. Lokalni i sustavni gubitak kosti uzrokovan upalom.....	4
1.2. Koštano tkivo .....	7
1.2.1. Osteoblasti.....	7
1.2.2. Osteoklasti.....	9
1.2.3. Koštana međustanična tvar.....	10
1.2.4. Regulacija koštane pregradnje.....	11
1.3. Sustav Fas/ligand Fas.....	14
1.3.1. Receptor Fas i ligand Fas.....	14
1.3.2. Mišji modeli nedostatnosti sustava Fas/ligand Fas.....	18
1.3.3. Bolesti izazvane poremećajima sustava Fas/ligand Fas.....	19
1.3.4. Uloga sustava Fas/ligand Fas u nadzoru koštane homeostaze.....	19
1.3.5. Uloga sustava Fas/ligand Fas u artritisu.....	21
1.4. Životinjski modeli reumatoidnog artritisa.....	23
1.4.1. Artritis potaknut antigenom.....	23
2. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	25
3. HIPOTEZE.....	26
4. POSTUPCI ISTRAŽIVANJA.....	27
4.1. Pokusne životinje.....	27
4.2. Ustroj pokusa.....	27
4.3. Kultura stanica.....	29
4.3.1. Kultura osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži.....	29
4.3.2. Kultura osteoblasta iz sinovijalnih mezenhimnih stanica.....	30
4.4. Kolorimetrijsko određivanje enzima AP u staničnom lizatu.....	30
4.5. Određivanje izražaja receptora Fas na osteoblastima.....	31
4.5.1. Određivanje izražaja receptora Fas protočnom citometrijom.....	31
4.5.2. Određivanje izražaja receptora Fas na osteoblastima postupkom imunofluorescencije.....	31
4.6. Izazivanje apoptoze dodavanjem aktivirajućeg protutijela za receptor Fas.....	32
4.7. Određivanje udjela apoptotičnih stanica.....	33
4.7.1. Određivanje udjela apoptotičnih stanica vezanjem aneksina V.....	33
4.7.2. Morfološko određivanje udjela apoptotičnih jezgara obojenih fluorescentnom bojom DAPI.....	34
4.7.3. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaze-3 u staničnom lizatu.....	35
4.8. Analiza genskog izražaja.....	35
4.9. Artritis potaknut antigenom.....	38
4.9.1. Imunizacija B6 i Fas $-/-$ miševa s mBSA.....	38
4.9.2. Indukcija artritisa u B6 i Fas $-/-$ miševa.....	38
4.9.3. Kliničko i histološko praćenje artritisa.....	39
4.9.4. Mikro-kompjuterizirana tomografija.....	40
4.10. Analiza rezultata i statistički postupci.....	41
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	42
5.1. Diferencijacija osteoblasta iz primarnih mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica <i>in vitro</i> .....	42
5.2. Izražaj receptora Fas na mišjim osteoblastima podrijetla sinovijalnih	

mezenhimnih stanica <i>in vitro</i> .....	44
5.3. Poticanje apoptoze mišjih osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica aktivacijom receptora Fas.....	46
5.4. Učinak aktivacije receptora Fas na diferencijaciju osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica <i>in vitro</i> .....	49
5.5. Učinak nedostatnosti receptora Fas na klinički tijek i histološki nalaz oštećenja zgloba tijekom artritisa potaknutog antigenom.....	51
5.6. Učinak nedostatnosti receptora Fas na jukstaartikularni gubitak kosti u artritisu potaknutom antigenom.....	52
5.7. Učinak zglobne upale na diferencijaciju osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica i stanica koštane srži u miševa B6 i Fas $-/-$ .....	58
6. RASPRAVA.....	63
6.1. Uloga sustava Fas/ligand Fas u osteoblasta sinovijalnoga podrijetla.....	63
6.1.1. Sinovijalne mezenhimne stanice diferenciraju u zrele osteoblaste.....	63
6.1.2. Receptor Fas je slabo izražen na stanicama osteoblastne loze podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica.....	65
6.1.3. Aktivacija receptora Fas izaziva apoptozu maloga broja osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica <i>in vitro</i> .....	67
6.1.4. Aktivacija receptora Fas izaziva inhibiciju osteoblastogeneze sinovijalnih mezenhimnih stanica <i>in vitro</i> .....	70
6.2. Uloga sustava Fas/ligand Fas u mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom.....	72
6.2.1. Nedostatnost receptora Fas ublažava klinički tijek i histološki nalaz oštećenja zgloba tijekom artritisa potaknutog antigenom.....	72
6.2.2. Nedostatnost receptora Fas štiti od jukstaartikularnoga gubitka kosti u artritisu potaknutom antigenom.....	74
6.2.3. Zglobna upala u subakutnoj fazi artritisa u mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom potiče <i>in vitro</i> osteoblastogenezu iz sinovijalnih mezenhimnih stanica i stanica koštane srži.....	76
7. ZAKLJUČCI.....	78
8. SAŽETAK.....	80
9. SUMMARY.....	82
10. LITERATURA.....	84
11. ŽIVOTOPIS.....	ii

## POPIS KRATICA

Ac-DEVD-pNA	acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid
AIA	artritis potaknut antigenom (prema engl. <i>antigen induced arthritis</i> )
AICD	stanična smrt uvjetovana pobudom (prema engl. <i>activation-induced cell death</i> )
anti-CCP	protutijela usmjerena protiv cikličkih citruliranih proteina
AP	alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i> )
AP-1 (c-jun)	aktivirajuća bjelančevina 1, Jun onkogen (prema engl. <i>activating protein-1</i> )
ALPS	autoimuni limfoproliferativni sindrom (prema engl. <i>autoimmune lymphoproliferative syndrome</i> )
ATF4	aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (prema engl. <i>activating transcription factor 4</i> )
bFGF	bazični čimbenik rasta fibroblasta (prema engl. <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMPs	koštane oblikotvorne bjelančevine (prema engl. <i>bone morphogenetic proteins</i> )
BMU	temeljna višestanična jedinica (prema engl. <i>basic multicellular unit</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumin</i> )
BSP	koštana sijalobjelančevina (prema engl. <i>bone sialoprotein</i> )
BV/TV	koštani volumen (prema engl. <i>bone volume/total volume</i> )
B6	C57BL/6 miševi
cad	kadherin (prema engl. <i>cadherin</i> )
CRD	domena bogata cisteinom (prema engl. <i>cysteine rich domain</i> )
CFA	kompletni Freundov adjuvans (prema engl. <i>complete Freund's adjuvant</i> )
c-FLIP	bjelančevina c-FLIP (prema engl. <i>cellular FADD-like interleukin-1<math>\beta</math>-converting enzyme inhibitory protein</i> )
CFU-F	kolonije fibroblastnih značajki (prema engl. <i>colony forming unit-fibroblast</i> )
CIA	artritis potaknut kolagenom (prema engl. <i>collagen induced arthritis</i> )
Ct	prag broja ciklusa (prema engl. <i>cycle threshold</i> )
CII	kolagen tipa II
DAF	čimbenik koji ubrzava raspad (prema engl. <i>decay accelerating factor</i> )
DAPI	4',6'-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid
DD	smrtonosna domena (prema engl. <i>death domain</i> )
DED	izvršna smrtonosna domena (prema engl. <i>death effector domain</i> )
DcR3	lažni receptor (prema engl. <i>decoy receptor 3</i> )
DISC	smrtonosni signalni sklop (prema engl. <i>death-inducing signaling complex</i> )
DMP-1	bjelančevina dentinske međustanične tvari 1 (prema engl. <i>dentin matrix protein 1</i> )
DR	smrtonosni receptor (prema engl. <i>death receptor</i> )
EDTA	etilen diamin tetraoctena kiselina (prema engl. <i>etilen-diamine tetraacetic acid</i> )
ELISA	imunoenzimski postupak (prema engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FADD	smrtonosna domena pridružena receptoru Fas (prema engl. <i>Fas-associated death domain</i> )
Fas -/-	miševi s izbačenim genom za Fas
FasL -/-	miševi s izbačenim genom za ligand Fas
FBS	fetalni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (prema engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
FITC	fluorescein-izotijocijanat (prema engl. <i>fluoresceinisothiocyanate</i> )
gld	opći limfoproliferativni poremećaj (prema engl. <i>generalised lymphoproliferative disorder</i> )
GVHD	reakcija presatka protiv primaoca (prema engl. <i>graft versus host disease</i> )
IFN	interferon
IGF	čimbenik rasta sličan inzulinu (prema engl. <i>insulin-like growth factor</i> )
IL	interleukin
IQR	interkvartilni raspon (prema engl. <i>interquartile range</i> )
JIA	juvenilni idiopatski artritis
L2	drugi lumbalni kralježak
lpr	limfoproliferacija
HSPs	bjelančevine toplinskog šoka (prema engl. <i>heat shock proteins</i> )
MB	metilensko modriilo (prema engl. <i>methylene blue</i> )
mBSA	metilirani goveđi serumski albumin (prema engl. <i>methylated bovine serum albumin</i> )
Mad	gen Mad (prema engl. <i>mother against decapentaplegic</i> )
M-CSF	čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. <i>macrophage-colony stimulating factor</i> )
MEPE	fosfoglikoprotein izvanstanične tvari (prema engl. <i>matrix extracellular phosphoglycoprotein</i> )

MHCII	glavni sklop tkivne podudarnosti skupine II (prema engl. <i>major histocompatibility complex class II</i> )
MIP-1 $\alpha$	makrofagna upalna bjelančevina (prema engl. <i>macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i> )
MMPs	metaloproteinaze međustanične tvari (prema engl. <i>matrix metalloproteinases</i> )
NFAT	jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T (prema engl. <i>nuclear factor of activated T cells</i> )
NK	prirodnoubilačka stanica (prema engl. <i>natural killer</i> )
OC	osteokalcin
OCIF	čimbenik inhibicije osteoklastogeneze (prema engl. <i>osteoclastogenesis inhibitory factor</i> )
ODAR	osteoklastni receptor za diferencijaciju i aktivaciju (prema engl. <i>osteoclast differentiation and activation receptor</i> )
ODF	čimbenik diferencijacije osteoklasta (prema engl. <i>osteoclast differentiation factor</i> )
OPG	osteoprotegerin
Osx	osteriks (prema engl. <i>osterix</i> )
PBMCs	mononuklearne stanice periferne krvi (prema engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PHEX	regulirajući gen za fosfate homologan endopeptidazama na kromosomu X (prema engl. <i>phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome</i> )
pI	izoelektrična točka
PI	propidijev jodid (prema engl. <i>propidium iodide</i> )
PIA	artritis potaknut pristanom (prema engl. <i>pristane induced arthritis</i> )
pNA	p-nitroanilin
PTH	paratiroidni hormon
pNPP	p-nitrofenilni fosfat (prema engl. <i>p-nitrophenylphosphate</i> )
qRT-PCR	kvantitativno umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom (prema engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
RA	reumatoidni artritis
RANK	receptor za pobudu jezgrinog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> )
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand</i> )
Runx2	transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom "runt" 2 (prema engl. <i>runt-related transcription factor 2</i> )
SIBLING	vrsta bjelančevinske obitelji (prema engl. <i>small integrin-binding ligand, N-glycosated protein</i> )
SD	standardna devijacija
Tb.N	broj koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular number</i> )
Tb.Th	širina koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular thickness</i> )
Tb.Sp	razdvojenost koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular separation</i> )
TGF	transformirajući čimbenik rasta (prema engl. <i>transforming growth factor</i> )
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TNFR	TNF receptor
TNFRSF	obitelj receptora TNF (prema engl. <i>TNF receptor superfamily</i> )
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. <i>tartrate resistant acid phosphatase</i> )
TRAF	čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF (prema engl. <i>TNF-receptor associated factor</i> )
VCAM	adhezijska molekula stanica žilnoga endotela (prema engl. <i>vascular cell adhesion molecule</i> )
VEGF	čimbenik rasta žilnoga endotela (prema engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
Wnt	hibridna kratica od Wg (prema engl. <i>wingless in Drosophila</i> ) i Int (prema engl. <i>integration 1</i> )
1,25(OH) $_2$ D $_3$	vitamin D3



# 1. UVOD

## 1.1 Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis (RA) je kronična sustavna autoimuna bolest nepoznate etiologije čija je glavna posljedica razaranje zglobne hrskavice i subhondralne kosti sinovijalnih zglobova, što dovodi do gubitka njihove strukture i funkcije. Osim zglobova, bolest zahvaća i druge organe i organske sustave, primjerice pluća, srce i oči (1). Najčešći oblik bolesti je simetrični periferni poliartritis malih zglobova šaka i stopala. Incidencija RA najveća je u dobi između 30 i 55 godina, a dva do tri puta češće se pojavljuje u žena (1). Prevalencija RA u odrasloj populaciji je 0.5% do 1%, što ga čini jednim od najznačajnijih svjetskih uzroka koštano-mišićne invalidnosti (2), a time i ekonomskim opterećenjem zdravstvenog sustava i društva (3). Obiteljske studije RA upućuju na genetsku predispoziciju za bolest. Poznata je povezanost s HLA-DR1 i HLA-DR4 (4-6), kao i s genima izvan HLA sustava, od kojih je među najznačajnijima gen za CD40 (7, 8)

Patogeneza RA ima tri stadija: nastanak i razvoj autoimunog odgovora, kronična upala i razaranje kosti (9). Smatra se da u genetski predisponiranih pojedinaca djelovanjem različitih okolišnih čimbenika (npr. pušenje, mikroorganizmi) dolazi do razvoja autoimunog odgovora u obliku stvaranja protutijela [(reumatoidni faktor (RF), protutijela usmjerena protiv cikličkih citruliniranih peptida (anti-CCP)], i to ponekad i godinama prije kliničkih znakova bolesti. Mehanizmi prijelaza u kliničku fazu bolesti još uvijek nisu jasno definirani, ali pretpostavlja se da bi okidači mogli biti mehanički stres, ozljeda ili infekcija (10). Također je nejasno razvija li se autoimuna reakcija na egzogene antigene ili na promijenjene autoantigene kao što su kolagen, imunoglobulini i bjelančevine toplinskog šoka (HSPs, prema engl. *heat shock proteins*) (10). U kliničkoj fazi bolesti, najvažnije obilježje RA je upala sinovijalne zglobne ovojnice, koja dovodi do njezina zadebljanja. Zadebljana sinovija se može transformirati u panus, tkivo slično tumorskom, koji izravno invadira i razara zglobnu hrskavicu i subhondralnu kost (11). Uz razaranje subhondralne kosti, sustavna upala u RA dovodi i do sustavnog gubitka kosti te se, uz druge oblike artritisa (spondiloartritis i osteoartritis) i postmenopauzalni gubitak estrogena, RA smatra vodećim uzrokom osteoporoze (12).

### 1.1.1 Sinovijalna ovojnica

Sinovijalna je ovojnica sloj vezivnoga tkiva koji oblaže unutrašnjost zglobne šupljine i izlučuje sinovijalnu tekućinu koja smanjuje trenje između zglobnih ploha i hrani zglobnu hrskavicu (13). Sinovijalna ovojnica se sastoji od dva sloja (13). Površinski, avaskularni oblažući sloj ili intima, je izgrađen od 1-3 reda stanica bez bazalne membrane, a dubinski sloj ili subintimu tvori rahlo vezivno tkivo s fibroblastima, makrofazima, krvnim i limfnim žilama te živcima. U oba sloja se mogu naći dvije vrste sinovijalnih stanica. Stanice tipa A su sinovijalni makrofagi mijelo-monocitnog podrijetla koji izražavaju različite makrofagne biljege, primjerice CD68, receptor Fc $\gamma$ , CD14, CD45, te glavni kompleks tkivne podudarnosti skupine II (MHCII, prema engl. *major histocompatibility complex class II*) (14). Stanice tipa B su sinovijalni fibroblasti, zglobne stromalne stanice mezenhimnog podrijetla koje specifično izražavaju adhezijsku molekulu stanica žilnog endotela 1 (VCAM-1, prema engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) i čimbenik koji ubrzava raspad (DAF, prema engl. *decay accelerating factor*) (15). Također je pokazano da sinovijalni fibroblasti specifično izražavaju kadherin (cad, prema engl. *cadherin*)-11 te da je on nužan za razvoj i organizaciju sinovije (16-19).

Sinovijalni fibroblasti proizvode kolagen tipa I, III, IV i V, te druge sastavnice vezivnog tkiva koje podupiru zglob, poput fibronektina, laminina, hondroitina i heparan-sulfata (15). Sinovijalni fibroblasti odlažu međustanični matriks oblažućeg sloja i izlučuju glavne komponente sinovijalne tekućine, hijaluronan i lubricin, koji su zaslužni za njena viskozna svojstva (13). Sinovijalna tekućina je dijalizat plazme koji se stvara difuzijom kroz intimu i subintimu sinovijalne ovojnice, te je u fiziološkim uvjetima acelularna (15).

### 1.1.2 Sinovijalna upala

Temeljna makroskopska značajka sinovijalne upale u RA je zadebljanje sinovijalne ovojnice. Sinovijalna hiperplazija je rezultat lokalne proliferacije sinovijalne intime te infiltracije upalnim stanicama (15), pri čemu su najvažniji makrofagi, za koje se smatra da čine čak 80% sinovijalnog infiltrata, osobito na mjestima vezanja sinovije za zglobnu hrskavicu. Hiperplazijom sinovijalnih fibroblasta sinovijalna se ovojnica može transformirati u panus (11).

Uz hiperplaziju, važne odrednice RA su transformacija te posljedično promijenjena funkcija sinovijalnih fibroblasta. Zna se da sinovijalni fibroblasti u RA imaju aktivnu ulogu u razvoju same bolesti (20) stvarajući upalne medijatore i citokine, kao što su čimbenik rasta žilnog endotela (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*), IL-15, interferon (IFN)- $\beta$ , interleukin (IL)-8, kemokinski CXC ligand (CXCL) 2, CC-ligand (CCL) 8, CCL5, CXCL10 (21-23), kao i enzime koji razaraju okolna tkiva, osobito katepsin i metaloproteinaze međustanične tvari (MMPs, prema engl. *matrix metalloproteinases*) (24-26). Važno je istaknuti da se sinovijalni fibroblasti aktivirani upalom u RA razlikuju od normalnih sinovijalnih fibroblasta, te izražavaju mnoge osobine transformiranih staničnih linija, kao što su povećan izražaj staničnih adhezijskih molekula, proliferacija, otpornost na apoptozu, izražaj onkogeni i stvaranje citokina (20). Za nastanak ovakvog staničnog fenotipa vjerojatno su odgovorni citokini i čimbenici rasta, od koji su najvažniji čimbenik rasta fibroblasta (FGF, prema engl. *fibroblast growth factor*), IL-17, IL-18, čimbenik tumorske nekroze (TNF, prema engl. *tumor necrosis factor*) i IL-1 (20) te hipoksija upalom zahvaćenog zgloba koja potiče stvaranje pro-angiogenetskih i pro-upalnih čimbenika (VEGF i CXCL12) (27).

Osim toga, zna se da cad-11, osim u organizaciji i razvoju normalne i zdrave sinovije, ima značajnu ulogu i u patogenezi artritisa, koju ostvaruje poticanjem aktiviranih sinovijalnih fibroblasta na stvaranje IL-6 (17). U mišjem modelu reumatoidnog artritisa pokazano je da miševi s nedostatnosti gena za cad-11 imaju značajno manje oštećenje zglobne hrskavice (19), te da je farmakološko blokiranje cad-11 značajno smanjuje zglobnu upalu (19). S obzirom da je cad-11 specifično izražen na sinovijalnim fibroblastima, ova istraživanja ukazuju da su upravo sinovijalni fibroblasti stanice koje imaju središnju ulogu u patogenezi RA.

Upalna zbivanja u sinovijalnoj subintimi karakteriziraju infiltrati limfocita T, okruženi limfocitima B, prirodno ubilačkim stanicama (stanice NK; prema engl. *natural killer*), dendritičkim stanicama i mastocitima (28-31). Neutrofile su uglavnom prisutni u sinovijalnoj tekućini, iako se mogu naći i na spoju sinovijalne ovojnice i hrskavice (32).

Zadebljana sinovija ima povećane potrebe za kisikom i hranjivim tvarima, zbog čega dolazi do stvaranja novih krvnih žila. Lokalna hipoksija zgloba zahvaćenog upalom snažno stimulira angiogenezu potičući makrofage, sinovijalne fibroblaste i neutrofile na izražavanje pro-angiogenetskih i pro-upalnih čimbenika (FGF, VEGF, CXCL12) (27, 33-35).

### 1.1.3 Lokalni i sustavni gubitak kosti uzrokovan upalom

Uz kroničnu upalu sinovijalne ovojnice, najvažnije obilježje RA je gubitak kosti. Štoviše, tijekom RA se javlja nekoliko oblika oštećenja kosti: 1) nastanak lokalnih koštanih erozija, 2) periartikularni gubitak kosti, i 3) generalizirana osteopenija (36). Lokalne koštane erozije su najistaknutiji oblik gubitka kosti potaknutog upalom. Te lezije zahvaćaju subhondralnu kost u prostoru između zglobne hrskavice, mjesta pripajanja sinovijalne ovojnice na periost, i podležeće kosti.

Lokalne koštane erozije su klinički važne zato što: 1) je njihov radiološki nalaz jedan od klasifikacijskih kriterija za postavljanje dijagnoze RA (37), 2) su jedan su od ključnih parametara za praćenje učinkovitosti antireumatskih lijekova u prevenciji, usporavanju ili zaustavljanju gubitka kosti (38), i 3) je njihova prisutnost povezana sa slabijim funkcionalnim ishodom kod oboljelih od RA (39). Iako u početku bolesti oticanje i bol u zglobovima najviše doprinose smanjenju funkcije zglobova, s trajanjem bolesti ono je sve više povezano s nastankom strukturnih oštećenja. Jačina upalne aktivnosti je najjači pretkazatelj nastanka lokalnih koštanih erozija, ukazujući na povezanost sinovijalne upale i gubitka kosti (40). Koštane erozije karakterizira opsežni lokalni gubitak kosti i mineralizirane hrskavice u neposrednoj blizini upaljene sinovije (36). Gusti stanični upalni infiltrat koji se sastoji od fibroblasta, makrofaga, limfocita i krvnih žila, a koji čini tkivo panusa, je glavni poticatelj nastanka lokalnih koštanih erozija. Histološka analiza mjesta dodira panusa i kosti pokazuje brojne multinuklearne stanice koje se nakupljaju u koštanim erozijama. Te stanice pokazuju osobine funkcionalnih osteoklasta – izražavaju kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*), katepsin K i kalcitoninski receptor (41, 42). Dvije su značajne osobine zglobne upale u RA koje pomažu diferencijaciju osteoklasta; jedna je povećan izražaj citokina kao što su TNF, IL-1 i ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa B$  ligand*), koji potiču stvaranje osteoklasta, a druga je nakupljanje monocitno-makrofagnih prethodničkih stanica osteoklasta u upalnoj sinoviji, koje na svojoj membrani izražavaju receptor za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa B$* ). Vezanjem RANKL-a te stanice diferenciraju u zrele osteoklaste (42-45). Funkcionalna uloga osteoklasta u nastanku lokalnih koštanih erozija je dokazana u mišjim eksperimentalnim modelima artritisa, u kojih nedostatak ili farmakološka blokada osteoklasta dovodi do izostanka nastanka lokalnih koštanih erozija čak i u potpuno razvijenoj zglobnoj upali (46-48). Štoviše, blokatori TNF-a su pokazali snažan učinak u sprječavanju gubitka kosti koji

nadmašuje sam protuupalni učinak te je tako dokazana kostimulatorna uloga TNF-a u osteoklastogenezi (43, 49).

S druge strane, puno se manje zna o ulozi smanjenog stvaranja kosti u nastanku lokalnih koštanih erozija. Ipak, kako se zna se da TNF inhibira diferencijaciju i metaboličku aktivnost osteoblasta (50, 51), možemo pretpostaviti da citokini koje stvara upalna sinovija suprimiraju stvaranje kosti.

Nadalje, dio sinovijalnih fibroblasta ima značajke mezenhimnih matičnih stanica i mogu diferencirati u osteoblaste, hondroblaste, adipocite i mioblaste (52). Budući da je cilj terapije RA ne samo smanjiti upalne promjene i resorpciju kosti već i potaknuti procese cijeljnjia hrskavice i subhondralne kosti, sve se više istražuje uloga mezenhimnih matičnih stanica u liječenju upalnih i degenerativnih zglobnih bolesti, zbog njihovih imunomodulacijskih svojstava i zbog mogućnosti poticanja regeneracije zglobnih tkiva njihovim sazrijevanjem *in situ* u osteoblaste i hondroblaste (11). Zreli osteoblasti također imaju imunomodulacijska svojstva, te poticanje njihova sazrijevanja u zahvaćenim zglobovima može djelovati istodobno i regenerativno i protuupalno (53). U fiziološkim uvjetima svega 1% sinovijalnih fibroblasta potječe iz koštane srži, a tijekom zglobne upale taj se udio povećeva na 30% (54). Nadalje, upalni citokini, poput IL-1 $\beta$  i TNF, aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B, inhibirajući time diferencijaciju, a potičući proliferaciju sinovijalnih fibroblasta, te tako doprinose stvaranju panusa i razaranju zgloba (50, 54).

Jukstaartikularna osteopenija je drugi oblik gubitka kosti i rani radiološki znak RA, a tipično zahvaća trabekularnu kost u metafizama uz zglob zahvaćen upalom. Mehanizam nastanka jukstaartikularne osteopenije nije u potpunosti razjašnjen, no blizina zgloba zahvaćenog upalom ukazuje da sinovijalna upala izvan kortikalne površine kosti izravno ili neizravno utječe na poticanje razgradnje trabekularne kosti u blizini zgloba. Histološka analiza uzoraka kosti dobivenih od pacijenata tijekom operacijske zamjene zgloba pokazuje pojačanu pregradnju trabekularne kosti (55, 56), a postoje i histomorfometrijski dokazi za smanjenje volumena i razrjeđenje trabekularne kosti (55, 56). Serijski histološki rezovi također pokazuju da erozija lokalne kosti može rezultirati potpunom penetracijom kortikalne barijere te izlaganju koštane srži sinovijalnom tkivu (56). Tada se na tom mjestu stvaraju limfocitni agregati koje uglavnom tvore limfociti B koji izražavaju koštane oblikotvorne bjelančevine (BMPs, prema engl. *bone morphogenetic proteins*) i povezani su s nakupljanjem osteoblasta i stvaranjem kosti na priležećem endostu, što se može protumačiti kao kompenzatorni pokušaj zatvaranja kortikalne kosti (57).

Treći oblik osteopenije u RA je sustavni gubitak kosti. Smatra se da jedna trećina oboljelih od RA pati od osteoporozе, a 10% ih doživi jedan ili više prijeloma kralježaka (58). Također, longitudinalne studije su pokazale da sustavni gubitak kosti počinje već u ranim fazama bolesti (59). Pored sekundarne osteoporozе kao posljedice dugotrajne terapije kortikosteroidima i slabije pokretljivosti oboljelih osoba, postoji snažna povezanost između sustavnog gubitka kosti i same upalne aktivnosti u RA. Štoviše, težina bolesti određena jačinom upalne aktivnosti bolesti je nezavisni rizični čimbenik za ubrzani gubitak kosti i povećani rizik od prijeloma (59-61).

Osteoporozа se razvija zbog pomicanja ravnoteže između stvaranja i razgradnje kosti na stranu razgradnje i to povećanjem aktivnosti i broja osteoklasta ili smanjenjem aktivnosti i broja osteoblasta (62). Prethodnici osteoblasta i osteoklasta smješteni su u koštanoj srži zajedno sa stanicama hematopoetskog i imunskog sustava koje mogu putem različitih membranskih i topljivih čimbenika regulirati njihov broj i aktivnost, odnosno koštanu pregradnju (63).

Sustavni gubitak kosti u RA je rezultat poremećaja koštane pregradnje uzrokovanoga sustavno prisutnim pro-upalnim citokinima. Međutim, nije razjašnjeno dominira li poremećajem ravnoteže koštane pregradnje pojačana koštana resorpcija ili smanjeno stvaranje kosti. Dok histomorfometrijske analize kostiju oboljelih od RA, kao i analiza koštane pregradnje djece oboljele od juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA) govore u prilog smanjenog stvaranja kosti kao primarnog procesa, druge studije ukazuju na dominaciju sustavno pojačane koštane resorpcije (59, 60).

## 1.2 Koštano tkivo

Koštano tkivo je vrsta vezivnoga tkiva, koje služi kao potporanj tijelu, omogućuje djelovanje mišića, štiti organe i koštanu srž, te održava ravnotežu tjelesnog kalcija i fosfata. Koštano tkivo je građeno od koštane međustanične tvari u koju su uklopljene koštane stanice – osteociti, osteoblasti, tj. stanice koje stvaraju međustaničnu tvar, i osteoklasti, tj. stanice koje razgrađuju međustaničnu tvar.

Kostur se počinje stvarati između drugog i trećeg mjeseca unutar materničnoga života, a konačno se oblikuje u odrasloj dobi. Kost se stvara ili iz hrskavične osnove kosti koja se postupno resorbira i zamjenjuje koštanim tkivom, što nazivamo enhondralnim okoštavanjem, ili se razvija izravno iz mezenhimne osnove, intramembranskim okoštavanjem. Kost odraslog sisavca se mijenja tijekom cijelog života, pri čemu se ranije stvorena kost neprestano uklanja, te se nadomješta novostvorenim koštanim tkivom. Tako usklađen proces preoblikovanja se naziva koštanom pregradnjom, a reguliran je lokalnim i sustavnim biokemijskim, kao i biomehaničkim čimbenicima.

### 1.2.1 Osteoblasti

Osteoblasti su stanice čija je glavna uloga odlaganje koštane međustanične tvari, a imaju važnu ulogu i u podupiranju i regulaciji hematopoeze (64), a izražavanjem RANKL-a i osteoprotegerina (OPG) reguliraju aktivnost i sazrijevanje osteoklasta (65, 66). Morfološki gledano, osteoblasti su kockaste stanice okrugle jezgre, rahlog kromatina, s izraženom hrapavom endoplazmatskom mrežicom i Golgijevim tijelom.

Osteoblasti se razvijaju iz mezenhimnih matičnih stanica koje potječu iz koštane srži ali nalaze se i u drugim tkivima poput sinovijalne ovojnice, pokosnice, mišića i masnog tkiva (67). Mezenhimne matične stanice stvaraju kolonije fibroblastnih značajki (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*), a imaju sposobnost sazrijevanja u koštane, hrskavične i masne stanice, fibroblaste te potporne stanice hematopoeze (68). Ljudske mezenhimne matične stanice izražavaju biljeg Stro-1 (69, 70), dok mišje stanice ne izražavaju spomenuti biljeg, nego su opisane kombinacijom membranskih biljega CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, TER-119<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup> (71). Razvoj osteoblasta iz mezenhimnih matičnih stanica je pod nadzorom transkripcijskog čimbenika povezanog s bjelančevinom “runt” 2 (Runx2, prema engl. *runt-related transcription factor 2*), osteriksa (Osx, prema engl. *osterix*) i

aktivirajućeg transkripcijskog čimbenika 4 (ATF4, prema engl. *activating transcription factor 4*) (72).

Runx2 je ključni čimbenik koji nadzire izražaj većine gena uključenih u stvaranje koštane međustanične tvari te je nužan za embrionalni razvoj kostura (73). Razvoj osteoblasta iz mezenhimnih matičnih stanica nadzire i kanonički Wnt/ $\beta$ -kateninski (hibridna kratica od Wg, prema engl. *wingless in Drosophila* i Int, prema engl. *integration 1*) signalni put pojačavajući izražaj Runx2, a smanjujući izražaj adipogenih transkripcijskih čimbenika, te transkripcijski čimbenici kodirani Dlx genima, posebice Dlx3 i Dlx5 (74).

Većina čimbenika koji su uključeni u usmjeravanje mezenhimnih matičnih stanica prema osteoblastnoj lozi djeluju mijenjajući izražaj opisanih transkripcijskih čimbenika. Primjerice, paratiroidni hormon, estrogeni, glukokortikoidi i vitamin D nadziru izražaj Runx2, Osx i bjelančevina  $\beta$ -kateninskog puta (74). Od lokalnih čimbenika su posebno važni BMP-2, -4, -6, -7, nužne za usmjeravanje mezenhimnih matičnih stanica prema osteoblastima i stvaranje kostura, čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF, prema engl. *insulin-like growth factor*) I i IGF II, FGF I i FGF II, te transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) (75).

U tijeku sazrijevanja osteoblasta *in vitro* iz prethodničkih stanica koštane srži mogu se razlučiti tri stadija: 1) stadij umnažanja stromalnih stanica koštane srži, 2) stadij sazrijevanja osteoblasta praćen početkom stvaranja bjelančevina međustanične tvari, i 3) stadij ovapnjenja tijekom kojega se u izlučenu međustaničnu tvar ulažu mineralne soli i nastaju vidljivi ovapnjeli otočići (76).

Već se rano u stadiju sazrijevanja počinje stvarati kolagen tipa I, koji je glavni proizvod osteoblasta i najzastupljenija je bjelančevina u koštanoj međustaničnoj tvari. Potom se počinju izlučivati koštana sijalobjelančevina (BSP, prema engl. *bone sialoprotein*; BSP II) i alkalna fosfataza (AP, prema engl. *alkaline phosphatase*). Izražaj AP se smanjuje tijekom stadija sazrijevanja i početkom stadija ovapnjenja, a izražaj BSP se smanjuje u stadiju sazrijevanja, pa se ponovo pojačava u stadiju ovapnjenja. Sljedeći, no manje specifičan biljeg osteoblasta jer ga izražavaju i druga tkiva (77, 78), je osteopontin ili koštana sijalobjelančevina I (BSP I, prema engl. *bone sialoprotein I*), koji je izražen već u prvom stadiju umnažanja stromalnih stanica. Najkasnije u stadiju ovapnjenja se pojavljuje osteokalcin (OC), koji je biljeg zrelih osteoblasta, a također i jedini specifični osteoblastni biljeg (79).

Osteoblasti žive 10-14 dana, a nakon toga ih većina (50-70%) odumire apoptozom, dok manji broj osteoblasta postaju obložne stanice ili osteociti (80).



Obložne stanice su morfološki plosnate stanice koje pokrivaju unutarnju površinu kosti, a smatra se da se aktivacijom mogu ponovo diferencirati u osteoblaste (81). Osteociti su zvjezdaste stanice s mnogo staničnih izdanaka koje nastaju zarobljavanjem osteoblasta u lakune vlastite izlučene koštane međustanične tvari. Osteociti su najdugovječnije i najbrojnije koštane stanice, te čine 90-95% svih koštanih stanica. Nasuprot ranijem mišljenju da su oni pasivne stanice zarobljene u koštanoj međustaničnoj tvari, danas se zna da su osteociti nužni za normalnu funkciju ne samo kosti, već i drugih organa. Osteociti su mehanosenzorne stanice (82-84), mogu preoblikovati okolnu međustaničnu tvar (85), imaju značajnu ulogu u koštanoj pregradnji regulirajući aktivnost osteoblasta (86, 87) i osteoklasta (88), a djeluju i kao endokrine stanice izlučujući topljive čimbenike koji reguliraju rad bubrega (89, 90). Također, osteociti sudjeluju i u regulaciji metabolizma fosfata i kalcija (91).

Kada osteoblast biva usmjeren da postane osteocit, smanjuje se izražaj AP, a povećava se izražaj OC, te se počinju izražavati specifični biljezi poput regulirajućeg gena za fosfate homolognog endopeptidazama na kromosomu X (PHEX, prema engl. *phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*), fosfoglikoprotein izvanstanične tvari (MEPE, prema engl. *matrix extracellular phosphoglycoprotein*), bjelančevine dentinske međustanične tvari 1 (DMP-1, prema engl. *dentin matrix protein 1*), FGF-23, sklerostina te ORP150, za koji se smatra da osteocite štiti od hipoksije (92). Osim toga, osteociti u posebnim uvjetima kao što je vrijeme laktacije mogu izražavati biljege specifične za osteoklaste, primjerice TRAP i katepsin K, što im omogućuje preoblikovanje okolne koštane tvari (93). Starenjem dolazi do hipermineralizacije perilakunarne međustanične tvari i mikropetroze, tj. ispunjavanja lakuna mineraliziranim tkivom i odumiranja osteocita (94).

### 1.2.2 Osteoklasti

Osteoklasti su multinuklearne stanice koje resorbiraju kost, a nastaju citoplazmatskom fuzijom mononuklearnih mijelo-monocitnih prethodnika s jednom jezgrom u zrele osteoklaste koji u citoplazmi mogu sadržavati i stotine jezgara (95). Zreli osteoklasti izražavaju kalcitoninski receptor C1a (96), vitronektinski receptor (CD51, vitronektinski receptor  $\alpha$ ), MMP9 i TRAP (97). Životni vijek osteoklasta je ograničen te oni, nakon što su resorbirali kost, također odumiru apoptozom.

Za usmjerenje hematopoetskih prethodničkih stanica prema monocitno-makrofagnim prethodnicima potreban je transkripcijski čimbenik PU.1 (98), a za preživljenje i diferencijaciju usmjerenih monocitno-makrofagnih prethodnika je ključan čimbenik stvaranja monocitnih kolonija (M-CSF, prema engl. *monocyte-colony stimulating factor*) koji se veže za receptor c-fms izražen na njihovoj površini (99). *In vitro* se osteoklastogeneza može potaknuti vitaminom D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), paratiroidnim hormonom (PTH), deksametazonom, prostaglandinom E<sub>2</sub> i IL-6, no u kulturi je uvijek potrebna prisutnost stromalnih stanica koštane srži, tj. prethodnika osteoblasta (100, 101). Prisutnost osteoblasta je nužna jer je diferencijacija, aktivnost i preživljenje osteoklasta ovisna o RANKL-u, membranskoj molekuli iz obitelji TNF izraženoj na osteoblastima, mezenhimnim matičnim stanicama, sinovijalnim stanicama i aktiviranim limfocitima T (65), koja se veže na RANK izražen na stanicama osteoklastne loze (66). S druge strane, topljivi receptor OPG iz zrelih osteoblasta vezanjem za RANKL priječi sazrijevanje i aktivaciju osteoklasta, a omjer RANKL/OPG važan je čimbenik u određivanju ukupne koštane mase (102). Mnogi čimbenici koji su povezani s koštanom resorpcijom, poput TNF-a, IL-1, i IL-6, izravno potiču osteoklastogenezu povećavajući izražaj RANKL-a na aktiviranim limfocitima (103). Unutarstanični signal za osteoklastogenezu potaknutu RANKL-om uključuje aktivaciju transkripcijskog čimbenika c-Jun (c-jun, Jun onkogen, AP-1, prema engl. *activator protein-1*) i jezgrinog čimbenika aktiviranih limfocita T (NFAT, prema engl. *nuclear factor of activated T cells*), kao i izražaj transkripcijskog čimbenika c-Fos (104). Sklop NFAT/Fos/Jun ključan je za stvaranje zrelih osteoklasta (105).

### 1.2.3 Koštana međustanična tvar

Koštana međustanična tvar se sastoji od anorganskog i organskog dijela. Anorganski dio većinom tvore mineralne soli kalcijevog hidroksiapatita, čiji su kristali uklopljeni u mrežu kolagenih vlakana. Organski dio uglavnom čine bjelančevine, a glavna bjelančevina je kolagen tipa I, kojega izlučuju osteoblasti. Ova bjelančevina je sastavljena od tri polipeptidna lanca (dva lanca  $\alpha 1$  i jednoga lanca  $\alpha 2$ ) omotanih na način da čine trostruku uzvojniju. Kolagen tipa I izlučuje se iz stanice u obliku pro-peptida, od kojega potom enzimi proteaze odcjepljuju N- i C- terminalni dio, nakon čega se pojedinačne zrele kolagenske molekule međusobno udružuju i stvaraju kolagena vlakna (106).

Ostale koštane bjelančevine ne prelaze više od 10% udjela u bjelančevinama kosti. Radi se o: 1) proteoglikanima: biglikan, dekorin, fibromodulin, hijaluronan, osteoglicin, 2) glikoproteinima: AP i osteonektin, 3) SIBLING-bjelančevinama (prema engl. *small integrin binding ligand, N-glycosylated protein*): osteopontin, DMP-1, BSP, te 4) bjelančevinama gla ( $\gamma$ -karboksilirane bjelančevine): OC. Glavna funkcija ovih bjelančevina je regulacija umrežavanja kolagenih vlakana i kristala kalcijeva hidroksiapatita I (107), a pomažu i povezivanju koštanih stanica s međustaničnom tvari (108). OC je regulator ovapnjenja koštane međustanične tvari, a specifično je izražen u zrelim osteoblastima (79).

#### 1.2.4 Regulacija koštane pregradnje

Koštana pregradnja se odvija unutar ograničenog područja koje se naziva temeljna višestanična jedinica (BMU, prema engl. *basic multicellular unit*) (109).

Na početku ciklusa preoblikovanja, obložne stanice, koje prekrivaju površinu metabolički neaktivne kosti, se odvajaju od same koštane površine te od osteocita s kojima su inače u dodiru. Ispod svoda kojeg oblikuju obložne stanice, osteoklasti najprije razgrađuju kost, a za njima slijede osteoblasti koji stvaraju neovapnjelu koštanu međustaničnu tvar, osteoid, koji postupno ovapnjuje (81). Ova zbivanja su u fiziološkim uvjetima u ravnoteži, a temelj su koštane prilagodbe zahtjevima dinamičkih i statičkih opterećenja te održavanja tjelesne homeostaze kalcija.

Poremećaj u ravnoteži koštane pregradnje može biti potaknut različitim patogenim čimbenicima (110). To može rezultirati gubitkom kosti, uzrokovanim pojačanom aktivnosti odnosno većim brojem osteoklasta te slabijom aktivnosti odnosno nedostatkom osteoblasta, ili povećanom gustoćom kosti u slučaju prevladavanja broja i aktivnosti osteoblasta nad osteoklastima.

Resorpcija i stvaranje kosti su funkcijski, anatomski i vremenski usklađeni procesi, a na njihovu ravnotežu utječu različiti već spomenuti lokalni i sustavni čimbenici.

Lokalni čimbenici djeluju na ograničenom području na diferencijaciju, djelovanje i životni vijek koštanih stanica, a izlučuju ih ili same koštane stanice ili stanice koštane srži ili periferne krvi. Važni lokalni čimbenici nadzora nad koštanom pregradnjom su bjelančevine iz obitelji TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ , BMP-2, -4, i -7 (111, 112). Bjelančevine iz ove obitelji su uklopljene u koštanu međustaničnu tvar i tijekom resorpcije kosti se oslobađaju u okoliš koji je pogodan za njihovu aktivaciju. Aktivirani ligandi iz TGF- $\beta$  obitelji se potom vežu na specifične

receptore serin/treonin kinaze, a putem signalnih bjelančevina SMAD [homolog gena Mad u sisavaca (prema engl. *mother against decapentaplegic*) iz roda *Drosophila* i srodnog gena Sma u *Caenorhabditis elegans*], stanični signal se prenosi na osteoblastne transkripcijske čimbenike koji potiču izražaj specifičnih gena (113).

S obzirom na funkcionalnu i anatomsku povezanost kosti i koštane srži, i stanice koštane srži imaju važnu ulogu u regulaciji koštane pregradnje koju ostvaruju izlučujući bilo topljive citokine ili izravnim dodiranjem s koštanim stanicama. Među citokinima, najvažniji su već opisani RANK, RANKL, OPG, TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 (114).

Sustav RANK/RANKL/OPG je krajnji regulator osteoklastogeneze, jer svi ostali lokalni čimbenici ostvaruju svoje djelovanje putem bjelančevina ovog sustava.

I sustavni čimbenici, kao što su PTH, glukokortikoidni hormoni, vitamin K i 1,25(OH) $_2$ D $_3$  djeluju na koštanu pregradnju putem ovog sustava (115-117).

RANKL (ili ODF, prema engl. *osteoclast differentiation factor*) je transmembranska bjelančevina iz TNF obitelji liganada i ključan je regulator osteoklastogeneze, no regulira i imunski odgovor tako što smanjuje apoptozu i potiče lučenje citokina iz dendritičnih stanica (118, 119). Izražavaju ga osteoblasti, mezenhimne matične stanice, sinovijalne stanice i aktivirani limfociti T (65), a veže se na RANK izražen na stanicama osteoklastne loze (66). Postoji i topljivi RANKL koji nastaje djelovanjem MMP, a on djeluje uglavnom na limfocite T (120).

RANK je receptor iz obitelji TNF receptora, (ili ODAR, prema engl. *osteoclast differentiation and activation receptor*), a izražavaju ga stanice monocitno-makrofagne loze, ali i fibroblasti, limfociti T i B i dendritične stanice (121, 122). Vezanjem RANKL-a na RANK dolazi do aktivacije čimbenika povezanog s receptorima obitelji TNF (TRAF, prema engl. *TNF associated factor*), a potom i niza transkripcijskih čimbenika kao što su NF- $\kappa$ B, c-jun, NFAT, i c-fos (104).

OPG (ili OCIF, prema engl. *osteoclastogenesis inhibitory factor*) stvaraju osteoblasti i izlučuju ga u okolinu kao topljivu molekulu, koja dimerizacijom postiže potpunu aktivnost (123). OPG se veže za RANKL, priječi njegovo vezanje za RANK i tako sprječava osteoklastogenezu. Zato je ravnoteža između RANKL-a i OPG-a glavni regulacijski čimbenik koštane pregradnje. OPG može i izravno djelovati na osteoklaste i tada smanjuje njihovu sposobnost da razgrađuju kost (124).

Osim citokina, i kemokini reguliraju koštanu pregradnju. Tako npr. kemokin CCL3 ili upalni čimbenik makrofaga 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ), kojeg izlučuju mijelomske stanice, potiče osteoklastogenezu i uzrokuje koštanu resorpciju tijekom

mijelomske bolesti (125). Također, CCL3, CCL5 i CCL7, koje izražavaju osteoblasti kada su potaknuti TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha$ , vezanjem na receptor CCR1 na prethodničkim stanicama osteoklasta potiču sazrijevanje i pokretljivost osteoklasta (126). S druge strane, vezanjem CXCL12 i CXCL13 na receptore CXCR4 i CXCR5 na osteoblastima potiče se proliferacija osteoblasta i odlaganje kolagenih vlakana (127).

### 1.3 Sustav Fas/ligand Fas

Receptor Fas pripada podskupini smrtonosnih receptora TNF obitelji, koja broji 29 članova (128), a ligand Fas, kao i drugi ligandi smrtonosnih receptora, je član TNF obitelji liganada (129, 130). Smrtonosni receptori su posrednici vanjskoga apoptičnoga puta (131). U razvoju RA sudjeluju brojni članovi te obitelji (132-134), a za njegovu patogenezu su osobito su važni TNF receptori (TNFR) 1 i 2 na koje se veže TNF. To je potvrđeno uspješnom terapijskom primjenom specifičnog anti-TNF monoklonskog protutijela (infliksimab) ili imunoglobulina koji blokira TNF receptor (TNFR) 2 (etanercept), čija primjena dovodi do poboljšanja kliničkih (bol, oticanje i ukočenost zglobova), laboratorijskih (eritrocitne sedimentacije i C reaktivnog proteina) i radioloških nalaza bolesnika s RA (135).

S obzirom na već dobro opisanu značajnu ulogu sustava Fas/ligand Fas u međudjelovanju koštanog i imunog sustava, sve su brojnija i istraživanja uloge ovoga sustava u patogenezu RA.

#### 1.3.1 Receptor Fas i ligand Fas

Receptor Fas [CD95, APO-1, član 6 TNF obitelji receptora, (TNFRSF6)] je transmembranska bjelančevina tipa I molekulske mase 48 kDa koju izgrađuje 319 aminokiselina, čija aktivacija odgovarajućim ligandom potiče slijed događaja vanjskog apoptičnog puta (128).

Receptor Fas izražavaju brojne zdrave i maligno promijenjene stanice, poput limfocita T i B, dendritičkih stanica, timocita, makrofaga, kardiomiocita, hepatocita, te stanica bubrega, gušterače i mozga (136-139). U svojem izvanstaničnom dijelu molekula Fas ima tri domene bogate cisteinom (CRD, prema engl. *cysteine-rich domain*) (140), što je zajedničko svim receptorima iz obitelji TNF (141). Unutar stanice nalazi se smrtonosna domena (DD, prema engl. *death domain*), neizostavna za biološku ulogu receptora Fas (142), koja kroz povezivanje sa smrtonosnom domenom pridruženom receptoru Fas (FADD, prema engl. *Fas-associated death domain*) prenosi početni apoptični signal (129).

Receptor Fas specifično aktivira vezanje liganda Fas (CD 178, CD95L, APO1L, ligand člana 6 TNF superobitelji 1, TNFSF6), glikozilirane transmembranske bjelančevine tipa II, člana obitelji TNF liganada (129, 130), koja na površini stanice oblikuje trimer (143). Ligand Fas je izražen na stanicama mijeloidne/limfoidne loze, osobito na limfocitima T (uglavnom CD8<sup>+</sup>) i

NK stanicama. Osim toga, izražavaju ga stanice tkiva imunosno odijeljenih mjesta, kao što je rožnica, sjemenik i trofoblast (144, 145), te nekih tumorskih tkiva (146).

Postoji i topljivi oblik liganda Fas, koji nastaje različitim izrezivanjem RNA ili proteolitičkim odcjepljivanjem enzimima metaloproteinazama (147). Biološka aktivnost topljivog oblika je višestruko manja od membranskog. Prema nekim istraživanjima topljivi oblik liganda Fas je antagonist membranskog oblika jer može stanicu štititi od apoptoze posredovane sustavom Fas/ligand Fas vežući se za vezna mjesta na receptoru Fas bez poticanja apoptoze, a istovremeno onemogućavajući vezanje aktivnog membranskog oblika (148). Nadalje, njegovo vezanje može dovesti do aktivacije NF- $\kappa$ B te potaknuti proliferaciju stanice i njeno preživljenje (149).

I membranski i topljivi oblici liganda Fas spontano stvaraju trimere, koji su nužni za pokretanje apoptoze (150). Osim toga, slično nekim drugim članovima obitelji TNF, ligand Fas može djelovati i kao receptor (148, 151). Unutarstanični dio molekule liganda Fas sadrži domenu bogatu prolinom koja može vezati signalnu tirozinsku kinazu, te tako regulirati staničnu aktivnost limfocita T i drugih stanica koje izražavaju ligand Fas. Na primjer, ligand Fas izražen na CD8<sup>+</sup> limfocitima T mogao bi kostimulatorno utjecati na njihovo sazrijevanje u timusu (152). Iako mu je receptor Fas glavni receptor, ligand Fas se može vezati i na lažni receptor DcR3 (prema engl. *decoy receptor 3*), topljivu bjelančevinu bez transmembranskog dijela, također člana superobitelji TNF receptora, koja ima ulogu u regulaciji sustava Fas/ligand Fas (153).

Prvi korak u aktivaciji signalnog puta Fas/ligand Fas je trimerizacija receptora Fas, koja se odvija neovisno o ligandu (154, 155) u područjima lipidnih splavi stanične membrane (prema engl. *lipid rafts*) (156, 157). Receptor Fas se može na staničnoj površini naći i u obliku monomera, ali kao takav ne potiče apoptotični signalni put (158, 159).

Vezanjem liganda Fas na receptor dolazi do oligomerizacije trimernih sklopova liganda i receptora Fas (160), a približavanjem unutarstaničnih dijelova receptora Fas započinje prijenos apoptotičnog signala. Na smrtonosnu unutarstaničnu domenu molekule Fas može se vezati FADD (131). FADD ima drugu domenu, izvršnu smrtonosnu domenu (DED, prema engl. *death effector domain*), pomoću koje veže pro-kaspazu-8 ili pro-kaspazu-10 (136), čime dolazi do stvaranja molekulskog sklopa koji se naziva smrtonosnim signalnim sklopom (DISC; prema engl. *death-inducing signaling complex*) (161, 162), a tvore ga ligand, receptor, smrtonosna domena i pro-kaspaze. Stvaranje DISC-a rezultira autoproteolitičkom aktivacijom kaspaze-8, te stvaranja njezina aktivnog heterotetramera koji oslobođen u citosolu aktivira izvršnu kaspazu-3. Aktivacijom izvršnih kaspaza, stanica počinje apoptotički umirati.

Daljnji slijed unutarstaničnih događaja osnova je podjeli stanica na dva tipa, ovisno o uključivanju mitohondrijskog, tj. unutrašnjeg apoptotskog signalnog puta (163). U stanicama tipa I, kao što su limfociti, aktivacija kaspaze-8 ili kaspaze-10 u DISC-u dovodi do brze pobude izvršnih kaspaza i stanične smrti (156). S druge strane, stanice tipa II, kao što su npr. hepatociti, nisu osjetljive na ligand Fas (156), posljedično stvaraju vrlo malo aktivne kaspaze-8 u DISC-u, te apoptotski signal treba biti pojačan putem unutrašnjeg mitohondrijskog signalnog puta (164). Kaspaza-8 u tom slučaju aktivira pro-apoptotski čimbenik Bid koji se potom premiješta u mitohondrij i ondje izaziva otpuštanje mitohondrijskih čimbenika koji će pojačati apoptotični signal (165, 166).

Sposobnost posredovanja stanične smrti sustava Fas/ligand Fas najbolje je istražena i prvo opisana u imunom sustavu, koji je upravo mjesto gdje su ove molekule otkrivene. Kasnije je otkriveno da su obje molekule rasprostranjene na različitim stanicama te da su uključene u brojna fiziološka i patološka zbivanja, npr. u imunom odjeljivanje (167), izbjegavanje tumora imunom obrani (168), upali (169), obnovi tkivnih stanica (170), stvaranju imunotolerancije (171) i hematopoezi (172).

Utvrđeno je da sustav Fas/ligand Fas ima ključnu ulogu u homeostazi imunom sustava te posebice u nadzoru nad odgovorom limfocita na antigene (173). S jedne strane, ligand Fas je uključen u stvaranje središnje tolerancije (174-177), a s druge strane, također zauzima važno mjesto u razvoju periferne tolerancije. Naime, limfociti T nakon pobude na svojoj površini izražavaju molekule ligand Fas i Fas, ali ih se u prvo vrijeme ne može usmrtiti aktivacijom receptora Fas. No ponavljanim podraživanjem antigenom razvija se osjetljivost na apoptozu posredovanu ligandom Fas. Takav fenomen uklanjanja pobuđenih limfocita, koji sprječava njihovo nakupljanje i moguća neželjena djelovanja, nazivamo staničnom smrću uvjetovanom pobudom (AICD; prema engl. *activation-induced cell death*) (178-181). Pri tome ne bivaju usmrćene samo susjedne stanice nego i same stanice koje izražavaju ligand Fas.

Uz ovaj mehanizam gdje pobuđene stanice usmrćuju same sebe, limfociti T CD4<sup>+</sup> mogu pomoću liganda Fas potisnuti razvoj limfocita CD8<sup>+</sup> (182). Osim toga, sustav Fas/ligand Fas posreduje i homeostazi drugih stanica imunom sustava, poput dendritičkih stanica, NK stanica, makrofaga, neutrofila, a osobito limfocita B (171, 183-187). Upravo je osjetljivost limfocita B na apoptozu posredovanu ligandom Fas važna u nadzoru humoralne imunosti, a pri njezinu poremećaju dolazi do razvoja autoimunih i limfoproliferacijskih bolesti (187). Ligand Fas važan je nositelj izvršne uloge citotoksičnih limfocita T, te je posrednik citotoksičnog razaranja tkiva u stanjima poput reakcije presatka protiv primaoca (GVHD, engl. *graft-versus-host disease*) (188) i pokusnih autoimunih bolesti (189, 190). Nadalje,



ligand Fas je uključen i u nastanak imunodne odjeljenosti. Tkiva koja se ne mogu obnavljati mogu ograničiti imunodni odgovor stvaranjem fizičkih zapreka, ograničenjem limfne drenaže te stvaranjem imunosupresivnih molekula (167), kao što je ligand Fas, koji može usmrtiti limfnu stanicu koja se pojavi u tkivu. Stoga stanice rožnice, sjemenika, jajnika i posteljice obilato izražavaju ligand Fas (145, 191-193). Limfociti T se također služe ligandom Fas kako bi usmrtili pobuđene makrofage (194) i dendritičke stanice (195). Međutim, osjetljivost dendritičnih stanica na apoptozu potaknutu ligandom Fas se mijenja ovisno o njihovoj zrelosti, tako da vezanjem na nezrele dendritične stanice ligand Fas čak potiče njihovo sazrijevanje i stvaranje upalnih citokina (196). Također, sustav Fas/ligand Fas sudjeluje i u nadzoru mijelopojeze i eritropoeze (172, 197).

Iako vezivanje liganda Fas za receptor Fas u većini slučajeva dovodi do pobude kaspaza i posljedične stanične smrti, takav ishod nije nužan. Aktivacija kaspaza ne samo što ne mora dovesti do apoptoze, nego može potaknuti staničnu aktivnost pa čak i proliferaciju (198-200). Ovisno o ravnoteži između prokaspaze 8 i c-FLIP bjelančevine (prema engl. *cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein*) homologne kaspazi 8 koja može vezanjem na smrtonosnu domenu spriječiti apoptozu, pobuđivanje receptora Fas može voditi u kaspazama posredovanu staničnu smrt ili poticati NF- $\kappa$ B signalni put i time staničnu aktivaciju (201). Neki od navedenih neapoptotičnih učinaka Fas/ligand Fas sustava su primjerice poticanje NK stanica na stvaranje upalnih kemokina (202), poticanje proliferacije i aktivacija dendritičkih stanica (196). Nadalje, ligand Fas potiče preživljenje ljudskih krvotvornih predhodničkih CD34<sup>+</sup> stanica (203) i povećava njihovu sposobnost stvaranja kolonija (204). Budući da je ligand Fas uključen u obradu i izlučivanje IL-1 $\beta$  (205), IL-6 (206) te IL-8 (207), možemo ga smatrati i proupalnim posrednikom.

Osim u homeostazi imunodnog/hematopoetskog sustava, ligand Fas i Fas su važni i za homeostazu jetara jer posreduju uklanjanje ostarjelih hepatocita (183). U mišjem oku ligand Fas izravno sprječava prekomjerno urastanje krvnih žila u mrežnicu (208). Endotelne stanice krvnih žila tijekom upale izražavaju ligand Fas koji izaziva apoptozu leukocita. Ograničavanjem broja leukocita se ograničava i broj čimbenika koji potiču angiogenezu, a koje izlučuju leukociti pa možemo reci da ligand Fas posredno ima i protuangiogenično djelovanje (209). Naposljetku, ligand Fas i receptor Fas su uključeni i u homeostazu živčanog sustava. Dok su motorički neuroni podložni apoptozu izazvanoj ligandom Fas, aktivacija receptora Fas potiče regeneraciju osjetnih neurona (210).

### 1.3.2 Mišji modeli nedostatnosti sustava Fas/ligand Fas

U istraživanjima biološkog značaja receptora i liganda Fas posebno su doprinijela dva mišja soja sa spontanom autosomno-recesivnim mutacijama u genima za receptor Fas i ligand Fas. Miševi homozigoti za točkastu mutaciju gena na kromosomu 1 koji kodira ligand Fas (211) razvijaju generalizirani limfoproliferativni poremećaj (212), zbog kojeg su nazvani *gld* miševima (prema engl. *generalized lymphoproliferative disorder*). S druge strane, spontana mutacija kodirajuće regije gena za Fas na kromosomu 19 (213), koja je prvo opisana u MRL mišjem soju (214), rezultira sličnim limfoproliferativnim sindromom, a ti se miševi nazivaju *lpr* (prema engl. *lymphoproliferation*).

Oba poremećaja su praćena splenomegalijom i limfadenopatijom, stvaranjem autoreaktivnih protutijela i imunokompleksa te nakupljanjem limfocita T imunofenotipa B220<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (dvostruko negativni limfociti T) u perifernim limfnim tkivima i perifernoj krvi (215). Dvostruko negativni limfociti T su posljedica nedostatnosti receptora ili liganda Fas, ali nemaju značenje u patogenezi bolesti (216). Životni vijek ovih miševa je skraćen, često zbog razvoja limfoma podrijetlom iz limfocita B (217), što zajedno s povećanim stvaranjem autoreaktivnih protutijela u miševa *gld* i *lpr* dokazuje važnost sustava Fas/ligand Fas i u nadzoru nad homeostazom limfocita B (218).

Upravo zbog sličnosti ova dva opisana fenotipa, vrlo rano je utvrđeno da opisani geni kodiraju proteine koji su u međusobnom odnosu kao receptor i ligand (219).

Iako opisane točkaste mutacije dovode do poremećaja u funkciji receptora i liganda Fas, male količine intaktne mRNA za Fas koje su pronađene u timusu *lpr* miševa (220), kao i nalaz da *gld* miševi stvaraju normalan ligand Fas kod kojeg naknadno dolazi do strukturnih promjena u regiji koja se veže na receptor Fas (221), upućivali su na nepotpunu penetraciju ovih mutacija, te posljedičnu rezidualnu aktivnost odgovarajućih gena. Stoga su za detaljnije razjašnjavanje uloge sustava Fas/ligand Fas razvijeni miševi s izbačenim genima za Fas (Fas <sup>-/-</sup>) (222) i ligand Fas (FasL <sup>-/-</sup>) (223).

Osim toga, pokazano je i da *lpr* miševi razvijeni iz različitih sojeva imaju različite manifestacije genske mutacije za Fas. Tako primjerice MRL-*lpr* miševi, za razliku od B6-*lpr* miševa, spontano razvijaju blagi oblik artritisa koji se može pojačati intradermalnim injiciranjem kompletnog Freundovog adjuvansa (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) (224).

### 1.3.3 Bolesti izazvane poremećajima u sustavu Fas/ligand Fas

Sustav Fas/ligand Fas na različite načine sudjeluje u patogenezi bolesti kao što su reakcija presatka protiv primaoca (GVHD, prema engl. *graft versus host disease*) nakon presađivanja organa, toksična epidermoliza, multipla skleroza i neki oblici hepatitisa (225).

U ljudi su također opisane rijetke spontane mutacije različitih lokusa u genu za Fas, zajedničkim imenom nazvane autoimunim limfoproliferativnim sindromom (ALPS, prema engl. *autoimmune lymphoproliferative syndrome*) (226), koje karakterizira nakupljanje dvostruko negativnih limfocita T i poliklonska hipergamaglobulinemija, a glavna klinička manifestacija bolesti su autoimune citopenije (128).

Sustav Fas/ligand Fas sudjeluje i u razvoju drugih autoimunih bolesti poput autoimunog tireoiditisa, sistemskog eritematoidnog lupusa i reumatoidnog artritisa (227). Štoviše, brojne studije ukazuju i na njegovu ulogu u regulaciji koštanog metabolizma, implicirajući ulogu poremećaja sustava Fas/ligand Fas u patogenezi postmenopauzalne osteoporoze (228) te gubitka kosti u RA (227).

### 1.3.4 Uloga sustava Fas/ligand Fas u nadzoru koštane homeostaze

Pored stanica imunskog sustava na kojima je prvotno opisan, receptor Fas je izražen i na drugim tkivima, uključujući i koštane stanice (229-232).

Pokazano je da i ljudski i mišji osteoblasti izražavaju i receptor Fas i ligand Fas (229, 232). Osteoklasti također izražavaju receptor Fas (230, 231), no različita dosadašnja istraživanja i potvrđuju (233) i osporavaju (234) izražaj liganda Fas na osteoklastima. Također, aktivacija receptora Fas pomoću liganda Fas ili agonističkih protutijela dovodi do apoptoze i jedne i druge vrste koštanih stanica, što je pokazano nizom *in vitro* studija (231, 235-240).

Dosadašnje studije o funkciji receptora Fas izraženoga na osteoblastima dale su različite rezultate, što se može objasniti time što njegov izražaj i funkcija na osteoblastima ovisi o brojnim citokinima i čimbenicima rasta, primjerice IGF I,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i interferon (IFN)- $\gamma$ , koji mijenjaju osjetljivost osteoblasta na apoptozu potaknutu ligandom Fas (235, 236, 239, 241, 242). Tako je pokazano i da aktivacija receptora Fas potiče apoptozu nezrelih i zrelih mišjih osteoblasta podrijetlom iz koštane srži, no ne svih stanica koje izražavaju Fas. Međutim, dodavanje liganda Fas u kulturu osteoblasta smanjuje broj osteoblastnih kolonija, što se zbog izostanka smanjenja ukupnog broja kolonija ne može

pripisati apoptozi (243). Stoga djelomična otpornost na apoptozu i specifično smanjenje broja osteoblastnih kolonija upućuje na moguću neapoptotičku ulogu receptora Fas u regulaciji osteoblastne diferencijacije i sazrijevanja (243).

Izražaj i funkciju receptora Fas na osteoklastima regulira RANKL i to u dvije faze: najprije povećavajući izražaj receptora Fas na prethodničkim stanicama osteoklasta i tako negativno regulirajući njihov broj, a kasnije u zrelim osteoklastima smanjujući izražaj receptora Fas i doprinoseći njihovom dužem preživljenju (231). Osim toga, izražaj receptora Fas na osteoklastima je reguliran s još nekoliko citokina, primjerice zna se da TNF potiče osteoklastogenezu i povećava izražaj receptora Fas na adherentnim stanicama koštane srži *in vitro* (238). S druge strane, prisutnost IL-12 i IL-18 može umanjiti učinak TNF-a na poticanje osteoklastogeneze poticanjem izražaja liganda Fas na neadherentnim stanicama koštane srži (238, 244).

Pokazano je i da estrogen povećava izražaj liganda Fas u zrelim mišjim osteoklastima podrijetlom iz koštane srži te tako potiče njihovu apoptozu i može prevenirati gubitak kosti (233). Također, zna se da estrogen potiče i izražaj liganda Fas na osteoblastima, kao i da su osteoblasti potrebni za apoptozu osteoklastnih prethodnika induciranu estradiolom, što dokazuje da je parakrino djelovanje liganda Fas izraženoga na osteoblastima nužno za zaštitni učinak estrogena na kost (234).

Sustav Fas/ligand Fas mogao bi biti uključen i u apoptozu osteoklasta potaknutu bisfosfonatima, te u apoptozu osteoblasta potaknutu glukokortikoidima (245, 246).

U razjašnjavanju uloge molekula Fas i ligand Fas vrlo su značajna *in vivo* istraživanja na miševima *gld* i *lpr*. Pokazano je da miševi *gld* i *lpr* stvaraju ektopičnu kost veće koštane mase nakon intramuskularne injekcije BMP-a (247), te da pojačano stvaraju hrskavicu tijekom enhondralnog okoštavanja potaknutog rekombinantnim ljudskim BMP-2 (248) u usporedbi s miševima divljeg soja.

Uz sindrom općeg limfoproliferativnog poremećaja, u miševa *gld* je opisana i povećana gustoća kosti (249). Dodatno, miševi soja *gld* su bili zaštićeni od gubitka kosti izazvanog ovarijektomijom, a u modelu koštane regeneracije potaknute ablacijom koštane srži su stvarali više nove kosti od miševa divljeg tipa (249). Parabiotičko spajanje miševa *gld* s miševima divljeg tipa je dovelo do miješanja stanica između cirkulacija jednog i drugog soja, uključujući dvostruko negativne limfocite T, a miševi divljeg tipa su preuzeli koštani fenotip *gld* miševa (250).

Miševi s izbačenim genom za Fas (Fas  $-/-$ ) također su bili zaštićeni od gubitka kosti potaknutog ovarijektomijom i to zbog izostanka porasta broja osteoklasta i jačeg poticanja

osteoblastogeneze nego u miševa divljeg tipa (251). Estradiol *in vitro* smanjuje izražaj gena za Fas i tako može spriječiti gubitak kosti (251).

Uloga sustava Fas/ligand Fas u postmenopauzalnoj osteoporozi indukcijom apoptoze osteoblasta je potvrđena i u istraživanju ljudskih postmenopauzalnih osteoblasta, koji također izražavaju Fas (228).

### 1.3.5 Uloga sustava Fas/ligand Fas u artritisu

Sve brojniji dokazi ukazuju da poremećaj funkcije sustava Fas/ligand Fas ima ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa, no rezultati različitih istraživanja za sada su kontradiktorni, te upućuju na njegove i pozitivne i negativne moguće učinke. Sinovijalni fibroblasti i makrofazi te sinovijalni limfociti T podrijetlom iz zglobova zahvaćenih upalom izražavaju visoke razine liganda Fas i receptora Fas, kao i anti-apoptotičke citokine poput transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) i bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF, prema engl. *basic fibroblast growth factor*), te inhibitore Fas signalnog puta (MMP-2, FLIP) (252). Stanice imunskog sustava unutar upalom zahvaćenog zgloba su otporne na apoptozu posredovanu ligandom Fas, što dovodi do njihova nakupljanja i podržava upalu u zglobu koja potiče resorpciju kosti (253). Smanjena osjetljivost na apoptozu posredovanu ligandom Fas doprinosi ekspanziji subpopulacije pobuđenih limfocita T CD4<sup>+</sup> i time do održavanja perifernih autoreaktivnih klonova. S druge strane, izražaj liganda Fas u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMCs, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*) je niži u oboljelih od RA u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima, te korelira s klinički procijenjenom težinom bolesti (254).

Vežanje liganda Fas na receptor Fas, uz ograničeni apoptotički učinak, koči sazrijevanje osteoblasta mehanizmom ovisnim o kaspazi-8 (243). Stoga bi ligand Fas izražen na aktiviranim limfocitima T u upaljenim zglobovima mogao zakočiti diferencijaciju stanica osteoblastne loze i time doprinijeti oštećenju zglobova i osteoporozi u RA (255). Drugi način kojim bi ovaj sustav mogao doprinijeti zglobnom oštećenju je indukcija apoptoze hondrocita (256). S druge strane, indukcija apoptoze autoreaktivnih limfocita može smanjiti upalni zglobni proces (257).

Već je pokazano da su miševi *lpr* otporniji na razvoj artritisa potaknutog kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*), mehanizmom neovisnim o poremećaju imunostne tolerancije uzrokovanim jačom reaktivnosti limfocita T u *lpr* miševa (134). Stoga možemo

pretpostaviti da zbog nedostatnosti receptora Fas izostaje supresija osteoblastne diferencijacije mezenhimnih prethodnika posredovana kaspazom-8 u zahvaćenom zglobu te je zbog toga manje zglobno razaranje i gubitak subhondralne kosti (134).

Slično životinjskim modelima, studije provedene na bolesnicima s RA također pokazuju suprotne rezultate dosadašnjih istraživanja uloge sustava receptor Fas/ligand Fas u patogenezi RA, pri čemu različite studije opisuju kliničko poboljšanje simptoma terapijskim blokiranjem, kao i terapijskim poticanjem toga sustava (252).

Razlozi proturiječnih nalaza dosadašnjih istraživanja se mogu objasniti promatranjem uloge receptora Fas i liganda Fas u različitim stanicama uključenima u nastanak i održavanje zglobne upale, odnosno u razaranje zglobnih struktura i razgradnju kosti, a također i promatranjem artritisa u različitim stadijima bolesti.

Stoga je za bolje razumijevanje uloge sustava Fas/ligand Fas u patogenezi RA nužno točno definirati koja je njegova glavna funkcija u pojedinim staničnim populacijama, te kako je i u kojoj mjeri to djelovanje izraženo u pojedinim stadijima RA.

## 1.4 Životinjski modeli reumatoidnog artritisa

Artritis je kompleksno zbivanje *in vivo* te je njegovo istraživanje nemoguće bez istaživanja patogeneze i mogućnosti liječenja RA u različitim životinjskim modelima. Artritis se može potaknuti živim bakterijama (258, 259), bakterijskim komponentama (260), adjuvansima (261, 262), proteinima specifičnim za hrskavicu (263-265), te ubikvitarnim antigenima (266, 267). Postoje i modeli kod kojih je sam genetski utjecaj dovoljan za razvoj artritisa (268-270), primjerice transgenični miš koji izražava humani TNF, mutacija ZAP-70 gena koja uzrokuje promijenjenu selekciju limfocita T u timusu i autoimuni artritis u miševa (271), spontana mutacija gena Fas u mišjeg soja MRL (MRL-*lpr*) (272). Najčešće korišteni eksperimentalni model RA je CIA, koji se izaziva imunizacijom kolagenom tipa II (CII) u CFA, a s obzirom da je CII izražen u zglobnoj hrskavici, imunoreakcija usmjerena na CII izaziva oštećenje zglobova (263). Iako je ovo najčešće primjenjivani model, njegovo je ograničenje što se može primijeniti samo u mišjih sojeva koji nose kompleks gena tkivne podudarnosti H-2<sup>q</sup> ili H-2<sup>r</sup>, poput DBA/1 (D1). Za razliku od njih, H-2<sup>b</sup> sojevi, poput C57BL/6 (B6), slabo razvijaju ili uopće ne razvijaju CIA (263).

### 1.4.1 Artritis potaknut antigenom

U modelu artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) zglobna upala izaziva se izravnom injekcijom antigena u koljeni zglob životinje prethodno hiperimunizirane goveđim serumskim albuminom (BSA, prema engl. *bovine serum albumine*) u CFA (273). Metilirani (m, prema engl. *methylated*) BSA, je pogodan antigen za ovaj model zbog pozitivnog naboja koji je ključan za zadržavanje antigena u zglobu. Jačina zglobne upale ovisna je o dozi injiciranog antigena, a sam nastup artritisa ima jasno definiran tijek, s najizraženijom akutnom upalom tri dana nakon injekcije antigena (274). To čini ovaj model pogodnim za istraživanje kinetičkih studija mehanizama razaranja hrskavice i kosti, a artritis izazvan u koljenom zglobu olakšava standardizaciju histološke analize zglobne hrskavice i subhondralne kosti u odnosu na male zglobove mišjih stopala u drugim modelima. Ponovnom injekcijom antigena se može izazvati relaps artritisa, čime se oponašaju epizode egzacerbacije i remisije bolesti tipične za bolesnike s RA (274). Kako ovaj model pokazuje nekoliko elemenata važnih u razvoju humanog RA, kao što su odlaganje imunih kompleksa u hrskavici, progresivno razaranje hrskavice i subhondralne kosti, te infiltracija sinovije stanicama

imunskog sustava, AIA se može koristiti za proučavanje svih tih aspekata ljudske bolesti, a pogodan je i zato što se može potaknuti u B6 mišjem soju, iz kojeg su razvijeni i Fas –/– miševi korišteni u ovim istraživanjima (222). S druge strane, zna se da u štakorskom modelu AIA nakon hiperimunizacije dolazi do sustavnog akutnog upalnog odgovora, te da taj model zbog toga ne predstavlja dobar model za proučavanje RA, nakon čega je u štakora razvijen model artritisa induciranog pristanom (PIA, prema engl. *pristane induced arthritis*).



## 2. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je bio utvrditi važnost receptora Fas u apoptozi i diferencijaciji osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, te njegovu ulogu u gubitku kosti potaknutom zglobnom upalom. Ovaj cilj se može raščlaniti na pet specifičnih ciljeva:

- a) Uspostaviti model diferencijacije osteoblasta iz primarnih mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica.
- b) Odrediti izražavaju li osteoblasti podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica receptor Fas tijekom sazrijevanja *in vitro*.
- c) Utvrditi može li aktivacija receptora Fas potaknuti apoptozu ili zakočiti diferencijaciju sinovijalnih mišjih osteoblasta.
- d) Utvrditi lokalni učinak zglobne upale u modelu AIA na diferencijaciju sinovijalnih mezenhimnih stanica u osteoblaste, te učinak upale na diferencijaciju osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži.
- e) Pokazati *in vivo* značaj sustava receptor Fas/ligand Fas u razvoju zglobnog oštećenja uspoređujući klinički i histološki razvoj artritisa potaknutog antigenom te gustoću subhondralne kosti u Fas  $-/-$  miševa i miševa divljeg tipa.

### 3. HIPOTEZE

- Mišje sinovijalne mezenhimne stanice i *in vitro* uzgojeni osteoblasti sinovijalnog podrijetla izražavaju Fas. Aktivacija receptora Fas potiče apoptozu i inhibira osteoblastnu diferencijaciju sinovijalnih mezenhimnih stanica.
- Diferencijacija sinovijalnih mezenhimnih stanica i mezenhimnih stanica koštane srži u osteoblaste je poremećena tijekom AIA.
- Receptor Fas doprinosi poremećenoj diferencijaciji osteoblasta tijekom AIA. Nedostatnost receptora Fas priječi subhondralni i sustavni gubitak kosti u mišjem modelu AIA.

## 4. POSTUPCI ISTRAŽIVANJA

### 4.1 Pokusne životinje

U istraživanju sam koristila ženke visokosrođenog soja B6, te miševe Fas  $-/-$  temeljnoga soja B6 (222). Fas  $-/-$  miševi poklon su laboratorija dr. Markusa M. Simona (Max Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Njemačka). Navedene životinje sam odabrala zbog toga što u *lpr* miševa penetracija spontane mutacije gena za Fas nije potpuna, odnosno pokazano je da u njih postoji rezidualna aktivnost receptora Fas (220).

U pokusima sam koristila ženke dobi 8-10 tjedana, uzgojene u vivariju Hrvatskoga instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su održavane u standardnim uvjetima, uz režim 14 sati svjetla i 10 sati tame dnevno, te standardnu prehranu (4RR25; Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodu *ad libitum*.

U pokusima sam se vodila načelima „3R“ dobre prakse postupanja sa životinjama (prema engl. *replacement, reduction, refinement*) te sam za svoje istraživanje upotrijebila između 100 i 150 miševa. Za pokuse sam dobila dozvolu Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 4.2 Ustroj pokusa

U prvom nizu pokusa sam uspostavila *in vitro* model diferencijacije osteoblasta podrijetlom iz mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica oslobođenih kolagenom iz sinovijalne ovojnice koljenih zglobova. Diferencijaciju osteoblasta sam utvrdila brojanjem osteoblastnih kolonija koje sam dokazala histokemijskim bojanjem enzima alkalne fosfataze (AP, prema engl. *alkaline phosphatase*), aktivnosti enzima AP u lizatima stanica iz osteoblastnih kultura, te izražaja osteoblastnih gena Runx2, AP, i OPG, 7., 10., i 14. dana stanične kulture. Izražaj gena sam odredila postupkom obrnutog prepisivanja (RT, prema engl. *reverse transcription*) stanične ribonukleinske kiseline (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*) i umnažanjem komplementarne DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR, prema engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*).

Nadalje, odredila sam izražaj receptora Fas na sinovijalnim mezenhimnim stanicama iz koljenih zglobova, te na osteoblastima 7., 10. i 14. dana stanične kulture postupkom protočne citometrije i imunocitokemijski, te izražaj gena za Fas postupkom qRT-PCR.

Drugi niz pokusa pokazao je može li dodavanje aktivacijskog protutijela anti-CD95 (Jo2, BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD) potaknuti apoptozu ili inhibirati diferencijaciju osteoblasta iz sinovijalnih mezenhimnih stanica. Udio apoptotičnih stanica sam odredila protočnom citometrijom 16 sati nakon dodavanja protutijela anti-CD95 postupkom obilježavanja aneksinom V i propidijevim jodidom (PI, prema engl. *propidium iodide*) i brojenjem jezgara s morfološkim znakovima apoptoze obojenim fluorescentnom bojom 4',6'-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI). Diferencijaciju osteoblasta odredila sam brojanjem osteoblastnih kolonija i određivanjem aktivnosti enzima AP u lizatima stanica iz kultura osteoblasta 10. i 14. dan, te određivanjem izražaja osteoblastnih gena.

Usporedno s pokusima *in vitro* sam uspostavila model AIA u miševa divljeg tipa temeljnog soja B6. Da bih utvrdila *in vivo* značaj nedostatnosti receptora Fas u patogenezi AIA, usporedila sam promjere koljenih zglobova, histološke značajke zglobnih oštećenja i osteoblastogenezu iz sinovijalnih mezenhimnih stanica i mezenhimnih stanica koštane srži u Fas  $-/-$  miševa s miševima divljeg tipa, te koštane parametre određene histomorfometrijski i mikro-kompjuteriziranom tomografijom. Životinje sam imunizirala potkožnom injekcijom mBSA u CFA u slabinsko područje, te ponovnom intradermalnom injekcijom s mBSA u CFA u rep 7 dana nakon primarne imunizacije. Dvadeset i jedan dan nakon primarne imunizacije, potaknula sam artritis intraartikularnom injekcijom mBSA u oba koljena. Miševima kontrolne skupine sam intraartikularno injicirala fiziološku otopinu puferiranu fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*). Miševe sam žrtvovala dva tjedna nakon indukcije artritisa, odnosno 35. dan od početka primarne imunizacije, te sam analizirala razvoj artritisa. Kako bih isključila utjecaj imunizacije na koštani metabolizam, uvela sam i kontrolnu skupinu koja je uključivala neimunizirane miševe. Na ovaj način, u svakom sam pokusu koristila minimalno 30 životinja, podijeljenih u sljedeće eksperimentalne skupine:

- kontrolna skupina imuniziranih miševa divljeg tipa intraartikularno injiciranih PBS otopinom 21. dan nakon primarne imunizacije (6 miševa): skupina B6 CTRL
- skupina imuniziranih miševa divljeg tipa kojima je induciran artritis intraartikularnim injiciranjem mBSA 21. dan nakon primarne imunizacije (6 miševa): skupina B6 AIA
- kontrolna skupina imuniziranih Fas  $-/-$  miševa intraartikularno injiciranih PBS otopinom 21. dan nakon primarne imunizacije (6 miševa): skupina Fas  $-/-$  CTRL

- skupina Fas –/– miševa kojima je induciran artritis intraartikularnim injiciranjem mBSA 21. dan nakon primarne imunizacije (6 miševa): skupina Fas –/– AIA
- skupina neimuniziranih miševa divljeg tipa (6 miševa) (za isključivanje utjecaja imunizacije na koštani metabolizam).

Svaki pokus je ponovljen najmanje tri puta.

## 4.3 Kultura stanica

### 4.3.1 Kultura osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži

Kulturu osteoblasta započela sam pripremom suspenzije stanica koštane srži ispiranjem medularne šupljine bedrene i goljenične kosti hranjivim medijem  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) kroz iglu provrta 23G. Broj stanica u suspenziji sam odredila brojanjem u Bürker-Türkovoju komorici korištenjem 0.05% tripanskog plavila kako bih isključila mrtve stanice. Za uzgoj stanica sam uzimala uzorke dobivene združivanjem koštanih srži iz najmanje 6 pokusnih životinja.

Za uzgoj osteoblasta stanice sam zasijala u pločice s 24 ili 6 zdenaca u gustoći  $1 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Četvrtoga dana kulture sam promijenila hranjivi medij, čime su iz kulture odstranjene neadherentne i mrtve stanice. Sedmog dana kulture, u zdence sam dodala diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata (Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, MI, SAD). Medij sam potom mijenjala svaki drugi dan. Za svaki uzorak sam zasadila 6 zdenaca na pločici za kulturu s 24 zdenca ili 3 zdenca na pločici za kulturu sa 6 zdenaca za histokemijsko bojanje kolonija koje izražavaju enzim AP. Kolonije sam bojala 14. dana kulture, korištenjem komercijalno dostupnog seta kemikalija (Alkaline phosphatase leukocyte kit; Sigma-Aldrich Corp.), a crveno obojane AP-pozitivne kolonije sam brojala pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss Microimaging Inc., Oberkochen, Njemačka). Za izolaciju stanične RNA i za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima AP u staničnom lizatu u tri vremenske točke (7., 10. i 14. dan kulture), sam zasadila po 6 zdenaca na pločici za kulturu s 24 zdenca, odnosno 3 zdenca na pločici za kulturu sa 6 zdenaca po svakoj vremenskoj točki.

#### 4.3.2 Kultura osteoblasta iz sinovijalnih mezenhimnih stanica

Sinovijalne mezenhimne stanice sam izolirala iz zglobova mišjih koljena prema modificiranom protokolu Armaka M. i suradnika (275). Zglobove sam izolirala i detaljno očistila od okolnih mekih tkiva, te ih držala u HBSS puferu (prema engl. *Hank's balanced salt solution*) (Invitrogen) s 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina i 2% nistatina. U izdvojene i očišćene zglobove sam injicirala 50  $\mu$ l kolagenaze tipa IV (Sigma-Aldrich Corp.) koncentracije 2 mg/mL u  $\alpha$ -MEM mediju te inkubirala 1 sat na 37°C. Nakon toga sam otvorila zglobove i isprala sadržaj  $\alpha$ -MEM medijem s 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL streptomicina. Stanice sam izbrojala, te zasadila u pločice s 24 zdenca u gustoći od  $0.2 \times 10^6$  stanica/mL hranjivoga medija  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, te 5. dan potaknula osteoblastogenezu i koristila ih u pokusima na isti način kao što je opisano za kulture osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži.

#### 4.4 Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima AP u staničnom lizatu

U kolorimetrijskom postupku za određivanje aktivnosti AP kao kromogeni supstrat sam koristila p-nitrofenil fosfat (pNPP, prema engl. *p-nitrophenylphosphate*). AP ga pretvara u p-nitrofenol, topljivi žuto obojeni produkt, a intenzitet boje proporcionalan je aktivnosti enzima. Ukratko, stanice iz 6 zdenaca po uzorku, s pločice s 24 zdenca, sam oprala tri puta PBS otopinom, dodala 200  $\mu$ L pufera za lizu stanica (10 mM Tris, 0.1% Triton X-100, pH 7.5), te sadržaj zdenaca prebacila u epruvete volumena 1.5 mL. Potom sam uzorke tri puta smrznula i odmrznula, a nakon trećeg odmrzavanja centrifugirala 5 minuta na 12000 g. Supernatante sam prebacila u nove epruvete, te sam uzorke pohranila na -20°C. Aktivnost AP sam određivala u pločicama s 96 zdenaca. U zdence sam u duplikatu dodala 5  $\mu$ L uzorka i 15  $\mu$ L lizirajućeg pufera. Za negativnu sam kontrolu dodala samo 20  $\mu$ L lizirajućeg pufera. Potom sam u svaki zdenac dodala 180  $\mu$ L otopine supstrata p-NPP (Sigma Aldrich Corp.) i pločicu inkubirala 30 minuta na 37°C, a potom očitatala apsorbancije na optičkom čitaču (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pri valnoj duljini 405 nm. Aktivnost AP sam izračunala koristeći jednadžbu pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama p-nitrofenola.

## **4.5 Određivanje izražaja receptora Fas na osteoblastima**

### **4.5.1 Određivanje izražaja receptora Fas protočnom citometrijom**

Izražaj receptora Fas sam odredila na sinovijalnim mezenhimnim stanicama nakon izolacije kolagenazom (0. dan) iz zglobova mišjih koljena, te na stanicama osteblastnih kultura 4., 7., 10. i 14. dan. Stanice sam od dna zdenca odvojila tripsinom (Invitrogen), a potom ih isprala PBS otopinom. Jednostaničnu suspenziju sam pripremila višestrukim protiskivanjem stanica kroz iglu provrta 23 G i potom kroz najlonsku mrežicu. Po  $1 \times 10^6$  stanica, resuspendiranih u 100  $\mu$ L PBS otopine, sam inkubirala tijekom 30 minuta s monoklonskim protutijelom anti-CD95 (BD Pharmingen) konjugiranim s fluorescein-izotijocijanatom (FITC), u razrjeđenju 1:100. Za kontrolu specifičnosti vezanja protutijela sam rabila odgovarajuće izotipsko kontrolno protutijelo (imunoglobulin G, skupine  $\lambda$ 2 armenskoga hrčka) (BD Pharmingen), konjugirano s bojom FITC te primijenjeno u istim uvjetima kao i protutijelo anti-CD95. Vezanje fluorescentno obilježenih protutijela sam izmjerila pomoću uređaja za protočnu citometriju FACSCalibur (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, SAD), a podatke analizirala softverom WinMDI 2.9 (J. Trotter 1993-1998). Od svakog uzorka sam za potrebe analize prikupila po 20 000 događaja.

### **4.5.2 Određivanje izražaja receptora Fas na osteoblastima postupkom imunofluorescencije**

Osteoblaste uzgojene u komoricama za imunocitokemiju (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) sam uzela za analizu 10. i 14. dan kulture. Stanice sam isprala puferom PBS, a potom fiksirala tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi pomoću 4% otopine formaldehida u puferu PBS. Potom sam otopinu za fiksiranje isprala 3 puta puferom PBS, a za blokiranje nespecifičnih veznih mjesta sam stanice tijekom 15 min inkubirala na sobnoj temperaturi s 3% otopinom BSA (Sigma-Aldrich Corp.) u PBS otopini. Potom sam dodala protutijelo anti-CD95-FITC (BD Pharmingen) razrijeđeno 1:100 u otopini 3% BSA u PBS otopini i inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi, te stanice 3 puta isprala PBS otopinom. Jezgre stanica sam obojala bojom DAPI (Sigma-Aldrich Corp.) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, a potom boju opet isprala tri puta puferom PBS. Potom sam skinula stijenke komorice, staklo osušila, prekrila Mowiolom (Hoechst, Frankfurt, Njemačka) i obojane

stanice promatrala fluorescentnim mikroskopom Axiovert 200 (Carl Zeiss Microimaging Inc.).

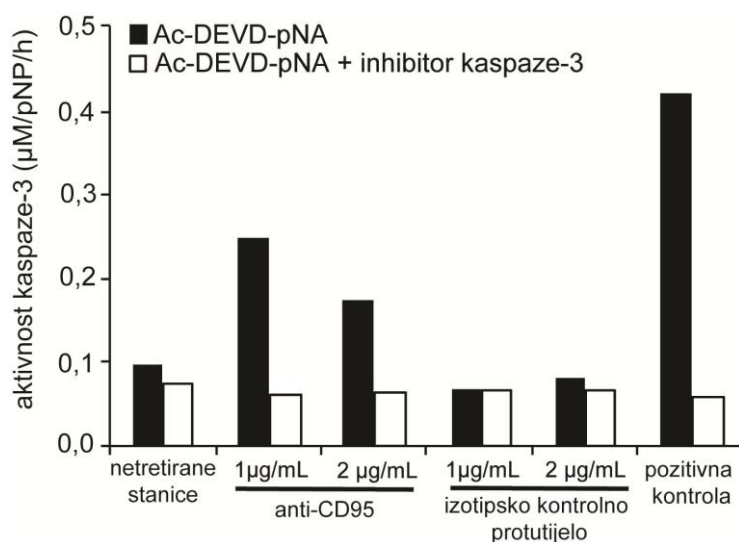
#### **4.6 Izazivanje apoptoze dodavanjem aktivirajućeg protutijela za receptor Fas**

Kako bih provjerila djelovanje aktivirajućeg mišjeg protutijela anti-CD95 (Jo2, BD Pharmingen), koristila sam mišju limfocitnu leukemijsku staničnu liniju L1210. Stanice L1210 na membrani izražavaju Fas i osjetljive su na apoptozu potaknutu njegovom aktivacijom. Za procjenu apoptoze sam koristila kolorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaze-3, koje je opisano u jednom od sljedećih odlomaka. Nakon 16 sati izlaganja stanica L1210 aktivacijskom protutijelu anti-CD95, porasla je aktivnost kaspaze-3 u njihovim lizatima, ovisno o količini dodanog protutijela (Slika 1.). Specifičnost ovog učinka je dokazana nalazom izostanka porasta aktivnosti kaspaze-3 nakon dodavanja izotipskog kontrolnog protutijela (Slika 1.)

Potom sam mišje anti-CD95 protutijelo dodavala osteoblastnim kulturama jednokratno 6., 9. i 13. dan, ili u sve tri vremenske točke, u koncentraciji 1 µg/mL. Usto sam dodala i protein G, koji potiče dodatnu trimerizaciju receptora Fas, u koncentraciji 1 µg/mL. Za kontrolu specifičnosti indukcije apoptoze stanicama sam dodala izotipsko kontrolno protutijelo (Ha4/8, BD Pharmingen) i protein G (Sigma-Aldrich Corp.) u istim uvjetima kao što je navedeno za protutijelo anti-CD95.

U svome istraživanju sam također planirala koristiti kolorimetrijski postupak određivanja aktivnosti izvršne kaspaze-3 kao mjere apoptoze osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica nakon dodavanja mišjeg anti-CD95 protutijela. Međutim, nisam mogla analizirati dobivene rezultate jer aktivnost kaspaze-3 nije bila dostatna za stvaranje mjerljivog intenziteta žuto obojenog p-nitroanilina (pNA), što je vjerojatno uzrokovano relativno malim udjelom apoptotičnih sinovijalnih mezenhimnih stanica koji je izmjeren metodama protočne citometrije i DAPI bojanjem.





**Slika 1. Poticanje apoptoze aktivacijskim protutijelom anti-CD95 u mišjoj limfocitnoj leukemijskoj staničnoj liniji L1210.** Stanice L1210 su zasijane u RPMI 1640 mediju s 10% fetalnog goveđeg seruma u pločicu za kulturu s 24 zdenca, u gustoći  $10^6$  stanica po zdencu u 1 mL, a potom su inkubirane tijekom 16 sati na  $37^\circ\text{C}$ , s  $1\mu\text{g/mL}$  i  $2\mu\text{g/mL}$  protutijela anti-CD95. Stanice iz 6 zdenaca s pločice s 24 zdenca su oprane PBS otopinom i resuspendirane u  $100\mu\text{L}$  lizirajućeg pufera, te inkubirane na ledu 20 minuta, a potom centrifugirane na  $16000\text{ g}$  15 minuta na  $+4^\circ\text{C}$ . Kolorimetrijsko određivanje kaspaze-3 u dobivenim supernatantima je provedeno u pločici s 96 zdenaca, pri čemu je u svaki zdenac dodano  $5\mu\text{L}$  staničnog lizata,  $85\mu\text{L}$  reakcijskog pufera, te  $10\mu\text{L}$  supstrata, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA), te je pločica inkubirana na  $37^\circ\text{C}$  90 minuta. Apsorbancije su određene pomoću optičkog čitača pri valnoj duljini 405 nm. Uzorci su analizirani u duplikatima. Aktivnost kaspaze-3 je izračunata iz kalibracijske krivulje nacrane prema apsorbancijama standardnih uzoraka s poznatim koncentracijama p-nitroanilina (pNA). Specifičnost djelovanja protutijela anti-CD95 je pokazana dodavanjem izotipskog kontrolnog protutijela u istim koncentracijama. Za pozitivnu kontrolu je korišteno  $5\mu\text{L}$  kaspaze-3 koncentracije  $5\mu\text{g/mL}$ , a za negativnu kontrolu lizatima stanica je dodano  $10\mu\text{L}$  inhibitora kaspaze-3 (Ac-DEVD-CHO).

#### 4.7 Određivanje udjela apoptotičnih stanica

Udio apoptotičnih stanica sam određivala 16 sati nakon dodavanja protutijela anti-CD95 protočnom citometrijom postupkom obilježavanja aneksinom V PI, te brojanjem jezgara s morfološkim znakovima apoptoze obojenim fluorescentnom bojom DAPI.

##### 4.7.1 Određivanje udjela apoptotičnih stanica vezanjem aneksina V

U početnoj fazi apoptoze dolazi do premještanja fosfolipida fosfatidil serina iz unutrašnjosti lipidnog dvosloja na vanjsku stranu stanične membrane, što fagocitima omogućuje prepoznavanje apoptotičnih stanica i apoptotskih tjelešaca te njihovo uklanjanje bez izazivanja upalnog procesa (276). Aneksin V je protein iz skupine aneksina koji specifično veže fosfatidil serin, te se u konjugiranom obliku s fluorescentnom bojom rabi za detektiranje

apoptoze pomoću protočne citometrije. Aneksin V je vrlo specifična metoda, osobito u početnoj fazi apoptoze kada je očuvana cjelovitost stanične membrane, jer nakon cijepanja i fragmentacije DNA postupno dolazi i do promjene propusnosti stanične membrane. Jednako tako aneksin V će se vezati i na fosfatidil serin s unutrašnje strane stanične membrane ako je narušena njezina cjelovitost, kao primjerice u slučaju nekroze stanice. Kako bi se mogle razlikovati nekrotične, žive i stanice u apoptozi, uvodi se dodatno bojenje s PI koji zbog velike molekularne mase ne prolazi kroz cjelovitu staničnu membranu. Ako je stanična membrana oštećena, PI će ući u stanicu i obojiti staničnu jezgru zbog velikog afiniteta prema nukleinskim kiselinama. Zato je moguće istodobnim bojanjem stanica aneksinom V-FITC (zelena fluorescencija) i PI (crvena fluorescencija) razlikovati žive stanice (FITC<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>), apoptotične stanice (FITC<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>) i mrtve stanice (FITC<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>).

Stanice sam od dna zdenca odvojila tripsinom (Invitrogen), centrifugirala 5 minuta pri 250 g na +4 °C i potom obilježila aneksinom V-FITC (BD Pharmingen) prema uputi proizvođača. Ukratko, stanice sam isprala puferom PBS, a potom resuspendirala u puferu za vezanje FITC-aneksina V (10mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4) u gustoći 2×10<sup>5</sup> stanica/mL. Staničnu suspenziju (100 µL) sam inkubirala tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi s 5 µL aneksina V i 10 µg/mL PI (Sigma-Aldrich Corp.), dodala 300 µL pufera za vezivanje i udio apoptotičnih stanica odredila protočnom citometrijom, korištenjem uređaja FACSCalibur (BD Biosciences). Analizirala sam ukupno 10 000 događaja.

#### **4.7.2 Morfološko određivanje udjela apoptotičnih jezgara obojenih fluorescentnom bojom DAPI**

Stanice uzgojene u komoricama za imunocitokemiju (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) sam uzela za analizu 7., 10. i 14. dan kulture. Stanice sam isprala PBS otopinom, a potom fiksirala tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi pomoću 4% otopine formaldehida u PBS otopini. Potom sam stanice isprala PBS otopinom i inkubirala s 2 µg/mL DAPI (Sigma-Aldrich Corp.) tijekom 15 min na sobnoj temperaturi, a potom boju opet isprala tri puta PBS otopinom. Potom sam skinula stijenke komorice, staklo osušila, prekrila Mowiolom (Hoechst, Frankfurt, Njemačka) i obojane stanice analizirala fluorescentnim mikroskopom Axiovert 200 (Carl Zeiss Microimaging Inc.), a apoptotičnima sam smatrala stanice s fragmentiranim jezgrama ili jezgrama s jasno kondenziranim kromatinom. Analizirala sam ukupno 500 stanica u svakom zdenku.

### 4.7.3 Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaze-3 u staničnom lizatu

Kaspaza-3 je izvršna kaspaza oba apoptotična puta, a ima središnju ulogu u posredovanju kondenzacije kromatina i fragmentacije DNA, te bubrenju stanične membrane (engl. *blebbing*) (277). Postupak kolorimetrijskog određivanja kaspaze-3 temelji se na hidrolizi peptidnog supstrata acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) (Sigma-Aldrich Corp.) kaspazom-3, čime se oslobađa žuto obojeni pNA. Intenzitet boje proporcionalan je aktivnosti kaspaze-3, a očitava se pri valnoj duljini od 405 nm.

Stanice L1210 iz 6 zdenaca s pločice s 24 zdenca sam oprala PBS otopinom, spustila centrifugiranjem tijekom 5 minuta pri 250 g na +4°C, te ih još jednom oprala PBS otopinom. Stanične taloge sam potom resuspendirala u 100 µL lizirajućeg pufera (Sigma-Aldrich Corp.), te prebacila u epruvete volumena 1,5 mL, inkubirala na ledu 20 minuta te centrifugirala na 16000 g 15 minuta na +4°C. Dobivene supernatante sam prebacila u nove epruvete te kolorimetrijsko određivanje provela u pločici s 96 zdenaca, tako da sam u svaki zdenac stavila 5 µL staničnog lizata, 85 µL reakcijskog pufera (Sigma Aldrich Corp.), te 10 µL Ac-DEVD-pNA supstrata. Uzorke sam analizirala u duplikatima. Kao pozitivnu kontrolu, umjesto uzorka staničnog lizata sam dodala 5 µL otopine kaspaze-3 koncentracije 5 µg/mL (Sigma Aldrich Corp.), a za negativnu kontrolu sam koristila 10 µL inhibitora kaspaze-3 (Ac-DEVD-CHO) (Sigma Aldrich Corp.). Pločicu sam pokrila aluminijskom folijom i inkubirala na 37°C tijekom 90 minuta. Apsorbancije sam odredila pomoću optičkog čitača (Bio-Rad) pri valnoj duljini 405 nm. Aktivnost kaspaze-3 izračunala sam iz kalibracijske krivulje nacrtane prema apsorbancijama standardnih uzoraka s poznatim koncentracijama pNA.

### 4.8 Analiza genskog izražaja

Izražaj gena sam odredila 7., 10. i 14. dana kulture osteoblasta u koštanoj srži, suspenziji sinovijalnih mezenhimnih stanica i mišjem zglobnom tkivu koljena. Tkiva sam homogenizirala u odgovarajućem volumenu otopine za izolaciju RNA (TRI-Reagent; Molecular Research Center, Cincinnati, OH, SAD), a za uzimanje RNA iz stanične kulture najprije sam odlila medij iz zdenaca, stanice kratko isprala PBS otopinom, a potom u svaki zdenac dodala odgovarajući volumen otopine za izolaciju RNA (TRI-Reagent). Svaki uzorak sam oblikovala združivanjem 3 zdenca iz pločice sa 6 zdenaca ili 6 zdenaca iz pločice s 24 zdenca. Izolaciju stanične RNA sam provela prema postupku koji su opisali Chomczynski i

Sacchi (278). Ukratko, nakon dodavanja otopine za izolaciju, inkubirala sam uzorke na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, a potom centrifugirala brzinom od 12000 g tijekom 30 minuta na +4°C. Potom sam na uzorke dodala 0.2 mL kloroforma, inkubirala 2 minute na +4°C i centrifugirala pri 10000 g tijekom 15 minuta na +4°C. Gornju, vodenu fazu prenijela sam u novu epruvetu, na nju dodala 0.5 mL izopropanola i inkubirala tijekom 60 minuta na -20°C. Ponovnim centrifugiranjem pri 12000 g tijekom 15 minuta na +4°C spustila sam dobiveni precipitat na dno epruvete, oprala 75%-tnim etanolom i centrifugirala brzinom od 7500 rpm tijekom 5 minuta na +4°C. Talog sam otopila u destiliranoj vodi, a koncentraciju i čistoću izolirane RNA provjerila 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.

Izoliranu RNA u količini od 2 µg po uzorku sam prepisala u cDNA postupkom reverzne transkripcije upotrebom seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu 9 µl) sam dodala 10 µl 2X RT pufera i 1 µl 20X mješavine enzima reverzne transkriptaze i inkubirala na 37°C tijekom 60 minuta. Reakciju sam zaustavila grijanjem tijekom 5 minuta na 95°C.

Dobivenu cDNA sam kvantitativno umnožila postupkom qRT-PCR pomoću uređaja ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) kako bih odredila izražaj gena za β-aktin, Fas, Runx2, AP i OPG i RANKL. Umnožene dijelove cDNA s pomoću seta začetnika za β-aktin sam otkrila mjerenjem vezanja fluorescentne boje SYBR Green I, pomoću seta kemikalija SYBR Green i PCR Master Mix, prema uputama proizvođača (Applied Biosystems). Svaka reakcija odvijala se u duplikatu. Reakcijski volumen je bio 25 µL, a smjesa je sadržavala: 0.25 µL cDNA; 0.25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; pripravak 1x SYBR Green PCR Master Mix, u kojem se nalaze fluorescentna boja SYBR Green I i 0.625 U DNA polimeraze (AmpliTaq Gold DNA polymerase). Začetnici za β-aktin (sense 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAA-3', antisense 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGA-3') su oblikovani uporabom računalnog programa (Primer Express Software; Applied Biosystems) i nabavljeni od tržišnog izvora (Applied Biosystems), a rutinski se koriste u našem laboratoriju (243).

Izražaj gena za Fas, Runx2, OPG i AP i RANKL sam odredila pomoću komercijalnog seta kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay se sastoji od para

specifičnih začetnika i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3' kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže na cDNA između oba začetnika, a produljenjem začetnika, DNA polimeraza cijepa probu i tako dovodi do odvajanja fluorescentne boje od NFQ i porasta fluorescencije. Svaka reakcija se odvijala također u duplikatu, u reakcijskom volumenu 25  $\mu$ L. Smjesa je sadržavala: 0.25  $\mu$ L cDNA; 0.25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; 250 nM TaqMan probe i 0.625 U DNA polimeraze (AmpliAq Gold DNA polymerase). Reakcije je bila postavljena u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Za oba načina detekcije uzorci se prvo inkubiraju 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 se uzorci inkubiraju na: +95°C tijekom 15 s i 60°C tijekom 60 s. Budući da se boja SYBR Green ugrađuje u dvostruku uzvojnica DNA, pri određivanju izražaja pomoću seta kemikalija SYBR Green I i PCR Master Mix, proizvodi PCR reakcije su nakon zadnjega ciklusa razdvojeni temperaturnim gradijentom s +60°C do +95°C brzinom zagrijavanja od 0.03°C/s, kako bi se potvrdila temperatura tališta ( $T_m$ , prema engl. *melting temperature*) specifičnog proizvoda umnažanja, a isključilo postojanje nespecifičnih proizvoda. Pri korištenju TaqMan Assay seta kemikalija to nije potrebno obzirom da je vezanje probe specifično.

Očitanja fluorescencije su bila prikazana grafički. Na apscisi je bio broj ciklusa, a na ordinati intenzitet fluorescencije prikazan logaritamski ( $\Delta R_n$ ; razlika fluorescencije reakcije i “temeljne” fluorescencije). Na sredini linearnog dijela krivulje umnožavanja sam postavila arbitrarni prag i prema njemu odredila kritični broj ciklusa ( $C_t$ ) kao onaj ciklus na kojem razina fluorescencije prelazi arbitrarni prag. Za svaki uzorak sam izračunala relativnu količinu cDNA uporabom standardne krivulje. Standardnu krivulju sam oblikovala uporabom 5 serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta koštane srži, sinovijalnih stanica ili sinovijalnoga zglobnoga tkiva). Standardna krivulja je prikazana u koordinatnom sustavu u kojem su logaritmi količine cDNA prikazani na apscisi, a vrijednosti  $C_t$  na ordinati. Relativna količina mRNA u uzorku je tada izražena u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin, kao na “endogenu” kontrolu (279).

## **4.9 Artritis potaknut antigenom**

### **4.9.1 Imunizacija B6 i Fas $-/-$ miševa s mBSA**

Za indukciju kroničnog artritisa BSA je pogodan kada mu je izoelektrična točka (pI) najmanje 8,5. Pozitivan naboj omogućuje čvrstu adherenciju antigena na negativno nabijene zglobne ligamente i hrskavicu i nužan je za odgovarajuće zadržavanje proteina u zglobu u kojemu se inducira artritis. Sam BSA ima pI vrijednosti 4,5, a metilacijom se postiže njegov kationski naboj. Kako mBSA (Sigma-Aldrich Corp.) nije topljiv u fiziološkoj otopini, najprije sam 20 mg mBSA otopila u demineraliziranoj vodi, a potom sam dodala 1 mL 10 M PBS otopine na 9 mL vodene otopine mBSA da bih dobila mBSA konačno otopljen u 1 M PBS otopini. Potom sam tu otopinu snažno protisnula kroz iglu provrta 27 ½ u 10 mL uljne otopine CFA (Sigma-Aldrich Corp.) da bih dobila emulziju. Homogenost sam postigla ponavljanim protiskivanjem emulzije kroz štrcaljku veličine 2 mL bez igle.

Kako bih imunizirala miševе, potkožno sam im injicirala 200 µg mBSA u 200 µL CFA obostrano u slabinsko područje, dijeleći dozu na obje strane. Nakon sedam dana sam miševima dodatno potaknula imuni odgovor, tako što sam im intradermalno u bazu repa injicirala 100 µg mBSA u 100 µL CFA. Iglu sam uvela usporedno s repom u području srednje trećine, između dorzalne i lateralne repne vene, ubrizgala emulziju kada je vrh igle bio u bazi repa, a potom iglu lagano izvukla i područje uboda čvrsto pritisnula vatom da bih izbjegla vraćanje emulzije.

### **4.9.2 Indukcija artritisa u B6 i Fas $-/-$ miševa**

Dvadeset i jedan dan poslije primarne imunizacije sam miševima injicirala 60 µg mBSA otopljenog u 6 µL sterilne PBS otopine u oba koljena. Miševima kontrolne skupine sam u koljena injicirala 6 µL sterilne PBS otopine. Miševе sam prije injiciranja anestetizirala tribromoetanolom (Avertin, Sigma-Aldrich Corp.). Da bih bila sigurna u preciznost intraartikularne injekcije, napravila sam malu inciziju na koži usporedno s patelarnim ligamentom da bih prikazala ligament i patelu. Koristeći iglu provrta 27 ½ G, ušla sam vrhom igle s medijalne strane u zglobnu šupljinu koljena usporedno s patelarnim ligamentom te injicirala 6 µL otopine mBSA ili PBS otopine. Iglu sam potom još nekoliko sekundi zadržala

unutar zglobne šupljine, te sam je polako izvukla da spriječim istjecanje otopine iz zgloba. Inciziju sam na koži prema potrebi zatvorila povratnim šavom.

### **4.9.3 Kliničko i histološko praćenje artritisa**

Miševe sam žrtvovala cervikalnom dislokacijom nakon anestezije avertinom, 35. dan poslije primarne imunizacije s mBSA, odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije s mBSA ili PBS otopinom.

Nakon skidanja kože sam izmjerila debljinu koljenih zglobova pomičnim mjerilom, mjereći svako koljeno 3 puta, te uzimajući kao rezultat njihove medijane. Histološku procjenu artritisa sam provela na frontalnim rezovima koljenih zglobova injiciranih s mBSA i PBS otopinom, obojenim Goldner-Masson trikromom. Zglobove sam izolirala i fiksirala u otopini 4% paraformaldehida tijekom 24 sata na 4°C, a potom demineralizirala u otopini 14% EDTA (prema engl. *etilen-diamine tetraacetic acid*) i 3% paraformaldehida tijekom 7 do 14 dana, dehidrirala u rastućim koncentracijama etanola te uklopila u parafinske blokove. Serijske rezove preparata debljine 6 µm sam rezala na rotacijskom mikrotomu (Lieca SM 2000 R, Leica, Nussloch, Njemačka). Histološku analizu panusa, sinovijalnog tkiva te zglobne hrskavice i kosti sam radila na mikroskopu Axio Imager (Carl Zeiss Microimaging Inc.) priključenim na računalo.

Procjenjivala sam celularnost sinovije, eksudat u zglobnom prostoru, razaranje hrskavice, te oštećenje subhondralne kosti invazijom panusa bodujući nalaze prema ljestvici preuzetoj od Odobašić i sur. (280) (Tablica 1.) prema kojoj je pojedini zglob mogao imati maksimalno 12 bodova.

**Tablica 1. Ljestvica bodovanja zglobne upale**

Sinovitis (celularnost sinovije)	0 – normalna sinovija 1 – blagi upalni infiltrat 2 – umjereni upalni infiltrat 3 – proširen hipercelularni panus
Eksudat u zglobnom prostoru	0 – nema stanica 1 – nekoliko stanica u zglobnom prostoru 2 – rijetke stanične nakupine 3 – brojne stanične nakupine/mnoštvo stanica u zglobnom prostoru
Razaranje hrskavice (ovisno o gubitku bojanja hrskavice)	0 – normalno bojanje 1 – 50-100% obojenja 2 – manje od 50% obojenja 3 – potpuni izostanak bojanja
Oštećenje subhondralne kosti invazijom panusa	0 – bez invazije 1 – blaga invazija panusom 2 – umjerena invazija panusom 3 – jaka invazija panusom

#### 4.9.4 Mikro-kompjuterizirana tomografija

Kako ljudi oboljeli od RA razvijaju ne samo subhondralni, već i sustavni gubitak kosti, te uzimajući u obzir nalaz da su Fas –/– miševi zaštićeni od gubitka kosti induciranog ovarijektomijom (251), procijenila sam učinak AIA na jukstaartikularnu koštanu resorpciju Fas –/– i kontrolnih miševa analizirajući distalne metafize bedrenih kostiju, te na sustavnu koštanu resorpciju analizirajući tijela drugih lumbalnih (L2) kralježaka. Da bih isključila utjecaj imunizacije na koštanu resorpciju, uključila sam i kontrolnu skupinu neimuniziranih miševa.

Bedrene kosti su analizirane sustavom za mikrokompjuteriziranu tomografiju (1172 SkyScan, SkyScan, Kontich, Belgium), a snimljene su svakih 0.7° kroz 360° rotacije, pri rezoluciji od 2 µm, te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm. Kralješci su također skenirani sustavom za mikrokompjuteriziranu tomografiju (1076 SkyScan 1076 *in vivo* microCT, SkyScan, Kontich, Belgija), pri čemu su snimljeni svakih 0.5° kroz 180° rotacije, pri rezoluciji od 9 µm, te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm. Skenirane slike sam



rekonstruirala pomoću SkyScan Recon programa i analizirala pomoću SkyScan CTAnalyser v. 1.10 2010 programa. Područje za trodimenzionalnu analizu i rekonstrukciju trabekularne kosti u bedrenoj kosti sam odredila u odnosu na ploču rasta bedrene kosti, a koje počinje otprilike na udaljenosti od 0,4 mm (200 presjeka) od zone rasta u smjeru metafize i proteže se visinom od 0,8 mm (400 presjeka). Trodimenzionalna analiza trabekularne kosti L2 kralješka provedena je u cilindričnom odsječku središnjeg dijela tijela kralješka duljine 0,9 mm (100 presjeka), na udaljenosti od 0,9 mm (100 presjeka) od granice hrskavice i kosti.

Analizom kostiju sam odredila sljedeće varijable: koštani volumen (BV/TV, prema engl. *bone volume/trabecular volume*; %), broj trabekula (Tb.N, prema engl. *trabecular number*; /mm), širinu trabekula (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*;  $\mu\text{m}$ ) i razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*;  $\mu\text{m}$ ).

#### **4.10 Analiza rezultata i statistički postupci**

Izražaj receptora Fas u kulturama sinovijalnih mišjih osteoblasta i udio apoptotičnih stanica u kulturama tretiranim protutijelom anti-CD95 sam analizirala u tri neovisna pokusa, te prikazala rezultat jednog reprezentativnog pokusa.

Diferencijaciju sinovijalnih mišjih osteoblasta sam ocijenila na temelju intenziteta bojanja AP-pozitivnih kolonija u 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. Aktivnost AP sam izmjerila u stanicama skupljenim iz 6 zdenaca. Izražaj gena specifičnih za osteoblaste u kulturama sinovijalnih mezenhimnih stanica, te kulturama stromalnih stanica koštane srži sam izrazila u odnosu na  $\beta$ -aktin. Metodološka istraživanja reverzne transkripcije i qRT-PCR-a ukazala su da je najmanja razlika u mRNA koja se može ponavljano izmjeriti 100% (281), pa sam stoga razliku u količini mRNA od 100% ili više, koja se ponavlja u svim pokusima, smatrala biološki značajnom.

AIA sam u B6 i Fas  $-/-$  miševa izazvala u tri odvojena pokusa, pri čemu sam u pokusnu skupinu uključila najmanje 6 miševa, a prikazala sam rezultate jednog reprezentativnog pokusa.

Budući da većina bioloških svojstava mjerenih u predviđenim pokusima ima normalnu raspodjelu u populaciji (282), rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost i standardnu devijaciju, a razlike između skupina sam testirala parametrijskim testovima. U svim testovima sam za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) uzela  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1 Diferencijacija osteoblasta iz primarnih mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro*

Kako bih proučila mogu li primarne mišje sinovijalne mezenhimne stanice diferencirati u zrele osteoblaste, analizirala sam njihovo usmjeravanje i diferencijaciju histokemijskim bojanjem osteoblastnih kolonija s pomoću enzima AP, određivanjem aktivnosti AP u lizatima stanica, te analizom izražaja gena specifičnih za osteoblaste tijekom osteoblastne kulture.

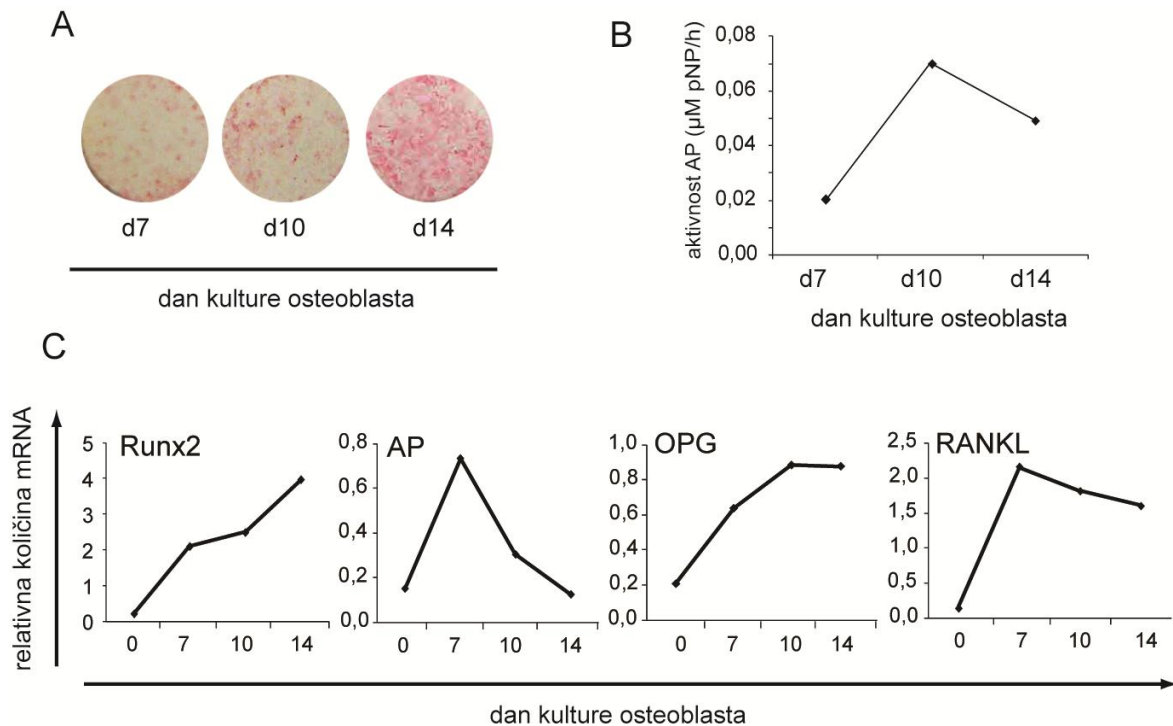
Osteoblastnom diferencijacijom sinovijalnih mezenhimnih stanica broj osteoblastnih kolonija od 7. do 10. dana kulture se povećavao, a potom su se kolonije međusobno stapale te se 14. dana kulture stvorio jedinstven stanični sloj histokemijski pozitivan na AP (Slika 2.A).

Aktivnost AP u staničnim lizatima 10. dana kulture trostruko je porasla u odnosu na vrijednost izmjerenu 7. dan, da bi se daljnjom diferencijacijom osteoblasta 14. dana kulture ponovo smanjila za trećinu vrijednosti (Slika 2.B).

Izražaj gena specifičnih za osteoblaste sam analizirala postupkom qRT-PCR. Ovim je postupkom potvrđen izražaj gena za Runx2, AP, OPG i RANKL u sinovijalnim osteoblastima (Slika 2.C). Rani biljeg osteoblasta, transkripcijski čimbenik Runx2, se pojavio s dodavanjem diferencijacijskog medija za osteoblaste, 7. dana kulture, a izražaj mu se povećavao sve do 14. dana osteoblastne kulture (Slika 2.C). Najveći porast izražaja AP sam opazila tijekom početnog usmjeravanja stanica osteoblastne loze, pri čemu je izražaj bio najveći 7. dana kulture osteoblasta, a potom se smanjivao da bi u zrelim osteoblastima 14. dana kulture bio jednak izražaju u neusmjerenim sinovijalnim mezenhimnim stanicama (Slika 2.C).

Izražaj OPG, biljega zrelih osteoblasta, se povećavao do 10. dana kulture osteoblasta i održavao se na toj razini do 14. dana kulture (Slika 2.C).

RANKL je bio vrlo slabo izražen u neusmjerenim sinovijalnim mezenhimnim stanicama, a izražaj se značajno povećao tijekom prvih sedam dana kulture, te se također potom održavao na toj razini do 14. dana kulture (Slika 2.C).

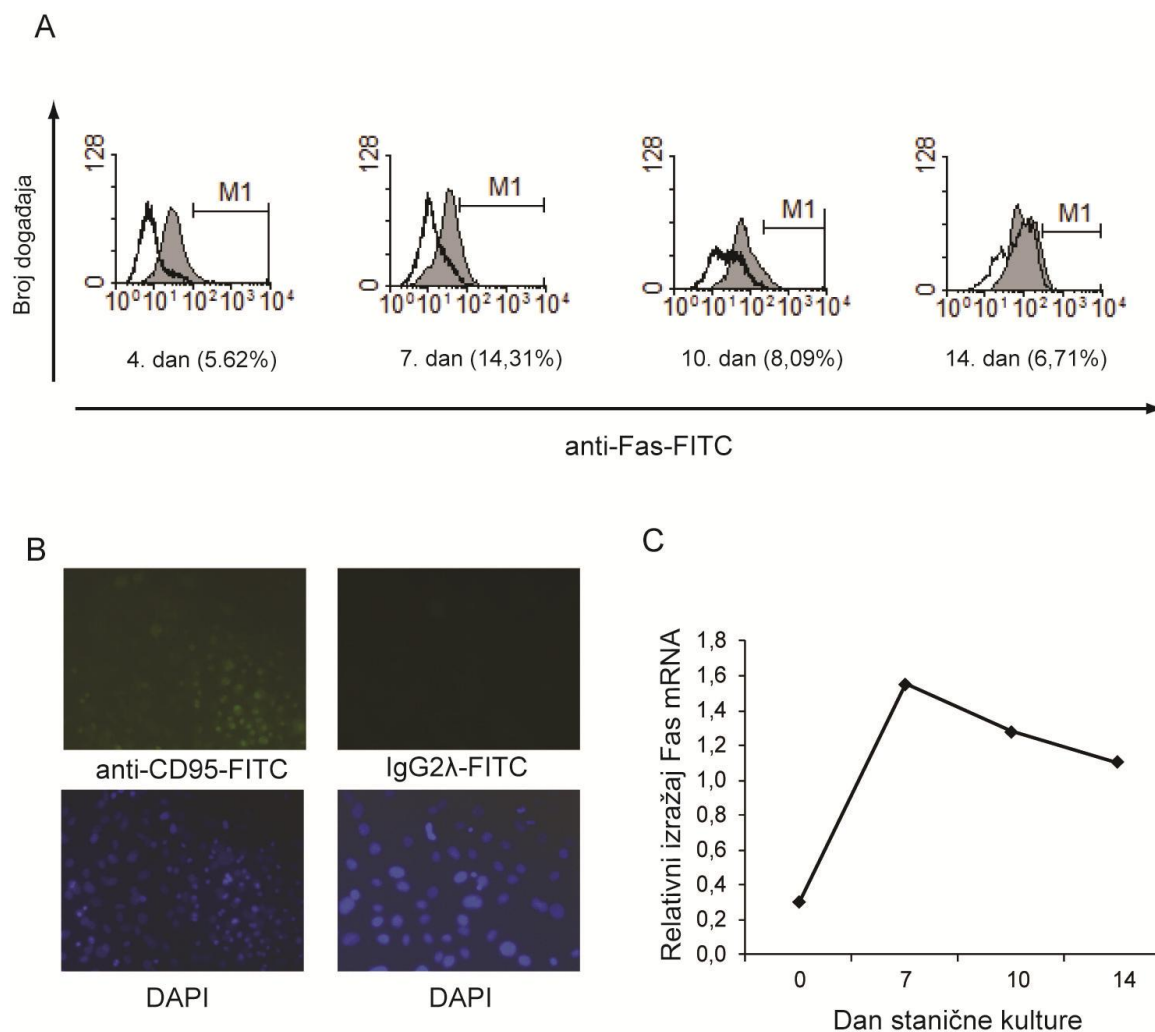


**Slika 2. Diferencijacija osteoblasta iz primarnih mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica.** Sinovijalne mezenhimne stanice su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $0,2 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture u zdenca je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu\text{g/mL}$  askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. **(A)** Kolonije stanica osteoblastne loze sedmoga, desetoga i četrnaestoga dana stanične kulture, histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP); **(B)** Aktivnost AP u staničnim lizatima tijekom osteoblastne diferencijacije sinovijalnih mezenhimnih stanica određena kolorimetrijskim postupkom. Aktivnost je mjerena iz staničnih lizata dobivenih združivanjem 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. U kolorimetrijskom postupku kao kromogeni supstrat je korišten p-nitrofenil fosfat koji AP pretvara u obojeni p-nitrofenol (pNP), a intenzitet boje očitani pri valnoj duljini 405 nm je proporcionalan aktivnosti enzima. Aktivnost AP je izračunata pomoću jednadžbe pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama p-nitrofenola i izražena kao  $\mu\text{M}$  stvorenog pNP na sat; **(C)** Izražaj mRNA za Runx2, AP, OPG i RANKL tijekom osteoblastne diferencijacije sinovijalnih mezenhimnih prethodnika *in vitro*. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. Vrijednosti izražaja su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Stanična kultura, histokemijsko bojanje, određivanje aktivnosti AP i analiza genskog izražaja postupkom qRT-PCR su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a na slici je prikazan jedan od pokusa. Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl. *runt related transcription factor 2*); OPG, osteoprotegerin; RANKL, ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa\text{B}$  (prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand*).

## **5.2 Izražaj receptora Fas na mišjim osteoblastima podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro***

Izražaj receptora Fas na razini bjelančevine na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica sam analizirala protočnom citometrijom i imunocitokemijski, obilježavanjem specifičnim protutijelom na mišji receptor Fas konjugiranim s fluorescentnom bojom FITC (anti-CD95-FITC) i uspoređivanjem jačine fluorescentnog signala sa signalom odgovarajućeg izotipskog kontrolnog protutijela. Iako je razina fluorescentnog signala protutijela protiv mišjeg receptora Fas bila relativno niska, taj se fluorescentni signal jasno razlikovao od signala izotipskog kontrolnog protutijela (Slika 3.A).

Na genskoj razini, izražaj receptora Fas sam analizirala postupkom qRT-PCR. Ovim postupkom je potvrđen izražaj gena za receptor Fas u sinovijalnim osteoblastima (Slika 3.C), a uzorak izražaja na genskoj razini odgovarao je uzorku izražaja na razini bjelančevine. Relativno slab izražaj gena za receptor Fas potvrđuje i razlika u kritičnomu broju ciklusa proizvoda umnožavanja gena (Ct) između gena za receptor Fas i gena za  $\beta$ -aktin, koja je bila između 12 i 14 ciklusa. Izražaj gena za Fas se povećavao tijekom prvih sedam dana osteoblastne kulture, a potom se nije značajnije mijenjao tijekom daljnjeg sazrijevanja osteoblasta. Usporedbom izražaja gena za Fas (Slika 3.C) s izražajem gena specifičnih za osteoblaste (Slika 2.C) vidljivo je da se on mijenja sukladno diferencijaciji osteoblasta.



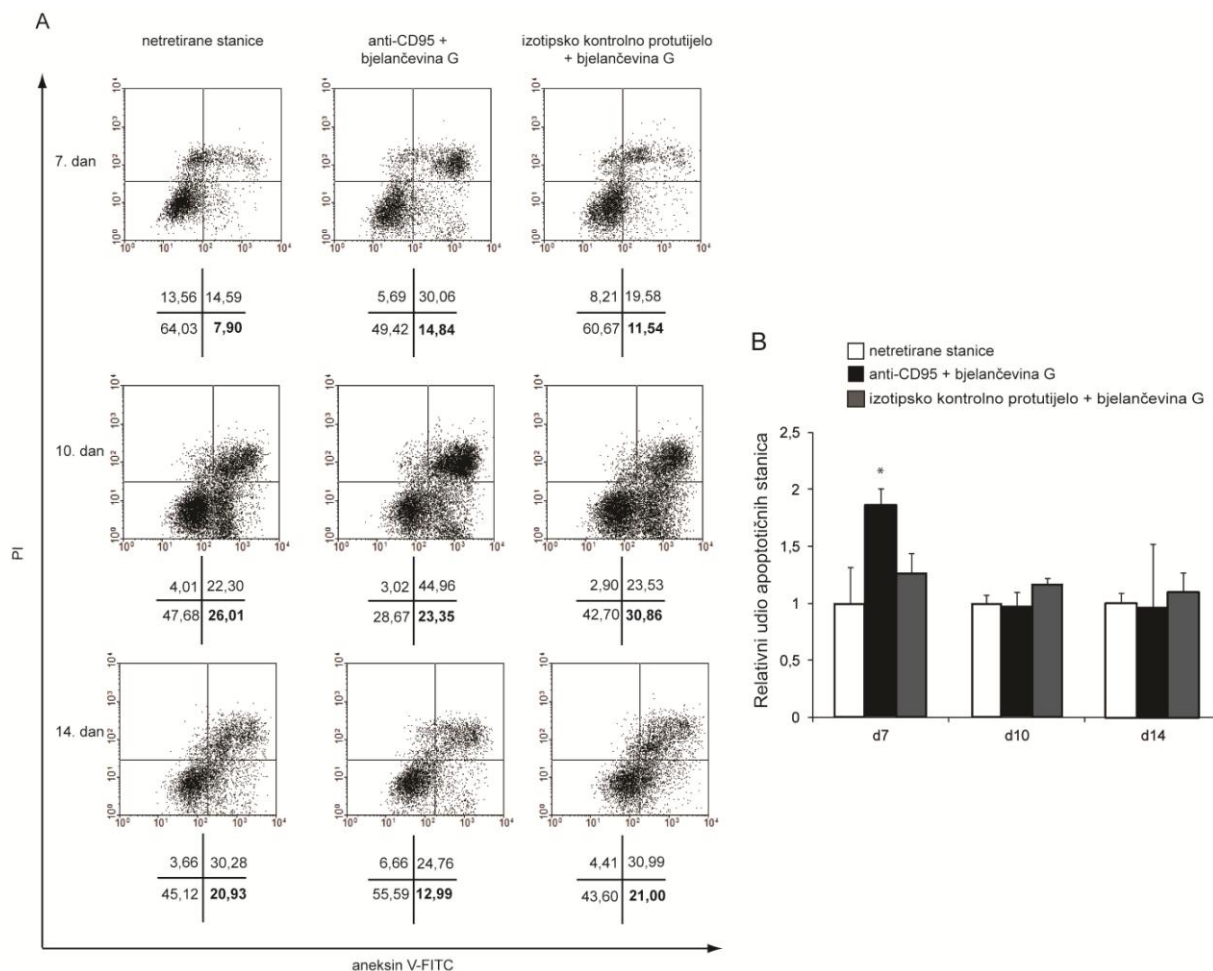
**Slika 3. Izražaj receptora Fas na osteoblastima podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica tijekom njihova sazrijevanja *in vitro*.** Sinovijalne mezenhimne stanice su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $0,2 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ -MEM hranjivog medija s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina. Sedmog dana kulture, u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata i potom mijenjan svaki drugi dan. **(A)** Udio stanica koje izražavaju Fas prikazan vezanjem protutijela specifičnog za mišji receptor Fas konjugiranog s fluorescentnom bojom FITC (anti-CD95-FITC). Pokusi su ponovljeni tri puta, a prikazan je jedan od ponovljenih pokusa. Sivi histogram, anti-CD95-FITC; prazan histogram, kontrolno izotipsko protutijelo (imunoglobulin G, skupine  $\lambda 2$  armenskoga hrčka) konjugirano s fluorescentnom bojom FITC. Marker (M1) postavljen je prema signalu kontrolnog izotipskog protutijela, tako da je udio stanica označenih markerom uvijek bio manji od 3%. Prikazan je postotak stanica obilježenih protutijelom anti-CD95-FITC. **(B)** Zreli osteoblasti četrnaestoga dana stanične kulture u vidnom polju srednjega povećanja ( $400\times$ ) fluorescentnoga invertirnoga mikroskopa, obilježeni specifičnim protutijelom za mišji receptor Fas (anti-CD95-FITC, gornja slika) i kontrolnim izotipskim protutijelom (imunoglobulin G, skupine  $\lambda 2$  armenskoga hrčka) konjugiranim s fluorescentnom bojom FITC (gornje slike), te ista vidna polja fluorescentnoga invertirnoga mikroskopa s jezgrama obojenim fluorescentnom bojom 4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI, donje slike); **(C)** Izražaj mRNA za receptor Fas tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*. Vrijednosti izražaja su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja gena za receptor Fas u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Stanična kultura i analiza genskog izražaja pomoću postupka qRT-PCR je ponovljena tri puta sa sličnim rezultatima, a na slici je prikazan jedan od pokusa.

### 5.3 Poticanje apoptoze mišjih osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica aktivacijom receptora Fas

Sposobnost poticanja apoptoze osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica aktivacijom receptora Fas sam procijenila obilježavanjem aneksinom V konjugiranim s fluorescentnom bojom FITC (aneksin V-FITC), nakon poticanja apoptoze tretiranjem sinovijalnih osteoblasta aktivacijskim protutijelom anti-CD95 i bjelančevinom G. Tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*, dio stanica i spontano odumire apoptozom (Slika 4.). Udio netretiranih stanica koje su vezale aneksin V u trenutku dodavanja medija koji potiče usmjeravanje stanica prema osteoblastnoj lozi (7. dan stanične kulture) je iznosio  $9,5 \pm 2,1\%$ , a dodavanjem aktivacijskog protutijela anti-CD95 taj se udio povećao dvostruko, na  $17,5 \pm 3,5\%$ . Usmjeravanjem stanica prema zrelim osteoblastima, 10. i 14. dana stanične kulture, udio apoptotičnih stanica kretao se između 20 i 30% ( $27,0 \pm 1,4\%$  10. dan, te  $22,0 \pm 1,4\%$  14. dan), te se nije značajno mijenjao dodavanjem protutijela anti-CD95 ( $25,5 \pm 3,5\%$  10. dan, te  $21 \pm 11,3\%$ ) (Slika 4.A,B).

Udio mrtvih stanica obilježenih s PI 7. dana stanične kulture bio je  $21 \pm 8,5\%$ , a tretiranje protutijelom anti-CD95 povećalo je taj udio za 11% na  $32,5 \pm 3,5\%$  (Slika 4.A,B). Broj mrtvih stanica u netretiranim kulturama se povećavao tijekom sazrijevanja osteoblasta, te je 10. dan kulture iznosio  $37,5 \pm 21,9\%$ , a 14. dan  $46,5 \pm 23,3\%$ . Protutijelo anti-CD95 nije značajno mijenjalo udio mrtvih stanica u odnosu na netretirane stanice ( $56 \pm 15,5\%$  10. dan, te  $40,5 \pm 21,9\%$  14. dan stanične kulture) (Slika 4.A, B). Udjeli apoptotičnih i mrtvih stanica u kulturama tretiranim izotipskim kontrolnim protutijelom i bjelančevinom G se nisu značajno razlikovali od onih u netretiranih stanica (Slika 4.), što potvrđuje specifičnost djelovanja protutijela anti-CD95 vezanjem za receptor Fas.

U svome istraživanju sam inicijalno planirala koristiti kolorimetrijski postupak određivanja aktivnosti izvršne kaspaze-3 za određivanje apoptoze osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica nakon dodavanja mišjeg anti-CD95 protutijela. Međutim, u ponavljanim pokusima, u lizatima osteoblasta sinovijalnoga podrijetla nakon dodavanja protutijela anti-CD95 nije došlo do stvaranja mjerljivog intenziteta žuto obojenog pNA, što je vjerojatno bilo uzrokovano relativno malim udjelom apoptotičnih sinovijalnih mezenhimnih stanica potvrđenim nalazima dobivenim protočnom citometrijom i DAPI bojanjem, a posljedično i do vrlo slabe i nemjerljive aktivnosti kaspaze-3.



**Slika 4. Udio apoptotičnih stanica koštane srži nakon poticanja apoptoze anti-mišjim CD95 protutijelom, određen vezivanjem aneksina V.** Mišje aktivacijsko protutijelo anti- CD95 (Jo2) dodavano je osteoblastnim kulturama jednokratno šesti, deveti i trinaesti dan kulture, ili u sve tri vremenske točke, u koncentraciji 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , uz 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bjelančevine G, koji potiče dodatnu trimerizaciju receptora Fas. Za kontrolu specifičnosti indukcije apoptoze stanicama je dodano izotipsko kontrolno protutijelo (imunoglobulin G, skupine  $\lambda 2$  armenskoga hrčka) i bjelančevina G u istim uvjetima kao što je navedeno za protutijelo anti-CD95. Protutijelo je dodano u dva zdenca pločice za kulturu s 24 zdenca, za svaku skupinu stanica u svakoj vremenskoj točki, a za analizu protočnom citometrijom stanice su združene u jedan uzorak. Udio apoptotičnih stanica određen je vezivanjem aneksina V-FITC i obilježavanjem staničnih jezgara mrtvih stanica propidijevim jodidom (PI). **(A)** Apoptotične su stanice u donjem desnom kvadrantu (označeno debljim brojkama u prikazu postotka stanica u kvadrantima). Pokus je ponovljen tri puta, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati jednoga pokusa; **(B)** Udio apoptotičnih stanica sedmoga, desetoga i četrnaestoga dana tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*. Pokus je ponovljen dva puta, sa sličnim rezultatima, a rezultati su prikazani kao relativni udio apoptotičnih stanica u odnosu na netretirane stanice ( $\pm$  SD rezultata ponovljenih pokusa).

Budući da su osteoblasti adherentne stanice, tijekom tripsinizacije stanica i pripreme za protočnu citometriju moguća su manja oštećenja stanične membrane, koja mogu imati za posljedicu vezivanje aneksina V iako stanica nije apoptotična (283). Dodatno, veća oštećenja mogu čak imati za posljedicu i ulazak PI u stanice, te lažno povećanje udjela mrtvih stanica. Stoga sam, uz opisani postupak vezivanja aneksina V i određivanje udjela apoptotičnih stanica protočnom citometrijom, uzgojila sinovijalne osteoblaste u komoricama za

imunocitokemiju i njihovim bojenjem *in situ* fluorescentnom bojom DAPI provjerila vjerodostojnost nalaza dobivenih protočnom citometrijom (Tablica 2.).

**Tablica 2. Udio apoptotičnih stanica tijekom osteoblastne diferencijacije sinovijalnih mezebnimnih stanica određen na temelju morfologije staničnih jezgara nakon poticanja apoptoze aktivacijskim protutijelom anti-CD95**

Dan stanične kulture*	Tretiranje stanica	% apoptotičnih stanica
7.	Ø	6,8
	anti-CD95 + bjelančevina G	9,9
	izotipsko kontrolno protutijelo + bjelančevina G	6,0
10.	Ø	7,7
	anti-CD95 + bjelančevina G	11,0
	izotipsko kontrolno protutijelo + bjelančevina G	3,8
14.	Ø	11,1
	anti-CD95 + bjelančevina G	9,3
	izotipsko kontrolno protutijelo + bjelančevina G	11,7

\* Za uzgoj osteoblasta stanice su zasijane u komorice za imunocitokemiju s 4 zdenca u gustoći  $0.2 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina. Sedmoga dana kulture, u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. Anti-mišje CD95 protutijelo (Jo2, BD Pharmingen) je dodano osteoblastnim kulturama jednokratno šesti, deveti i trinaesti dan u koncentraciji 1  $\mu$ g/mL uz 1  $\mu$ g/mL bjelančevine G, koja potiče dodatnu trimerizaciju receptora Fas. Za kontrolu specifičnosti indukcije apoptoze stanice su tretirane izotipskim kontrolnim protutijelom i bjelančevinom G u istim uvjetima kao što je opisano za protutijelo anti-CD95. Udio apoptotičnih stanica je određen na temelju morfologije staničnih jezgara obojenih fluorescentnom bojom DAPI, pri čemu su apoptotičnima smatrane stanice s fragmentiranim jezgrama, jezgrama s jasno kondenziranim kromatinom ili kromatinom postavljenim uz rub jezgrene membrane. Analizirano je ukupno 500 staničnih jezgara po preparatu. Pokus je ponovljen tri puta, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog pokusa.

Iz navedenih rezultata (Tablica 2.) može se zaključiti da je udio apoptotičnih osteoblasta određen *in situ*, bez odizanja od podloge, bio manji nego udio apoptotičnih osteoblasta određen protočnom citometrijom. Udio netretiranih stanica koje su imala fragmentirane jezgre u trenutku dodavanja medija koji potiče usmjeravanje stanica prema osteoblastnoj lozi (7. dan stanične kulture) je iznosio 7 %, a dodavanjem protutijela anti-CD95 taj se udio povećao na 10 %. Usmjeravanjem stanica prema zrelim osteoblastima, od 10. do 14. dana stanične kulture, povećavao se broj netretiranih stanica s morfološkim znakovima apoptoze, na 8% 10. dana i 11% 14. dana kulture. Sukladno nalazu protočne citometrije tretiranje protutijelom anti-CD95 nije značajno promijenilo udio stanica s morfološkim znakovima apoptoze 10. dan



stanične kulture (10%) (Slika 4.B), a 14. dan je udio stanica s morfološkim znakovima apoptoze bio za 2 postotna boda manji (9%) u odnosu na netretirane stanice (11%) i stanice tretirane izotipskim kontrolnim protutijelom (12%). Udjeli apoptotičnih stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom i netretiranih stanica nisu se međusobno značajno razlikovali.

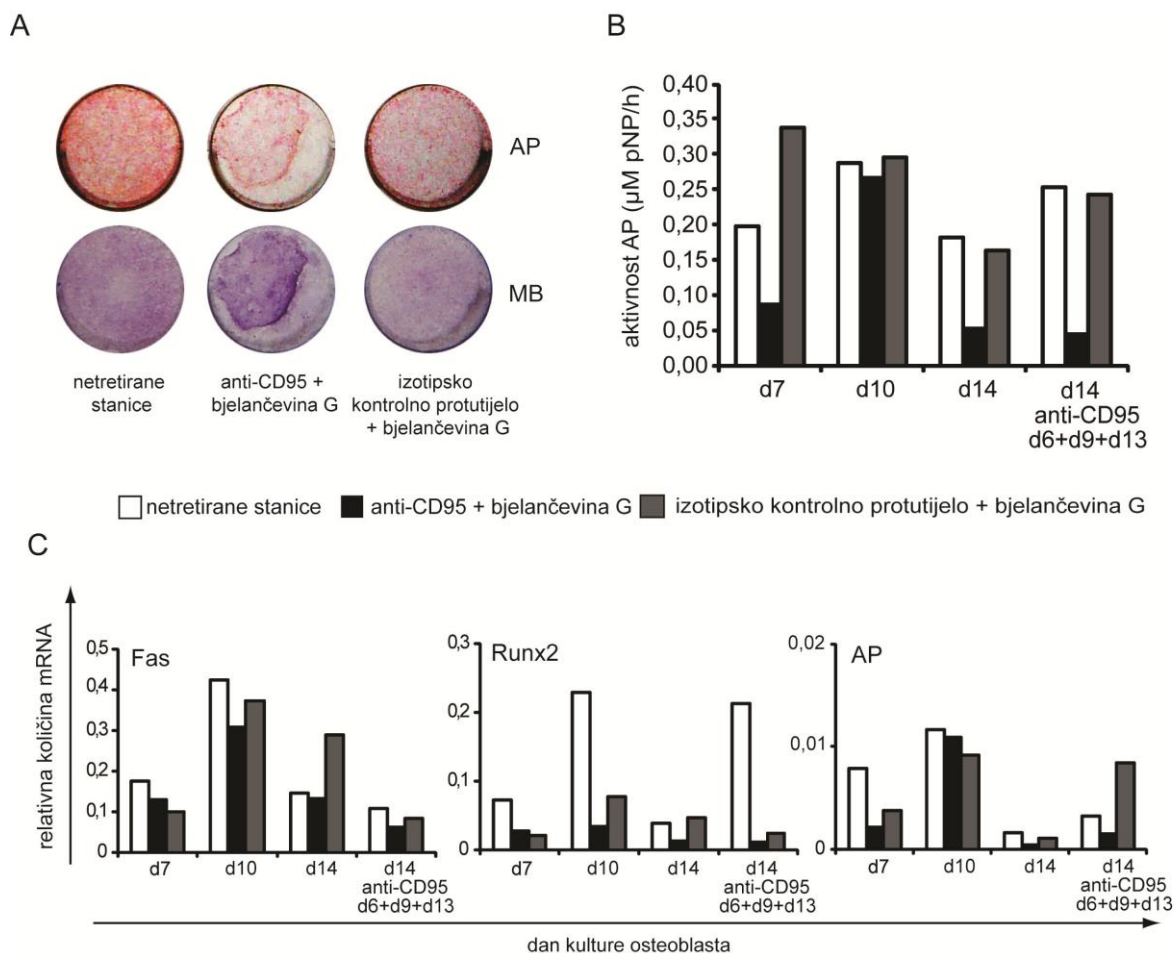
Sve navedeno upućuje da protutijelo anti-Fas može izazvati apoptozu malog broja usmjerenih nezrelih stanica osteoblastne loze.

#### **5.4 Učinak aktivacije receptora Fas na diferencijaciju osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro***

Prethodnim nizom pokusa utvrdila sam da protutijelo anti-CD95 može potaknuti apoptozu malog dijela stanica osteoblastnih kultura podrijetla sinovijalnih prethodnika. Svrha je sljedećeg niza pokusa bila utvrditi može li apoptoza potaknuta protutijelom anti-CD95 smanjiti diferencijaciju i konačan broj zrelih osteoblasta. Stoga sam dodavala protutijelo anti-CD95 u različitim vremenskim točkama tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*.

Dodavanje protutijela anti-CD95 osteoblastnim kulturama podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica smanjilo je površinu obojenu crveno histokemijskim bojenjem enzima AP, dok je povećalo ukupan broj stanica i kolonija fibroblastnih značajki (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*) obojenih metilenskim plavilom (MB, prema engl. *methylene blue*). Najizrazitije smanjenje broja kolonija opazila sam kad je protutijelo anti-CD95 dodano u sve tri vremenske točke (Slika 5.A).

Tretiranje osteoblastnih kultura protutijelom anti-CD95 6. i 13. dan je značajno smanjilo aktivnost AP u lizatima stanica 7. i 14. dana kulture (Slika 5.B), a tretiranje protutijelom anti-CD95 u sve tri vremenske točke je smanjilo na četvrtinu aktivnost AP u lizatu stanica 14. dana kulture (Slika 5.B). Tretiranje protutijelom anti-CD95 9. dana kulture nije izazvalo značajnu promjene aktivnosti AP u staničnom lizatu 10. dana kulture (Slika 5.B).



**Slika 5. Djelovanje anti-mišjeg CD95 protutijela na sazrijevanje osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica.** Sinovijalne mezenhimne stanice su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $0,2 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ -MEM hranjivog medija s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture, u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. Mišje aktivacijsko protutijelo anti-CD95 (Jo2) je dodavano osteoblastnim kulturama jednokratno šesti, deveti i trinaesti dan kulture, ili u sve tri vremenske točke, u koncentraciji 1  $\mu$ g/mL, uz 1  $\mu$ g/mL bjelančevine G, koja potiče dodatnu trimerizaciju receptora Fas. Za kontrolu specifičnosti stanicama je dodano izotipsko kontrolno protutijelo (imunoglobulin G, skupine  $\lambda 2$  armenskoga hrčka) i bjelančevina G u istim uvjetima kao što je navedeno za protutijelo anti-CD95. **(A)** Kolonije stanica osteoblastne loze četrnaestoga dana stanične kulture, histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP; gornje slike), te ukupne stanice i fibroblastne kolonije (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*) u istim zdencima histokemijski obojene plavo metilenskim plavilom (MB, prema engl. *methylene blue*; gornje slike). Promatran je broj kolonija u ukupno 4 zdenca pločice za kulturu s 24 zdenca, a prikazani su reprezentativni zdenci; **(B)** Aktivnost AP u staničnim lizatima tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica određena kolorimetrijskim postupkom. Aktivnost je mjerena iz staničnih lizata dobivenih iz ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. U kolorimetrijskom postupku kao kromogeni supstrat je korišten p-nitrofenil fosfat koji AP pretvara u obojeni p-nitrofenol (pNP), a intenzitet boje očitao pri valnoj duljini 405 nm je proporcionalan aktivnosti enzima. Aktivnost AP je izračunata pomoću jednadžbe pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama p-nitrofenola i izražena kao  $\mu$ M stvorenog pNP na sat; **(C)** Izražaj mRNA za Fas, Runx2 i AP tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*. Stanice za izolaciju RNA su dobivene iz ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. Vrijednosti izražaja su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Stanična kultura, histokemijsko bojanje, određivanje aktivnosti AP i analiza genskog izražaja postupkom qRT-PCR su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a na slici je prikazan jedan od pokusa. Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl. *runt related transcription factor 2*).

Specifičnost ovoga učinka je potvrđena dodavanjem izotipskoga kontrolnoga protutijela osteoblastnim kulturama u istim uvjetima kao i protutijela anti-CD95, te nalazom da njegovo dodavanje nije dovelo do značajne promjene broja osteoblastnih kolonija, niti aktivnosti AP u lizatima stanica u odnosu na netretirane stanice (Slika 5.A, B).

Dodavanje protutijela anti-CD95 nije mijenjalo izražaj gena za Fas tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica (Slika 5.C). Međutim, njegovim dodavanjem 6., 9. i 13. dan te u sve tri vremenske točke je došlo do značajnog smanjenja izražaja gena za Runx2 7., 10. i 14. dana, te smanjenja izražaja gena za AP 7. i 14. dan kulture (Slika 5.C). Dodavanje protutijela anti-CD95 9. dan kulture nije izazvalo značajniju promjenu izražaja gena za AP (Slika 5.C).

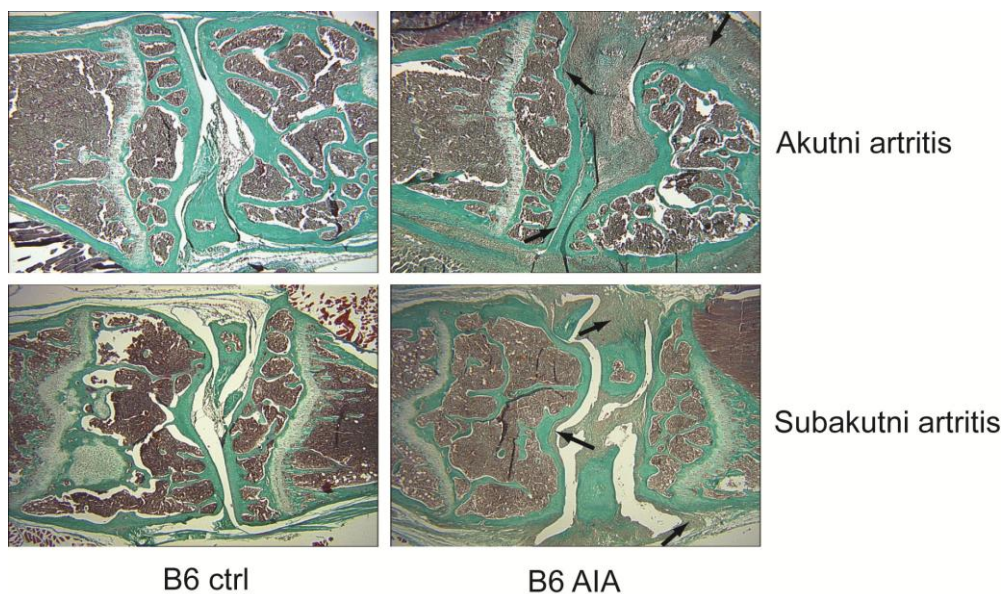
### **5.5 Učinak nedostatnosti receptora Fas na klinički tijek i histološki nalaz oštećenja zgloba tijekom artritisa potaknutog antigenom**

Trideset i petog dana nakon imunizacije miševa s mBSA, odnosno 14 dana nakon intraartikularne injekcije, koljeni zglobovi B6 miševa intraartikularno injiciranih s mBSA su imali statistički značajno veći promjer ( $3,21 \pm 0,18 \text{ mm}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu miševa injiciranih PBS otopinom ( $2,98 \pm 0,13 \text{ mm}$ ,  $p < 0,001$ ; Studentov t-test). U miševa Fas  $-/-$  je taj učinak izostao i nije bilo statistički značajne razlike između promjera koljenih zglobova miševa Fas  $-/-$  intraartikularno injiciranih s mBSA ( $2,97 \pm 0,15 \text{ mm}$ ) i kontrolne skupine miševa Fas  $-/-$  injiciranih PBS otopinom ( $2,87 \pm 0,12 \text{ mm}$ , Slika 7.A).

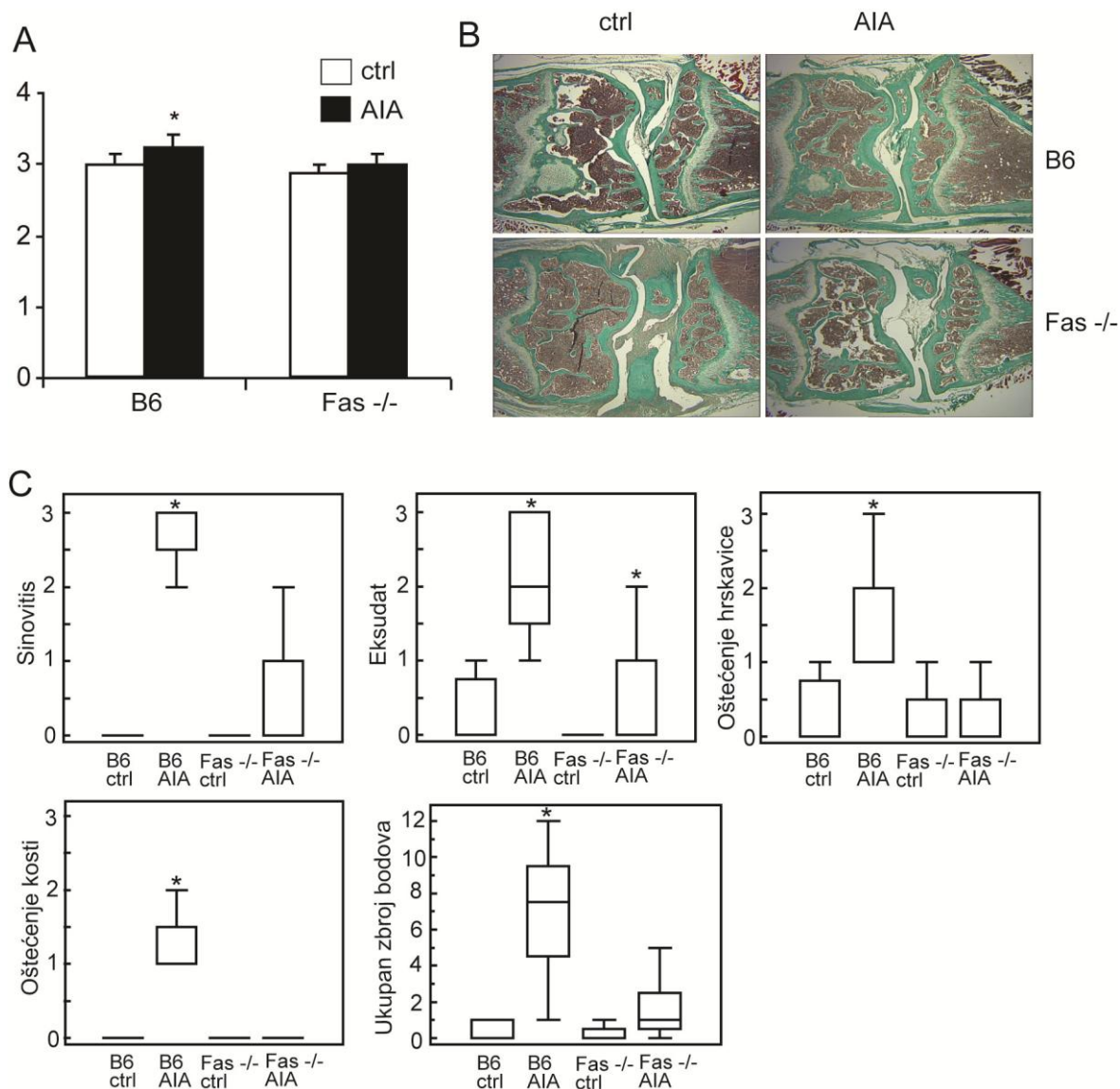
Histološka procjena koljenih zglobova 35 dana nakon imunizacije miševa s mBSA, odnosno 14 dana nakon intraartikularne injekcije, prema kriterijima prikazanima u Tablici 1., pokazala je statistički značajno upalno oštećenje zglobova B6 miševa intraartikularno injiciranih s mBSA u odnosu na kontrolnu skupinu miševa injiciranih PBS otopinom ( $p < 0,001$ ; Studentov t-test, Slika 7.C, Tablica 3). Intenzitet upalnog oštećenja zglobova Fas  $-/-$  miševa je bio podjednak u skupini miševa intraartikularno injiciranih s mBSA i skupini miševa intraartikularno injiciranih PBS otopinom (Slika 7.C, Tablica 3).

## 5.6 Učinak nedostatnosti receptora Fas na jukstaartikularni gubitak kosti u artritisu potaknutom antigenom

Histomorfometrijska analiza distalnih metafiza bedrenih kostiju 35. dan nakon imunizacije miševa s mBSA, odnosno 14 dana nakon intraartikularne injekcije, je pokazala statistički značajno smanjenje koštanog volumena (Slika 8.B), širine (Slika 8.C) i broja (Slika 8.D) koštanih gredica, te povećanje razdvojenosti koštanih gredica (Slika 8.E) u B6 miševa intraartikularno injiciranih s mBSA u odnosu na kontrolnu skupinu miševa injiciranih PBS otopinom ( $p < 0,001$ ; Studentov t-test). Nasuprot tome, koštani parametri se nisu statistički razlikovali između skupine Fas  $-/-$  miševa intraartikularno injiciranih s mBSA i skupine injicirane PBS otopinom. Mikro-kompjutorizirana tomografija distalnih metafiza bedrenih kostiju miševa 35. dan nakon imunizacije miševa s mBSA, odnosno 14 dana nakon intraartikularne injekcije, je pokazala statistički značajno smanjenje koštanog volumena (Slika 9.B) i broja koštanih gredica (Slika 9.D) u B6 miševa intraartikularno injiciranih s mBSA u odnosu na kontrolnu skupinu miševa injiciranih PBS otopinom ( $p < 0,001$ ; Studentov t-test).



**Slika 6. Histološke promjene koljenih zglobova tijekom artritisa potaknutog antigenom u miševa divljeg tipa (B6).** Miševi B6 su žrtvovani 28. (akutni artritis) i 35. (subakutni artritis) dan poslije primarne imunizacije metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 7. i 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA ili PBS otopine. Histološka procjena artritisa je provedena na rezovima debljine 6  $\mu\text{m}$  koljenih zglobova obojanim postupkom Goldner-Masson-trikrom. Lijevi niz slika (B6 ctrl), reprezentativni histološki frontalni rezovi kroz sredinu koljena kontrolnih miševa, injiciranih intraartikularno PBS otopinom; desni niz slika (B6 AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*), reprezentativni histološki frontalni rezovi kroz sredinu koljena miševa s razvijenim artritisom injiciranih intraartikularno s mBSA. Na histološkim rezovima je procijenjivana celularnost sinovije, eksudat u zglobnom prostoru, razaranje hrskavice, te oštećenje subhondralne kosti invazijom panusa (streljice) i bodovana prema skali prikazanoj u Tablici 1.

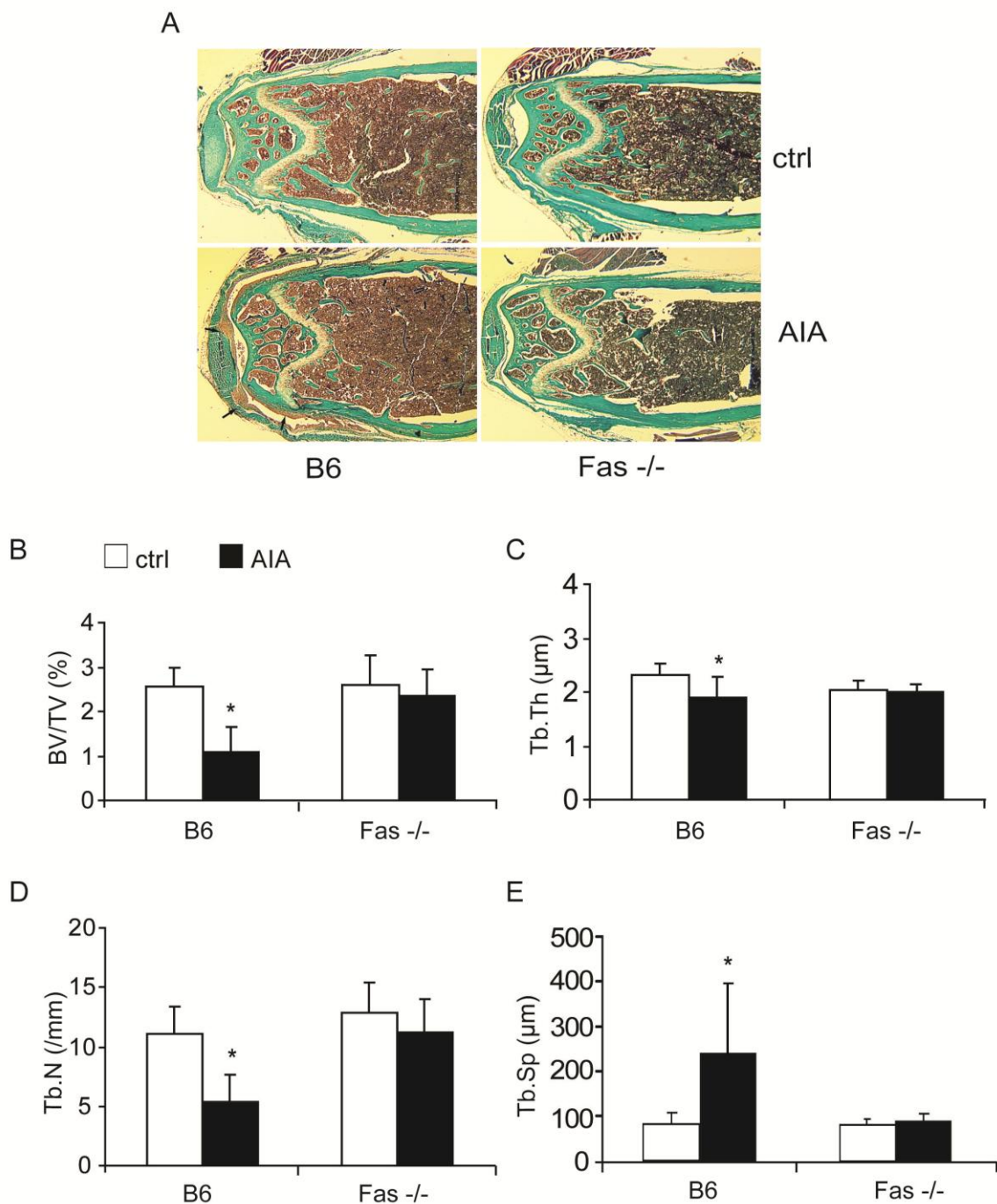


**Slika 7. Klinička i histološka procjena subakutnog artritisa u miševa divljeg tipa (B6) i miševa s izbačenim genom za Fas (Fas -/-).** B6 i Fas -/- miševi su žrtvovani 35. dan poslije primarne imunizacije s metiliranim govedim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili PBS otopine (ctrl). **(A)** Nakon skidanja kože, promjer koljenih zglobova je izmjereno pomičnim mjerilom, pri čemu je svako koljeno mjereno tri puta, a kao rezultat su uzeti njihovi medijani. Najmanji broj miševa po skupini bio je 6. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati jednoga pokusa. Promjer koljena je prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,001$  (Studentov t-test). **(B)** Histološka procjena artritisa je provedena na frontalnim rezovima kroz sredine koljenih zglobova, debljine 6  $\mu$ m, obojanim tehnikom Goldner-Masson-trikrom. Prikazani su reprezentativni histološki rezovi koljenih zglobova B6 i Fas -/- miševa intraartikularno injiciranih s mBSA (AIA) ili PBS otopinom (ctrl). **(C)** Semikvantitativna procjena jačine zglobne upale je napravljena slijepim bodovanjem reza svakog koljenog zgloba miševa injiciranih s mBSA (AIA) i PBS otopinom (ctrl) prema elementima zglobne upale koji uključuju sinovitis, eksudat u zglobnom prostoru, razaranje hrskavice i oštećenje subhondralne kosti, prema skali prikazanoj u Tablici 1. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati jednoga pokusa. Rezultati bodovanja pojedinih kriterija te ukupan zbroj bodova su prikazani kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*; crte predstavljaju najmanju i najveću vrijednost), \* $p < 0,001$ , u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Kruskal-Wallis test, Man-Whitney test s Bonferonijevom korekcijom).

**Tablica 3. Histološka procjena zglobne upale u subakutnom artritisu u miševa divljeg tipa (B6) i miševa s izbačenim genom za Fas (Fas  $-/-$ )**

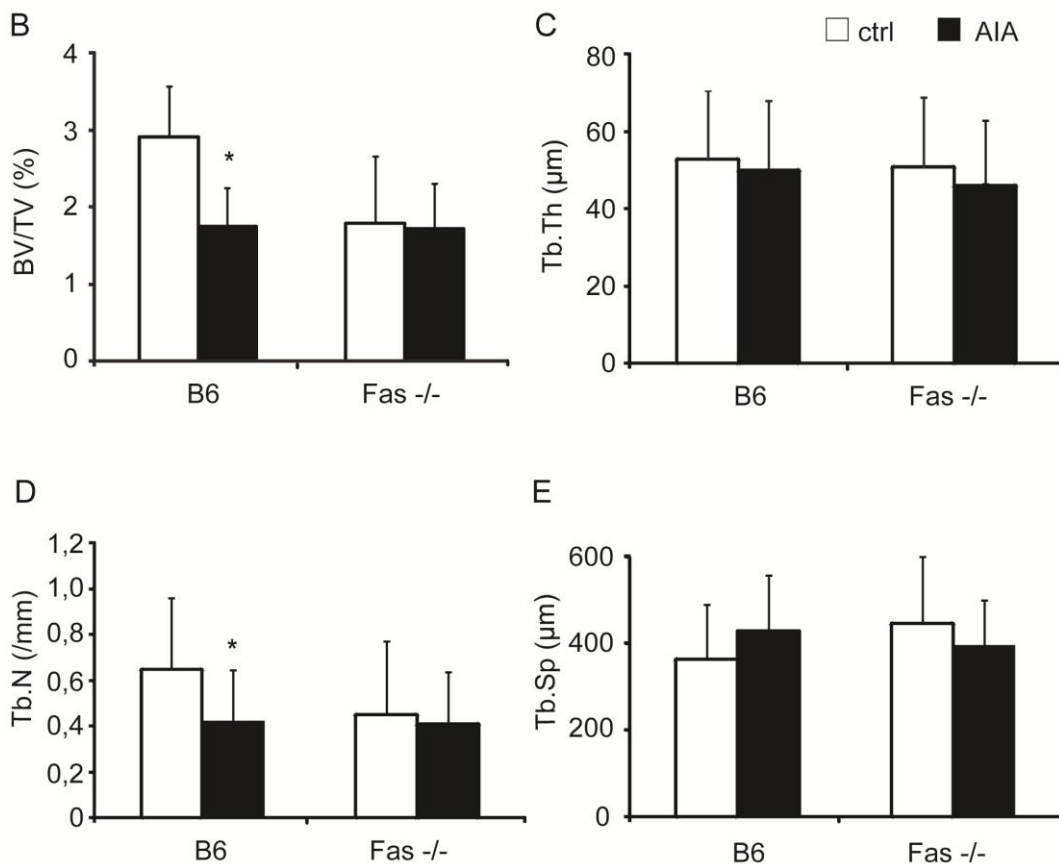
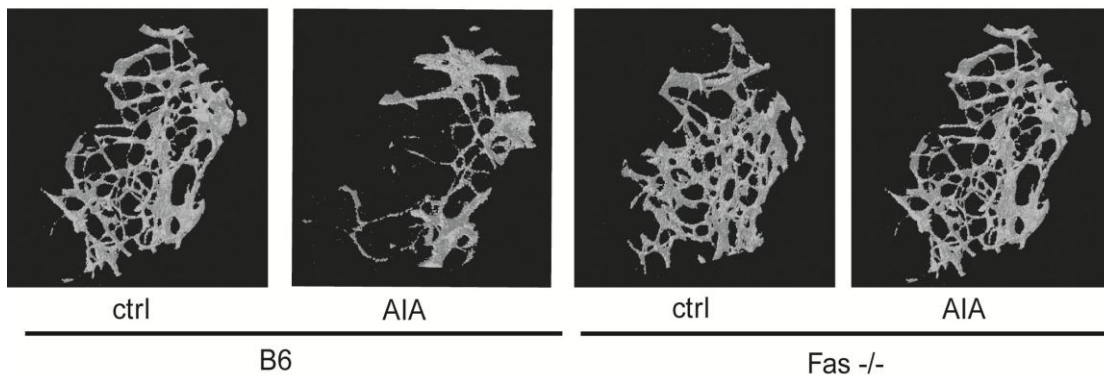
Skupine miševa	Sinovitis	Eksudat u zglobnom prostoru	Razaranje hrskavice	Oštećenje subhondralne kosti	Ukupan zbroj bodova
<b>B6 ctrl</b> (n=7)	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	1
	0	0	1	0	1
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	1
	0	1	0	0	1
Medijan (IQR)	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0,5)</b>	<b>0 (0-0,5)</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>1 (0-1)</b>
<b>B6 AIA</b> (n=7)	3	3	3	3	12
	2	1	1	0	4
	3	3	2	1	9
	2	1	1	1	5
	3	2	1	1	7
	3	3	2	2	10
	3	2	2	1	8
Medijan (IQR)	<b>3 (2,5-3)*</b>	<b>2 (1,5-3)*</b>	<b>2 (1-2)*</b>	<b>1 (1-1,5)*</b>	<b>8 (6-9,5)*</b>
<b>Fas <math>-/-</math> ctrl</b> (n=12)	0	0	1	0	1
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	3	3	2	2	10
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	1
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Medijan (IQR)	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0,25)</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0,25)</b>
<b>Fas <math>-/-</math> AIA</b> (n=12)	1	0	0	0	1
	0	0	0	0	0
	1	2	1	1	5
	0	1	0	0	1
	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	1
	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	1
	2	1	1	0	4
	0	1	0	0	1
	1	1	1	1	4
0	1	0	0	1	
Medijan (IQR)	<b>0 (0-1)</b>	<b>1 (0-1)</b>	<b>0 (0-0,25)</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>1 (0-1,75)</b>

\*Miševi divljeg tipa (B6) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) su žrtvovani 35. dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili PBS otopine (ctrl). Histološka procjena artritisa provedena je na frontalnim rezovima kroz sredine koljenih zglobova, debljine 6  $\mu$ m, obojanim tehnikom Goldner-Masson-trikrom. Semikvantitativna procjena jačine zglobne upale je napravljena slijepim bodovanjem reza svakog koljenog zgloba prema elementima zglobne upale koji uključuju sinovitis, eksudat u zglobnom prostoru, razaranje hrskavice i oštećenje subhondralne kosti, a prema skali prikazanoj u Tablici 1. Prikazano je bodovanje navedenih kriterija te ukupan zbroj bodova za pojedine miševe, a rezultati za pojedine skupine miševa su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon [IQR, prema engl. *interquartile range*]). \* $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney testovi). Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati jednoga pokusa.



**Slika 8. Učinak artritisa potaknutog antigenom na resorpciju jukstaartikularne trabekularne kosti u miševa divljeg tipa (B6) i miševa s izbačenim genom za Fas (Fas -/-).** Miševi B6 i Fas -/- su žrtvovani 35. dan poslije primarne imunizacije metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA ili PBS otopine. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati jednoga pokusa. Histomorfometrijska analiza je provedena na frontalnim rezovima distalnih dijelova bedrenih kostiju debljine 6  $\mu\text{m}$ , obojenim tehnikom Goldner-Masson-trikrom (A), reprezentativni rezovi distalnih dijelova bedrenih kostiju B6 i Fas -/- miševa injiciranih intraartikularno puferom PBS (ctrl) i mBSA (AIA), (B) udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %), (C) širina trabekula (Tb.Th., prema engl. *trabecular thickness*;  $\mu\text{m}$ ), (D) broj trabekula (Tb.N., prema engl. *trabecular number*; /mm), i (E) odvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*;  $\mu\text{m}$ ) miševa intraartikularno injiciranih s mBSA (ctrl) i PBS otopinom (AIA) su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test).

A

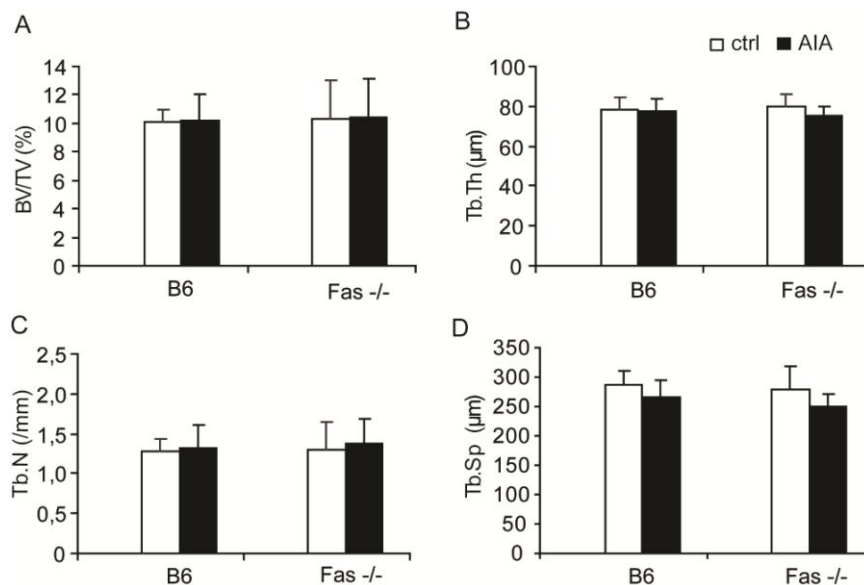


**Slika 9.** Učinak artritisa potaknutog antigenom na resorpciju jukstaartikularne trabekularne kosti analiziran mikro-kompjuteriziranom tomografijom ( $\mu$ CT) distalnih metafiza bedrenih kostiju u miševa divljeg tipa (B6) i miševa s izbačenim genom za Fas (Fas  $-/-$ ). Miševi B6 i Fas  $-/-$  su žrtvovani 35. dan poslije primarne imunizacije metiliranim govedim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili PBS otopine (ctrl). Bedrene kosti su snimljene svakih  $0.7^\circ$  kroz  $360^\circ$  rotacije, pri rezoluciji od  $2 \mu\text{m}$  te uz korištenje aluminijskog filtera debljine  $0.5 \text{ mm}$  i rekonstruirane korištenjem softvera SkyScan Recon. Trodimenzionalna analiza trabekularne kosti je provedena u području kosti koje se nalazi na  $0,1 \text{ mm}$  distalno od ploče rasta. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su kumulativni rezultati sva tri pokusa. (A) Trodimenzionalna rekonstrukcija reprezentativnih uzoraka trabekularne kosti iz distalnih dijelova bedrenih kostiju B6 i Fas  $-/-$  miševa injiciranih intraartikularno PBS otopinom (ctrl) i mBSA (AIA), (B) Udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %), (C) debljina trabekula (Tb.Th., prema engl. *trabecular thickness*;  $\mu\text{m}$ ), (D) broj trabekula (Tb.N., prema engl. *trabecular number*; /mm), i (E) razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*;  $\mu\text{m}$ ) miševa intraartikularno injiciranih s mBSA (AIA) i PBS otopinom (ctrl) su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test).



Opisano smanjenje nije bilo prisutno u Fas  $-/-$  miševa intraartikularno injiciranih s mBSA u usporedbi s miševima injiciranim PBS otopinom (Slika 9.).

Da bih utvrdila štiti li nedostatnost receptora Fas od sustavnog gubitka kosti u artritisu potaknutom antigenom, mikro-kompjutoriziranom tomografijom sam analizirala tijela L2 kralježaka B6 i Fas  $-/-$  miševa žrtvovanih 35 dana nakon imunizacije s mBSA, odnosno 14 dana nakon intraartikularne injekcije s mBSA ili PBS otopinom. Volumen trabekularne kosti, broj, širina i razdvojenost koštanih gredica se nisu značajno razlikovali između testiranih skupina miševa (Slika 10.), što ukazuje da subakutna faza artritisa potaknutog antigenom nema za posljedicu sustavni gubitak kosti. Sustavni gubitak kosti u subakutnoj fazi artritisa ne pojavljuje se ni kao posljedica imunizacije miševa s mBSA, što sam potvrdila usporedbom varijabli gustoće trabekularne kosti pokusnih skupina miševa s kontrolnom skupinom neimuniziranih B6 miševa iz istoga legla, i pokazala da neimunizirani miševi imaju podjednake vrijednosti volumena trabekularne kosti ( $13,40 \pm 2,01\%$  u neimuniziranih miševa usporedno s  $10,77 \pm 2,08\%$  u imuniziranih B6 miševa), broja ( $1,60 \pm 0,17/\text{mm}$  usporedno s  $1,38 \pm 0,25/\text{mm}$ ), širine ( $83,28 \pm 6,76 \mu\text{m}$  usporedno s  $77,72 \pm 3,52 \mu\text{m}$ ) i razdvojenosti koštanih gredica ( $247,90 \pm 10,89 \mu\text{m}$  usporedno s  $261,92 \pm 27,72 \mu\text{m}$ ) kao i pokusne skupine.



**Slika 10. Učinak artritisa potaknutog antigenom na sustavnu resorpciju kosti analiziran mikro-kompjuteriziranom tomografijom ( $\mu\text{CT}$ ) tijela drugog lumbalnog (L2) kralješka u miševa divljeg tipa (B6) i miševa s izbačenim genom za Fas (Fas  $-/-$ ).** Miševi B6 i Fas  $-/-$  su žrtvovani 35. dan poslije primarne imunizacije metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA), odnosno 14. dan nakon intraartikularne injekcije mBSA (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili PBS otopine (ctrl). Kosti su snimljene na svakih  $0,5^\circ$  kroz  $180^\circ$  rotacije, pri rezoluciji od  $9 \mu\text{m}$  te uz korištenje aluminijskog filtera debljine  $0,5 \text{ mm}$ . Trodimenzionalna analiza trabekularne kosti je provedena u središnjem dijelu L2 kralješka. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati jednog pokusa. (A) Udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %), (B) debljina trabekula (Tb.Th., prema engl. *trabecular thickness*;  $\mu\text{m}$ ), (C) broj trabekula (Tb.N., prema engl. *trabecular number*; /mm), i (D) razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*;  $\mu\text{m}$ ) miševa intraartikularno injiciranih s mBSA (AIA) i PBS otopinom (ctrl) su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test).

## **5.7 Učinak zglobne upale na diferencijaciju osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica i stanica koštane srži u miševa B6 i Fas –/–**

S obzirom da se zna da aktivacija receptora Fas, uz ograničeni apoptotični učinak, koči diferencijaciju osteoblasta (243), izgledno je da bi ligand Fas izražen na aktiviranim limfocitima T u zglobovima zahvaćenim artritisom mogao zakočiti diferencijaciju stanica osteoblastne loze, te tako doprinijeti gubitku kosti.

Stoga sam analizirala lokalni učinak zglobne upale na diferencijaciju osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, te učinak bolesti na diferencijaciju osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži zglobu priležeće kosti, u miševa divljega tipa i Fas –/– miševa.

Sinovijalne mezenhimne stanice koljenih zglobova miševa divljeg tipa intraartikularno injiciranih s mBSA, 14. dan kulture su stvorile više osteoblastnih kolonija histokemijski obojenih na AP (Slika 11.A), koje su pokazivale i statistički značajno veću površinu obojenu crveno histokemijskim bojenjem enzima AP (Slika 11.B) u odnosu na miševe intraartikularno injicirane s PBS otopinom. Nasuprot tome, skupine Fas –/– miševa intraartikularno injicirane s mBSA i PBS otopinom, 14. dana kulture se nisu razlikovale u broju osteoblastnih kolonija niti u intenzitetu bojanja AP (Slika 11.A,B).

Nadalje, aktivnost AP u kulturi osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica u obje skupine miševa divljega tipa bila je najveća 7. dana kulture i postupno se smanjivala tijekom 14 dana kulture osteoblasta. U skupini miševa divljeg tipa intraartikularno injiciranih s mBSA 7., 10. i 14. dan kulture aktivnost AP je bila dvostruko veća, nego u miševa injiciranih PBS otopinom (Slika 11.C). Aktivnost AP u kulturi osteoblasta Fas –/– miševa je bila najveća 10. dana kulture, no niti u jednoj vremenskoj točki nije bilo značajne razlike između skupina miševa injiciranih s mBSA ili PBS otopinom (Slika 11.C).

Izražaj gena specifičnih za osteoblaste tijekom kulture osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica sam analizirala postupkom qRT-PCR. U odnosu na osteoblaste miševa divljega tipa injiciranih puferom PBS, u kojima se rani biljeg osteoblasta, transkripcijski čimbenik Runx2, počeo pojavljivati usmjeravanjem stanica dodavanjem diferencijacijskog medija za osteoblaste 7. dan kulture i potom rastao do 14. dana kulture, Runx2 je bio izražen već i u neusmjernim sinovijalnim mezenhimnim stanicama iz zglobova miševa intraartikularno injiciranih s mBSA, a kasnije se njegov izražaj nije razlikovao od onoga u miševa injiciranih PBS otopinom. U Fas –/– miševa intraartikularno injiciranih s mBSA,

izražaj gena za Runx2 je 7. i 14. dan kulture bio značajno viši u odnosu na miševе injicirane PBS otopinom (Slika 11.D).

Izražaj gena za AP bio je najveći tijekom početnog usmjeravanja stanica osteoblastne loze, odnosno 7. dan kulture osteoblasta u obje skupine miševa, a potom se smanjivao do 14. dana kulture na vrijednosti slične onima u neusmjerenih sinovijalnih mezenhimnih stanica. U miševa intraartikularno injiciranih s mBSA, porast izražaja AP 7. dana kulture je bio značajno veći u Fas  $-/-$  miševa, a 10. dana kulture je bio veći u miševa divljega tipa, u odnosu na miševе injicirane PBS otopinom (Slika 11.D).

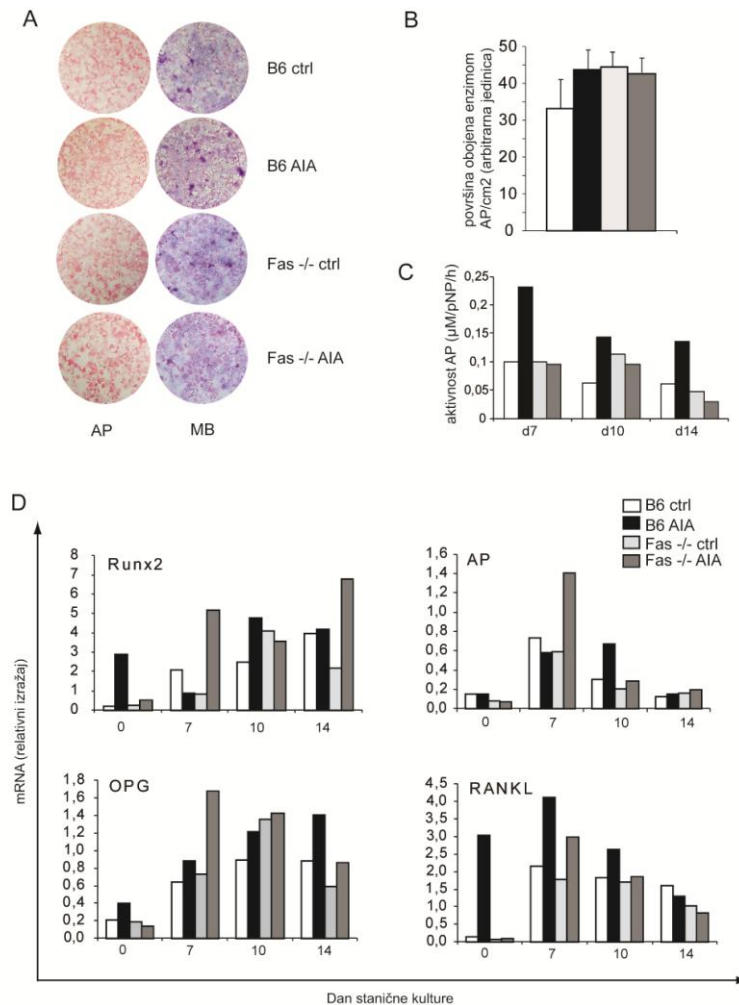
Biljeg zrelih osteoblasta, OPG, u miševa divljega tipa je postupno rastao do 10. dana kulture osteoblasta i potom se održavao na toj razini i u zrelim osteoblastima 14. dan kulture, te se nije razlikovao u skupinama miševa injiciranim s mBSA ili PBS otopinom (Slika 11.D).

U Fas  $-/-$  miševa injiciranih s mBSA, izražaj gena za OPG 7. dana kulture je bio značajno veći u odnosu na miševе injicirane PBS otopinom, dok u ostalim vremenskim točkama nije bilo razlike u izražaju gena za OPG među skupinama, te je izražaj bio sličan onome u miševa divljega tipa (Slika 11.D).

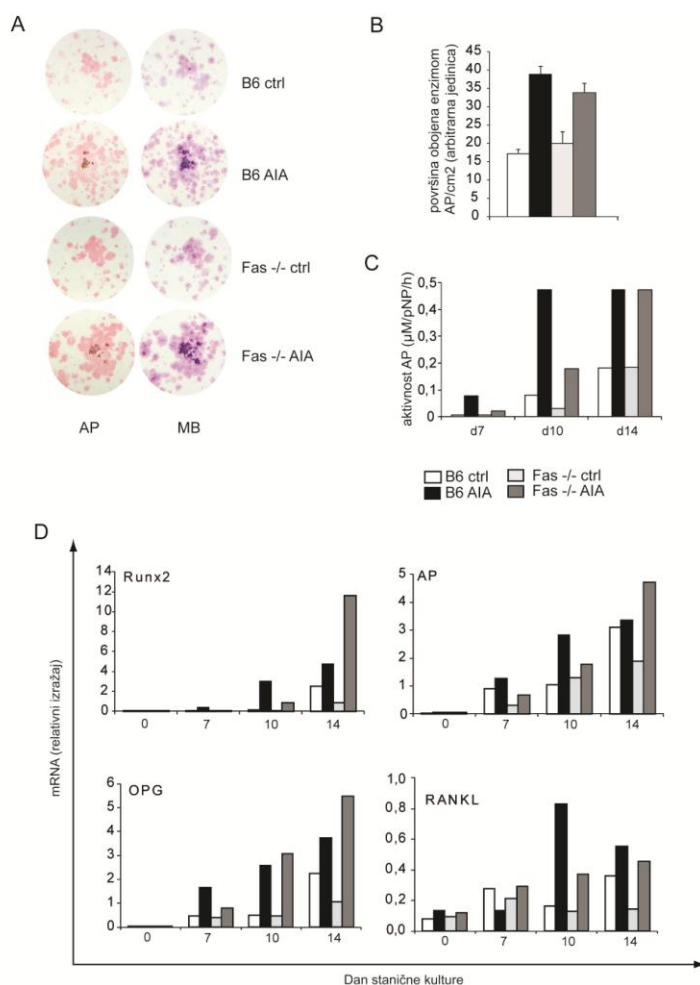
RANKL je bio vrlo slabo izražen u neusmjerenim sinovijalnim mezenhimnim stanicama u miševa divljega tipa i Fas  $-/-$  miševa injiciranih PBS otopinom, rastao je prvih sedam dana kulture, te se potom održavao na toj razini i u zrelim osteoblastima. U miševa divljega tipa injiciranih s mBSA je došlo do značajnoga porasta izražaja gena za RANKL u neusmjerenim sinovijalnim mezenhimnim stanicama i 7. dana kulture osteoblasta, dok je porast izostao u Fas  $-/-$  miševa injiciranih s mBSA (Slika 11.D).

Kako bih istražila učinak upale na osteoblastogenetski potencijal koštane srži priležeće kosti, promatrala sam osteoblastnu diferencijaciju mezenhimnih stanica koštane srži mišjih bedrenih kostiju.

Osteoblastnom diferencijacijom stanica koštane srži miševa divljega tipa i miševa Fas  $-/-$  intraartikularno injiciranih s mBSA, 14. dana kulture u obje skupine je stvoreno više osteoblastnih kolonija histokemijski obojenih na AP (Slika 12.A,B), koje su pokazivale i statistički značajno veću površinu bojanja AP (Slika 12.A,B) u odnosu na miševе intraartikularno injicirane s PBS otopinom. Aktivnost AP u osteoblastnim kulturama stanica koštane srži je postupno rasla tijekom 14 dana kulture, te je 7. i 10. dan u kulturama miševa divljega tipa i Fas  $-/-$  miševa intraartikularno injiciranih s mBSA aktivnost AP bila peterostruko veća nego u skupinama miševa injiciranih PBS otopinom. Aktivnost AP je bila dvostruko veća u obje skupine miševa divljega tipa i u odnosu na u Fas  $-/-$  miševе. Četrnaestoga dana kulture osteoblasta aktivnost AP je bila podjednaka u obje skupine miševa



**Slika 11. Učinak artritisa potaknutog antigenom na *in vitro* osteoblastnu diferencijaciju sinovijalnih mezenhimnih prethodnika u miševa B6 i Fas<sup>-/-</sup>.** Sinovijalne mezenhimne stanice su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $0,2 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ -MEM hranjivog medija s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina. Sedmoga dana kulture u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata i potom mijenjan svaki drugi dan. (A) Kolonije stanica osteoblastne loze četrnaestoga dana stanične kulture, histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP), te ukupne stanice i fibroblastne kolonije (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*) u istim zdencima histokemijski obojene plavo metilenskim plavilom (MB, prema engl. *methylene blue*; gornje slike). Promatran je broj kolonija u ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca, a prikazani su reprezentativni zdenci. (B) Intenzitet bojanja AP je izmjeren u 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca u kulturi osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica te prikazan kao aritmetička sredina  $\pm$  SD. (C) Aktivnost AP u staničnim lizatima tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica određena kolorimetrijskim postupkom. Aktivnost je mjerena iz staničnih lizata dobivenih iz ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. U kolorimetrijskom postupku kao kromogeni supstrat je korišten p-nitrofenil fosfat koji AP pretvara u obojeni p-nitrofenol (pNP), a intenzitet boje očitani pri valnoj duljini 405 nm je proporcionalan aktivnosti enzima. Aktivnost AP je izračunata pomoću jednadžbe pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama p-nitrofenola i izražena kao  $\mu$ M stvorenog pNP na sat; (D) Izražaj mRNA za Runx2, AP, OPG i RANKL tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz sinovijalnih mezenhimnih stanica. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. Vrijednosti izražaja su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Stanična kultura, histokemijsko bojanje, određivanje intenziteta bojanja AP, određivanje aktivnosti AP i analiza genskog izražaja postupkom qRT-PCR su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a na slici je prikazan jedan od pokusa. Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl. *runt related transcription factor 2*); OPG, osteoprotegerin; RANKL, ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa$ B (prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*).



**Slika 12. Učinak artritisa potaknutog antigenom na *in vitro* diferencijaciju osteoblasta iz mezenhimnih stanica koštane srži u miševa B6 i Fas<sup>-/-</sup>.** Stanice koštane srži su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $1 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ -MEM hranjivog medija s 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog govedeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. **(A)** Kolonije stanica osteoblastne loze podrijetlom iz stanica koštane srži četrnaestoga dana stanične kulture, histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP), te ukupne stanice i fibroblastne kolonije (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*) u istim zdencima histokemijski obojene plavo metilenskim plavilom (MB, prema engl. *methylene blue*; gornje slike). Promatran je broj kolonija u ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca, a prikazani su reprezentativni zdenci; **(B)** Intenzitet bojanja AP izmjeren u 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca u kulturi osteoblasta podrijetlom iz stanica koštane srži te prikazan kao aritmetička sredina  $\pm$  SD. **(C)** Aktivnost AP u staničnim lizatima tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz stanica koštane srži određena kolorimetrijskim postupkom. Aktivnost je mjerena iz staničnih lizata dobivenih iz ukupno 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. U kolorimetrijskom postupku kao kromogeni supstrat korišten je p-nitrofenil fosfat kojeg AP pretvara u obojeni p-nitrofenol (pNP), a intenzitet boje očitani pri valnoj duljini 405 nm je proporcionalan aktivnosti enzima. Aktivnost AP je izračunata pomoću jednadžbe pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama p-nitrofenola i izražena kao  $\mu$ M stvorenog pNP na sat; **(D)** Izražaj mRNA za Runx2, AP, OPG i RANKL tijekom sazrijevanja osteoblasta podrijetlom iz stanica koštane srži. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 6 zdenaca pločice za kulturu s 24 zdenca. Vrijednosti izražaja dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Stanična kultura, histokemijsko bojanje, određivanje intenziteta bojanja AP, određivanje aktivnosti AP i analiza genskog izražaja postupkom qRT-PCR su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a na slici je prikazan jedan od pokusa. Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl.  *runt related transcription factor 2*); OPG, osteoprotegerin; RANKL, ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa$ B (prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*).

intraartikularno injicirane s mBSA, te dvostruko veća u odnosu na miševe injicirane PBS otopinom (Slika 12.C).

Izražaj gena specifičnih za osteoblaste tijekom osteoblastne diferencijacije stanica koštane srži je također analiziran metodom qRT-PCR. U odnosu na osteoblaste miševa divljega tipa i Fas  $-/-$  miševe injicirane PBS otopinom, u kojima se Runx2 počeo pojavljivati tek 14. dana kulture, u obje supine miševa injiciranih s mBSA Runx2 se počinje pojavljivati 10. dana kulture, a 14. je dana značajno viši u odnosu na miševe injicirane PBS otopinom (Slika 12.D). Izražaj gena za AP u kulturi osteoblasta koštane srži se povećavao tijekom diferencijacije osteoblasta i u svih skupina je bio najjače izražen 14. dana kulture. U miševa injiciranih s mBSA, AP je bila jače izražena 10. dana kulture u miševa divljega tipa, te 14. dana u Fas  $-/-$  miševa, u odnosu na miševe injicirane PBS otopinom (Slika 12.D).

Biljeg zrelih osteoblasta, OPG, je također rastao s osteoblastnom diferencijacijom stanica koštane srži, a u miševa injiciranih s mBSA, OPG je bio jače izražen 7. i 10. dana kulture u miševa divljega tipa, te 10. i 14. dana u Fas  $-/-$  miševa, u odnosu na miševe injicirane PBS otopinom (Slika 12.D).

Izražaj gena za RANKL u neusmjerenim i nezrelim stanicama osteoblastne loze se nije značano razlikovao među skupinama, dok je u obje skupine miševa injicirane s mBSA RANKL bio jače izražen 10. dan kulture, a u Fas  $-/-$  miševa i 14. dan kulture, u odnosu na miševe injicirane PBS otopinom (Slika 12.D).

## 6. RASPRAVA

### 6.1 Uloga sustava Fas/ligand Fas u osteoblasta sinovijalnoga podrijetla

#### 6.1.1 Sinovijalne mezenhimne stanice diferenciraju u zrele osteoblaste

Mezenhimne matične stanice su posebna vrsta matičnih stanica, a glavna im je značajka sposobnost diferencijacije u stanice mezenhimnih tkiva, uključujući kost, hrskavicu, masno tkivo i mišić. Prisutnost mezenhimnih matičnih stanica dokazana je u različitim tkivima, poput koštane srži (284, 285), masnog tkiva (286), periferne krvi (287), pupkovine (288), hrskavice (289) i sinovije (290). De Bari i suradnici (290) su pokazali da ljudske sinovijalne mezenhimne stanice također imaju osteoblastogenetski, hondrogenetski, adipogenetski i miogenetski potencijal *in vitro*, a Sakaguchi i suradnici su (291), uspoređujući osobine ljudskih mezenhimnih stromalnih stanica podrijetla sinovije, koštane srži, periosta i masnoga tkiva, pokazali da sinovijalne mezenhimne stanice *in vitro* imaju najveći osteoblastogeni, adipogeni, a posebno hondrogeni diferencijacijski potencijal.

Sinovijalne mezenhimne matične stanice su prisutne u zdravoj sinoviji, a broj im se povećava nakon ozljede zgloba i u upali (52). S obzirom da tada dolazi i do pojačane angiogeneze, smatra se da mezenhimne stanice u sinoviju mogu dospijevati iz koštane srži putem krvi, odnosno krvih žila (52). Također, mezenhimne stanice mogu iz koštane srži dospjeti u sinoviju i kanalima koji je povezuju s intraartikularnim prostorom, a koji se tijekom upale u RA proširuju zbog oštećenja zglobnih struktura (292). Kurth i suradnici su (293) prvi puta *in vivo* potvrdili postojanje stalno prisutnih stanica pozitivnih na biljege karakteristične za mezenhimne stromalne stanice u sinoviji mišjeg koljenog zgloba, koje proliferiraju i diferenciraju u hondroblaste nakon ozljede zgloba, a pokazano je da ne pripadaju hematopoetskim i endotelijalnim stromalnim stanicama, kao ni pericitima.

Uloga mezenhimnih stanica u zglobu može biti povezana s njihovom sposobnošću obnavljanja zglobnih mezenhimnih tkiva u slučaju ozljede ili patoloških stanja, uključujući i reumatoidni artritis (292). Iako mezenhimne stanice imaju imunosupresivnu ulogu (11), pokazano je da se ta sposobnost gubi pod utjecajem citokina poput TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , a mezenhimne stanice pojačano izražavaju MHC II, te potiču nakupljanje upalnih stanica u zglobu (294).

Kako bih proučila ulogu sustava Fas/ligand Fas i zglobne upale u mišjem modelu AIA na diferencijaciju osteoblasta sinovijalnog podrijetla, prvo sam istražila mogu li primarne mišje sinovijalne mezenhimne stanice diferencirati u zrele osteoblaste. Pritom sam analizirala njihovu diferencijaciju histokemijskim bojanjem osteoblastnih kolonija na temelju aktivnosti enzima AP, određivanjem aktivnosti AP u staničnim lizatima te analizom izražaja gena specifičnih za osteoblaste tijekom osteoblastne kulture. Rezultati moga istraživanja su potvrdili prisutnost osteoblastnih prethodnika u sinoviji, što je pokazano postupnim povećavanjem broja osteoblastnih kolonija tijekom četrnaest dana kulture, stapanjem kolonija i stvaranjem konfluentnog sloja stanica histokemijski pozitivnih na AP četrnaesti dan kulture te trostrukim porastom aktivnosti AP 10. dana kulture, u odnosu na 7. dan. Specifičnost osteoblastne diferencijacije je potvrđena nalazom izražaja gena za Runx2, AP, OPG i RANKL u sinovijalnim osteoblastnim kulturama.

Međutim, usporedbom uzorka izražaja gena specifičnih za osteoblaste u sinovijalnim mezenhimnim stanicama s uzorkom karakterističnim za osteoblaste podrijetla koštane srži koji su pokazali Kovačić i suradnici (243), moguće je zaključiti da se sinovijalne mezenhimne stanice brže diferenciraju. Naime, dok osteoblasti koštane srži bilježe najveći porast izražaja gena za Runx2, RANKL, OPG i AP desetoga dana kulture, osteoblasti sinovijalnoga podrijetla sličan porast bilježe već sedmoga dana. Ovome zaključku u prilog govori i konfluentni sloj osteoblastnih kolonija sinovijalnoga podrijetla četrnestoga dana kulture, dok je za osteoblaste koštane srži četrnaestoga dan uobičajen nalaz pojedinačnih i tek mjestimice konfluirajućih kolonija. Međutim, iako su kolonije sinovijalnih osteoblasta bile konfluentne, niti u jednom pokusu nisam pronašla mineralizirane kolonije četrnaestoga dana kulture, što je uobičajen nalaz za osteoblaste podrijetla koštane srži.

Zaključno, nalazi moga istraživanja pokazuju da, u odnosu na mezenhimne stanice koštane srži, sinovijalne mezenhimne stanice brže proliferiraju i postaju konfluentne, a time je ubrzana i njihova diferencijacija. Međutim, njihovo krajnje sazrijevanje je otežano, te ostvaruju slabiju mineralizaciju nego zreli osteoblasti podrijetlom iz koštane srži.

Nalaz slabije mineralizacije mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica je u skladu s istraživanjem koje su proveli Djouad i suradnici (295) u kojem su, uspoređujući njihove transkripcijske profile gena za CII, agrekan, AP i OC, pronašli smanjeni osteogeni potencijal ljudskih sinovijalnih mezenhimnih stanica u odnosu na mezenhimne stromalne stanice koštane srži. S druge strane, rezultati slabijeg osteogenetskog potencijala sinovijalnih mezenhimnih stanica su u suprotnosti s nalazom veće multipotentnosti sinovijalnih mezenhimnih stanica u odnosu na mezenhimne stanice drugih tkiva koju su pokazali



Sakaguchi i suradnici (291), no razlike dobivene u ovakvim usporedbama se mogu objasniti različitim fenotipom stanica u uzorcima, različitom količinom mezenhimnih stromalnih stanica u sinoviji u odnosu na koštanu srž, ili učinkom različitih mikrookoliša kojima su stanice bile izložene (295).

### **6.1.2 Receptor Fas je slabo izražen na stanicama osteoblastne loze podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica**

Kako bih proučila izražaj receptora Fas na stanicama osteoblastne loze podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, koristila sam protočnu citometriju i metodu imunocitokemijskog bojanja, koje su mi pružile uvid u izražaj receptora Fas na razini bjelančevine, te izolaciju RNA i analizu genske (transkripcijske) razine izražaja receptora Fas pomoću postupka qRT-PCR. U provedenim pokusima sam dokazala izražaj receptora Fas na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, a uzorak izražaja na genskoj razini odgovarao je uzorku izražaja na razini bjelančevine. Receptor Fas je bio slabo izražen na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, a udio stanica koje izražavaju receptor Fas se mijenjao sukladno diferencijaciji osteoblasta. Izražaj receptora Fas je rastao do sedmoga dana kulture, te se nije značajnije mijenjao u zrelih osteoblasta.

Izražaj receptora Fas na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su dokazala prisutnost receptora Fas na stanicama osteoblastne loze i njegovu ulogu u apoptozi osteoblasta, ali koja se međusobno razlikuju u nalazu razine izražaja receptora Fas u različitim stadijima diferencijacije osteoblasta. Kawakami i suradnici (241) su protočnom citometrijom pokazali jak konstitutivni izražaj receptora Fas na većini stanica ljudske osteosarkomske linije MG63, kao i na primarnim ljudskim osteoblastima, dok je Bu sa suradnicima (229) metodom hibridizacije pomoću cDNA proba pokazao slab izražaj gena za Fas na istoj ljudskoj osteosarkomskoj liniji (MG63) i na zrelim ljudskim osteoblastima dobivenim uzgojem ljudskih mezenhimskih matičnih stanica *in vitro*. Također, Hatakeyama i suradnici (232) su imunohistokemijski pokazali izražaj receptora Fas na fetalnim ljudskim osteoblastima *in vivo*. S druge strane, na mišjoj osteoblastnoj liniji MC3T3 Ozeki i suradnici (236) u bazalnim uvjetima nisu pronašli receptor Fas, ali je njegov izražaj bilo moguće potaknuti dodavanjem proupalnih citokina. Osim toga, u primarnim kulturama mišjih osteoblasta razvrstanih prema različitim stupnjevima zrelosti, Kalajzić i suradnici (296) su, analizom genskog izražaja tehnikom genskog čipa, pronašli slab

izražaj gena za Fas. Također, Kovačić i suradnici (243) su pokazali protočnom citometrijom i analizom genskog izražaja vrlo slab izražaj receptora Fas tijekom ranih stadija diferencijacije primarnih mišjih osteoblasta, te porast izražaja receptora Fas s njihovom diferencijacijom.

U suprotnosti s ovim nalazima je nalaz Leprija i suradnika (297) koji su protočnom citometrijom pokazali izražaj receptora Fas na stromalnim staničnim linijama uzgojenim iz mišje koštane srži, a Wieczorek i suradnici (298) su pronašli jak izražaj receptora Fas tehnikom genskog mikročipa u primarnim stromalnim staničnim linijama uzgojenim iz mišje koštane srži. Odudaranje rezultata istraživanja provedenih na stromalnim linijama objašnjivo je njihovim dugotrajnim subkultiviranjem koje postupno dovodi do sve većih razlika u odnosu na stanice nativne koštane srži te nezrele stanice osteoblastne loze (299).

Općenito slab izražaj receptora Fas na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica u mom istraživanju, kojega niti u jednoj vremenskoj točki nisam pronašla na više od 17% stanica, metodološki je usporediv s istraživanjem Kovačić i suradnika (243), a rezultati odgovaraju slabom izražaju receptora Fas na osteoblastima podrijetla mezenhimnih stanica koštane srži koji je izražen na najviše 30% zrelih mišjih primarnih osteoblasta, dok se uzorak porasta izražaja receptora Fas djelomično razlikuje.

Pri tome, nalaz vrlo niskog izražaja gena za receptor Fas u neusmjerenim sinovijalnim mezenhimnim stanicama se razlikuje od relativno višeg genskog izražaja receptora Fas u stanicama pune koštane srži, praćenoga udjelom od 30% stanica koštane srži koje izražavaju Fas na razini bjelančevine (243). Ovaj nalaz je očekivan jer, dok u stanicama pune koštane srži većem izražaju receptora Fas doprinose dominantno prisutne stanice eritroidne, granulocitne, monocitne i limfoidne loze za koje se zna da izražavaju Fas (139, 300, 301), među stanicama dobivenim izolacijom kolagenazom iz zdrave sinovije je znatno manji udio stanica hematopoetske loze koje bi doprinijele većem izražaju receptora Fas (302). Već četvrtoga dana kulture, nalaz 2,5% do 6% nezrelih osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica koji izražavaju Fas odgovara udjelu stanica manjem od 5% koje izražavaju Fas na nezrelim osteoblastima iz koštane srži četvrtoga i sedmoga dana kulture osteoblasta (243), kada dolazi do postupnog odumiranja stanica ostalih loza prisutnih u punoj koštanoj srži.

Sedmoga dana kulture osteoblasta dolazi do nagloga porasta izražaja receptora Fas u osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, dok u osteoblastima iz koštane srži dolazi do sličnog porasta tek devetoga dana kulture (243). Ova razlika također ne čudi s obzirom da se izražaj receptora Fas mijenja sukladno s diferencijacijom osteoblasta, a usporedbom izražaja gena specifičnih za osteoblaste tijekom diferencijacije možemo

zaključiti da se osteoblasti podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica diferenciraju brže nego osteoblasti iz stanica koštane srži (243), pa je očekivan i raniji porast izražaja receptora Fas.

Uzimajući u obzir da je izražaj receptora Fas na osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica bio vrlo nizak te niti u jednom trenutku nije bio izražen na više od 17% stanica, apoptoza posredovana sustavom Fas/ligand Fas može imati djelomičnu, ali sigurno ne i jedinu ulogu u uklanjanju osteoblasta, te posljedičnom mogućem smanjenju izgradnje kosti kao mehanizmu gubitka subhondralne i i jukstaartikularne kosti tijekom zglobove upale.

### **6.1.3 Aktivacija receptora Fas izaziva apoptozu maloga broja osteoblasta podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro***

Tijekom osteoblastne diferencijacije sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro*, protočnom citometrijom sam pronašla značajan udio apoptotičnih stanica u svim fazama diferencijacije, i to 10% apoptotičnih stanica sedmog dana kulture u trenutku dodavanja medija koji potiče sazrijevanje osteoblasta, te 20% do 30% apoptotičnih stanica desetog i četrnaestog dana kulture. Tretiranje aktivacijskim anti-Fas protutijelom je dovelo do dvostrukog povećanja udjela apoptotičnih stanica sedmog dana kulture, na 18%, a desetog i četrnaestog dana stanične kulture, udio apoptotičnih stanica određenih protočnom citometrijom nije se značajno mijenjao dodavanjem aktivacijskog protutijela anti-Fas.

Tijekom uzgoja stanica *in vitro*, apoptoza je normalna pojava i jedini je mehanizam kojim uzgajane stanice mogu odumrijeti (303), a može se potaknuti promjenama uvjeta stanične kulture kao što je koncentracija kisika, pH medija, nedostatak hranjivih tvari ili čimbenika rasta, ali i različitim laboratorijskim postupcima pripreme uzoraka, poput enzimskog ili mehaničkog odstranjivanja stanica (283), koje je potrebno za pripremu uzoraka za protočnu citometriju. Stoga sam, kako bih isključila utjecaj oštećenja stanične membrane ili poticanja apoptoze tijekom tripsinizacije stanica i njihove pripreme za protočnu citometriju, udio apoptotičnih stanica u mom istraživanju određivala i *in situ*. S druge strane, s obzirom da apoptotične i umiruće stanice imaju manju sposobnost prijanjanja uz podlogu, a mrtve stanice su potpuno odvojene od podloge te bivaju uklanjene ispiranjima u tijeku različitih postupaka obilježavanja, određivanje udjela apoptotičnih stanica *in situ* može rezultirati lažno manjim brojem apoptotičnih i potpunim izostankom mrtvih stanica. Stoga je važno zaključke o

apoptozi donositi na temelju rezultata istodobno provedenih, a međusobno nadopunjavajućih, morfoloških i protočno-citometrijskih postupaka.

Sukladno očekivanjima, udio apoptotičnih stanica određen *in situ* bio je manji u odnosu na nalaz protočne citometrije u svim vremenskim točkama, odnosno 7% apoptotičnih stanica sedmoga dana, te 8% i 11% apoptotičnih stanica desetoga i četrnaestoga dana kulture.

Dodavanje aktivacijskog anti-Fas protutijela dovelo je do nešto manjeg povećanja udjela apoptotičnih stanica sedmog dana kulture, sa 7% na 10% apoptotičnih stanica, u odnosu na dvostruko povećanje udjela apoptotičnih stanica određeno protočnom citometrijom.

Sukladno nalazu protočne citometrije, *in situ* određivanje apoptoze nije pokazalo značajan porast udjela apoptotičnih stanica nakon dodavanja aktivacijskog anti-Fas protutijela deseti dan kulture, dok je četrnaesti dan u zrelih osteoblasta udio stanica s morfološkim znakovima apoptoze bio za 2% manji u odnosu na netretirane stanice.

U svome istraživanju sam također koristila kolorimetrijski postupak određivanja aktivnosti izvršne kaspaze-3 kao mjere apoptoze, no s obzirom na relativno mali udio apoptotičnih sinovijalnih mezenhimnih stanica, ne čudi preslaba aktivnost kaspaze-3 za stvaranje mjerljivog intenziteta žuto obojenog pNA, zbog koje nisam mogla analizirati dobivene rezultate.

S obzirom da i veća oštećenja stanične membrane apoptotičnih stanica mogu imati za posljedicu ulaz PI u stanicu i lažno prikazivanje udjela mrtvih stanica, udio mrtvih stanica također možemo promatrati kao neizravni pokazatelj apoptoze. Određivanjem mrtvih stanica protočnom citometrijom sam također utvrdila značajan porast udjela mrtvih stanica među nezrelim osteoblastima sedmoga dana kulture nakon dodavanja aktivacijskog anti-Fas protutijela, dok je taj učinak izostao u zrelih osteoblasta desetoga i četrnaestoga dana kulture.

Sve navedeno upućuje da aktivacija receptora Fas uzrokuje apoptozu vrlo malog broja usmjerenih nezrelih stanica osteoblastne loze podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica, a ne utječe na apoptozu zrelih osteoblasta. Zajedno s nalazom da ligand Fas izaziva apoptozu manjeg broja zrelih osteoblasta podrijetla koštane srži (243), ovaj nalaz govori u prilog zaključku da sustav Fas/ligand Fas u zrelih osteoblasta nema značajnu ulogu u apoptozi (112). Povećanje udjela apoptotičnih stanica izazvano dodavanjem protutijela anti-Fas bilo je sukladno mojim rezultatima analize izražaja receptora Fas na osteoblastima podrijetla mezenhimnih sinovijalnih stanica, koji je bilježio najveći porast upravo sedmoga dana kulture. Međutim, porast udjela apoptotičnih stanica bio je manji nego što bismo očekivali promatrajući udio stanica koje izražavaju Fas. Primjerice, sedmoga dana kulture Fas je bio izražen na 14-15% stanica, dok je povećanje udjela apoptotičnih stanica bilo 9%.

Desetoga i četrnaestoga dana na zrelim je osteoblastima Fas bio izražen na 8-17%, odnosno na 6-16% stanica, a nije bilo zabilježeno značajno povećanje udjela apoptotičnih stanica u odnosu na netretirane stanice.

Ovi nalazi upućuju na zaključak da receptor Fas nije potpuno funkcionalan na svim osteoblastima podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica na kojima je izražen. Nalaz je u skladu s nalazom manjeg porasta udjela apoptotičnih stanica osteoblastne loze iz koštane srži Kovačić i suradnika (243) nakon dodavanja liganda Fas u kulturu osteoblasta, u odnosu na udio stanica koje izražavaju Fas.

Osjetljivost osteoblasta na apoptozu posredovanu sustavom Fas/ligand Fas je regulirana različitim čimbenicima. Regulacija funkcionalnosti receptora Fas se može događati na razini izražaja receptora na površini membrane, te na razini unutarstaničnih signalnih zbivanja. Za funkcionalnost receptora Fas je važna njegova trimerizacija na površini membrane (304). Iako se i monomerni i dimerni oblici receptora Fas obilježavaju protutijelima, oni nisu funkcionalni i ne prenose apoptotični signal. S druge strane, unutarstanični signalni sustavi zaduženi za prijenos apoptotičnog signala se mogu također mijenjati pod utjecajem različitih čimbenika kao što su citokini, a aktivacija receptora Fas, umjesto apoptoze, može čak djelovati anti-apoptotički (245) i potaknuti staničnu proliferaciju.

Većina čimbenika rasta inhibira apoptozu osteoblasta *in vitro*, promjerice IGF (305), FGF (306) i IL-6 (80). S druge strane, neki čimbenici rasta mogu poticati apoptozu. Tako BMP-2, iako potiče izgradnju kosti, također potiče i odumiranje osteoblasta potičući unutrašnji apoptotički put oslobađanjem mitohondrijskog citokroma *c* te kaspaza-9, -3, -6, i -7 (307). Nadalje, poticanje apoptoze aktivacijom receptora Fas monoklonskim protutijelom u osteosarkomskoj liniji MG63 je moguće samo uz prisutnost IFN- $\gamma$  (80, 236), a u osteoblastnoj mišjoj liniji MC3T3 u prisutnosti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  (236), te IGF I u primarnih ljudskih osteoblasta (241). Osim toga, pokazano je i da osteoblasti izolirani iz kostiju žena u menopauzi imaju pojačan izražaj receptora Fas na razini gena i bjelančevina, te su osjetljiviji na apoptozu posredovanu sustavom Fas/ligand Fas (228).

Točan mehanizam i utvrđivanje uzročnih čimbenika koji doprinose otpornosti dijela osteoblasta na apoptozu u mom istraživanju trebalo bi nadalje razjasniti.

#### **6.1.4 Aktivacija receptora Fas izaziva inhibiciju osteoblastogeneze sinovijalnih mezenhimnih stanica *in vitro***

Smatra se da apoptoza osteoblasta ima značajnu ulogu u održavanju ravnoteže koštane pregradnje (112) jer je poznato da apoptoza maloga broja stanica osteoblastne loze *in vivo* može dovesti do značajnoga smanjenja broja zrelih osteoblasta, a time posljedično i do smanjene koštane gustoće (80).

S druge strane, Kovačić i suradnici (243) pokazali su da je poticanje apoptoze dodavanjem rekombinantnog liganda Fas *in vitro* smanjilo konačan broj osteoblastnih kolonija kada je ligand Fas dodavan tijekom cijelog uzgoja stanica, ili samo u kasnijim vremenskim točkama osteoblastnih kultura podrijetla koštane srži, no smanjenje broja osteoblastnih kolonija bilo je veće nego bi se očekivalo s obzirom na pronađen relativno mali porast broja apoptotičnih stanica izazvan dodavanjem liganda Fas.

Kako bih istražila učinak dodavanja protutijela anti-Fas na diferencijaciju mezenhimnih sinovijalnih stanica u osteoblaste, u različitim sam vremenskim točkama u kulturu osteoblasta dodavala aktivacijsko protutijelo anti-Fas, te potom analizirala broj osteoblastnih kolonija, aktivnost AP te izražaj gena specifičnih za osteoblaste.

Dodavanje protutijela anti-Fas stanicama osteoblastnih kultura sinovijalnog podrijetla je smanjilo ukupan broj osteoblastnih kolonija, dok je povećalo ukupan broj stanica. Osim toga, dodavanjem protutijela se smanjivao izražaj gena za Runx2 te aktivnost AP u lizatima stanica. Najizrazitije smanjenje broja kolonija, kao i četverostruko smanjenje aktivnosti AP, sam opazila kada su stanice osteoblastnih kultura tretirane protutijelom anti-Fas u tri vremenske točke. Jednokratno tretiranje osteoblastnih kultura protutijelom anti-Fas u ranim i kasnim vremenskim točkama također je značajno smanjilo aktivnost AP, te izražaja gena za AP. Tretiranje protutijelom anti-Fas deveti dan kulture je samo u jednom od ponovljena tri pokusa izazvalo značajno smanjenje aktivnosti AP, dok je u ostala dva pokusa taj učinak izostao. Dodavanje protutijela anti-Fas nije mijenjalo izražaj gena za Fas na stanicama osteoblastnih kultura sinovijalnog podrijetla. Inhibicija diferencijacije izazvana protutijelom anti-Fas je bila specifična, jer izotipsko kontrolno protutijelo nije inhibiralo osteoblastogenezu.

Sukladno nalazu Kovačić i suradnika (243), inhibicijski učinak na osteoblastogenezu bio je veći nego bi se očekivalo s obzirom na rezultate relativno malog broja apoptotičnih stanica potaknutih dodavanjem protutijela anti-Fas u ranoj vremenskoj točki, te neznatnu apoptozu posredovanu protutijelom anti-Fas u kasnijim vremenskim točkama. Osim toga, dodavanje protutijela anti-Fas je izazvalo pojačanu proliferaciju stanica, i povećalo broj CFU-F kolonija.

Smanjenje broja osteoblastnih kolonija izazvano tretiranjem protutijelom anti-Fas je stoga najvjerojatnije posljedica združenog učinka apoptoze i usporenog sazrijevanja osteoblasta uzrokovanoga aktivacijom unutarstaničnih signalnih puteva koji nadziru staničnu proliferaciju i diferencijaciju, a koji također mogu biti potaknuti aktivacijom receptora Fas (308). Zna se da kaspaze vanjskog apoptotičnog puta, nakon aktivacije TNFR ili receptora Fas u stanica otpornih na apoptozu, mogu cijepati prilagođavačku bjelančevinu TRAF1, koja je uključena u nadzor signalnog puta NF $\kappa$ B zaduženoga za proliferaciju i diferencijaciju stanice (309). Zato aktivacija receptora Fas protutijelom može dovesti do poremećaja ravnoteže toga sustava, te posljedično do veće proliferacije i slabije diferencijacije sinovijalnih mezenhimnih stanica u osteoblaste. Tu-Rapp i suradnici (134) su pokazali da dodavanje aktivacijskoga protutijela stanicama mišje fibroblastne linije NIH3T3 smanjuje njihovu odumiranje, a potiče ih na stvaranje proupulanih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, što upućuje na stimulaciju i proliferaciju sinovijalnih fibroblasta posredovanu sustavom Fas/ligand Fas kao mehanizam podržavanja sinovijalne hiperplazije i razvoja zglobnog oštećenja u RA. Ligand Fas izražen na aktiviranim limfocitima T može aktivirati receptor Fas prisutan na sinovijalnim fibroblastima otpornima na apoptozu. Osim poticanja proliferacije, što vodi k sinovijalnoj hiperplaziji, dolazi i do inhibicije osteoblastogeneze iz sinovijalnih mezenhimnih stanica, što smanjuje mogućnost reparacije koštanih promjena uzrokovanih zglobnom upalom.

## **6.2 Uloga sustava Fas/ligand Fas u mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom**

### **6.2.1 Nedostatnost receptora Fas ublažava klinički tijek i histološki nalaz oštećenja zgloba tijekom artritisa potaknutog antigenom**

Kako bih ustanovila učinak nedostatnosti receptora Fas na klinički tijek artritisa i oštećenje struktura koljenog zgloba, miševima divljega tipa i miševima s izbačenim genom za Fas potaknula sam artritis, a nakon četrnaest dana, u subakutnoj fazi bolesti, sam klinički procjenjivala oteklinu koljenih zglobova, a histološki parametre zglobne upale - celularnost sinovije, eksudat u zglavnom prostoru, oštećenje zglobne hrskavice, te razaranje subhondralne kosti.

Rezultati tri ponovljena pokusa moga istraživanja su pokazala da artritis potaknut antigenom u miševa divljega tipa značajno povećava promjer koljenog zgloba, a taj učinak izostaje u miševa s izbačenim genom za Fas. Sukladno tome, histološka procjena koljenih zglobova pokazala je značajno upalno oštećenje zglobova miševa divljega tipa artritismom potaknutim antigenom, a intenzitet upalnog oštećenja zglobova miševa s izbačenim genom za Fas je bio sličan kontrolnoj skupini.

Lokalne koštane erozije su najistaknutiji oblik gubitka kosti potaknutog upalom u RA, a karakterizira ih masivni lokalni gubitak kosti i mineralizirane hrskavice u neposrednoj blizini upaljene sinovije (36), odnosno razaranje subhondralne kosti u prostoru između zglobne hrskavice, mjesta pripajanja sinovijalne ovojnice na periost i podležeće kosti. Brojna su istraživanja jasno dokazala funkcionalnu ulogu osteoklasta u nastanku lokalnih koštanih erozija. Koristeći mišje eksperimentalne modele artritisa, pokazano je da nedostatak ili farmakološka blokada osteoklasta dovodi do izostanka nastanka lokalnih koštanih erozija čak i u potpuno razvijenoj zglobnoj upali (46-48). Štoviše, blokatori TNF-a pokazali su snažan učinak u sprječavanju gubitka kosti koji nadmašuje sam protuupalni učinak te dokazuju kostimulatornu ulogu TNF-a u osteoklastogenezi (43, 49). Međutim, s obzirom da je poznato da TNF, kojeg stvara upalna sinovija, inhibira diferencijaciju i metaboličku aktivnost osteoblasta (50, 51), izgledno je da inhibicija osteoblastogeneze također može doprinijeti nastanku lokalnih koštanih erozija.

Stoga su ciljevi novih terapijskih mogućnosti u liječenju upalnih i degenerativnih zglobnih bolesti usmjereni ne samo na smanjivanje upalne i resorpcije kosti, već i na poticanje procesa cijeljnja hrskavice i subhondralne kosti. Pri tome veliki značaj imaju istraživanja uloge mezenhimnih matičnih stanica, s obzirom na njihova poznata imunomodulacijska svojstva, te



moгуćnost poticanja regeneracije zglobnih tkiva njihovim sazrijevanjem *in situ* u osteoblaste i hondroblaste (11). Zreli osteoblasti također imaju imunomodulacijska svojstva, te poticanje njihova sazrijevanja u zahvaćenim zglobovima može djelovati istodobno i regenerativno i protuupalno (53).

S obzirom da dio sinovijalnih fibroblasta ima značajke mezenhimnih matičnih stanica, oni također mogu diferencirati u osteoblaste i hondroblaste (52). No za pretpostaviti je da zglobna upala mijenja njihov diferencijacijski potencijal, kao i imunomodulacijska svojstva. Poznato je da tijekom zglobne upale dolazi do migracije mezenhimnih stromalnih stanica iz koštane srži u sinoviju te, u odnosu na fizioloških 1%, tada 30% sinovijalnih fibroblasta potječe iz koštane srži (54), kao i da upalni citokini, poput IL-1 $\beta$  i TNF, aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B, inhibirajući time diferencijaciju, a potičući proliferaciju sinovijalnih fibroblasta, što doprinosi stvaranju panusa i razaranju zgloba (50, 54).

Receptor Fas može doprinijeti patogenezi artritisa na dva načina. S jedne strane, indukcija apoptoze autoreaktivnih limfocita posredovana receptorom Fas može smanjiti upalni zglobni proces (257). Sukladno tome, njegova nedostatnost može poticati autoimunost blokiranjem periferne tolerancije autoreaktivnih limfocita i inhibirajući AICD. Uloga receptora Fas u autoimunosti prethodno je vrlo dobro opisana u MRL-*lpr* miševa, te u eksperimentalnim životinjskim modelima autoimunog encefalitisa. Štoviše, u MRL-*lpr/lpr* miševa opisan je i spontani razvoj artritisa (310). Stoga je vjerojatno da poremećaj periferne tolerancije može imati značajnu ulogu u patogenezi RA. S druge strane, Fas može doprinijeti razvoju bolesti potičući apoptozu hondrocita (256) te potaknuti proliferaciju sinovijalnih fibroblasta i makrofaga koji izražavaju Fas. Neke studije pokazuju da se fibroblasti mogu aktivirati preko receptora Fas (311), te da je Fas izraženiji u sinoviji oboljelih od RA nego od osteoartritisa (312). Stoga je moguće da bi ligand Fas izražen na aktiviranim limfocitima T u upaljenim zglobovima mogao zakočiti diferencijaciju stanica osteoblastne loze i time doprinijeti oštećenju zglobova i osteoporozi u RA (255).

Slično proturiječnim nalazima uloge receptora Fas životinjskim modelima RA, studije provedene na bolesnicima s RA također pokazuju suprotne rezultate dosadašnjih istraživanja uloge sustava receptor Fas/ligand Fas u patogenezi RA, pri čemu različite studije opisuju kliničko poboljšanje simptoma terapijskim blokiranjem, kao i terapijskim poticanjem toga sustava (252). Ovako različiti nalazi dosadašnjih istraživanja mogu se objasniti time što je uloga receptora Fas i liganda Fas analizirana u različitim vrstama stanica uključenim u nastanak i održavanje zglobne upale i koštanih oštećenja, odnosno u različitim stadijima artritisa.

Rezultati moga istraživanja, koji se odnose na subakutnu fazu AIA, pokazuju da nedostatnost receptora Fas ima zaštitni učinak na klinički tijek artritisa i razvoj zglobne upale u mišjem modelu RA. Zajedno s nalazom Tu-Rapp i suradnika (134), koji su pokazali da *lpr* miševi imaju blaži tijek artritisa u modelu CIA, ovi rezultati umanjuju značaj smanjene periferne tolerancije uzrokovane pojačanom reaktivnošću limfocita karakterističnom za limfoproliferativni poremećaj miševa s nedostatnosti gena za Fas, u propagaciji upale i patogenezi bolesti, a potvrđuju proupalnu ulogu sustava Fas/ligand Fas koja posreduje razaranje zglobnih struktura u artritisu.

### **6.2.2 Nedostatnost receptora Fas štiti od jukstaartikularnog gubitka kosti u artritisu potaknutom antigenom**

Uz upalu i hiperplaziju sinovije, najvažnije obilježje RA je gubitak kosti, koji se javlja u obliku lokalnih koštanih erozija subhondralne kosti, te razvoja periartikularne i sustavne ostoporoze (36). Nalaz lokalnih koštanih erozija koljenih zglobova pronađenih u mom istraživanju opisala sam u prethodnom odlomku, usporedno s procjenom sinovijalne upale i proliferacije.

Jukstaartikularna osteopenija je drugi oblik gubitka kosti, a tipično zahvaća trabekularnu kost u metafizama uz upalom zahvaćeni zglob. Stoga sam, kako bih istražila učinak nedostatnosti receptora Fas na jukstaartikularni gubitak kosti u subakutnoj fazi AIA, odredila gustoću trabekularne kosti u distalnim metafizama bedrenih kostiju, koristeći se histomorfometrijskom analizom i mikro-kompjuteriziranom tomografijom.

Histomorfometrijska analiza distalnih metafiza bedrenih kostiju potvrdila je statistički značajan gubitak trabekularne kosti u miševa divljega tipa s artritisom potaknutim antigenom. Nasuprot tome, miševi Fas  $-/-$  s artritisom potaknutim antigenom imali su sličnu trabekularnu gustoću kao i kontrolna skupina miševa. Mikro-kompjuterizirana tomografija pokazala je sukladan nalaz gubitka trabekularne kosti u miševa divljega tipa kojima je induciran artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa, kao i izostanak gubitka kosti u miševa Fas  $-/-$ .

Nalaz smanjenog koštanog volumena i razrjeđenja koštanih grečica u miševa divljeg tipa u skladu je s histomorfometrijski dokazanim smanjenjem volumena i razrjeđenjem periartikularne trabekularne kosti u pacijenata s RA (55, 56). Međutim, opisani su i nalazi nakupljanja osteoblasta i pojačanog odlaganja osteoida u jukstaartikularnoj kosti tijekom RA,

što ukazuje i na moguće pojačano stvaranje trabekularne kosti (55, 56), a vjerojatno ovisi o promatranoj fazi bolesti.

Izostanak gubitka kosti u artritisu potaknutog antigenom u miševa Fas  $-/-$  u skladu je s nalazom zaštitne uloge njegove nedostatnosti na klinički tijek artritisa i razvoj zglobne upale, a potvrđuje hipotezu o zaštitoj ulozi nedostatnosti receptora Fas na gubitak kosti potaknutog zglobnom upalom. Ovaj nalaz odgovara prethodno provedenim istraživanjima na miševima s nedostatnosti receptora Fas u modelu gubitka kosti izazvanog ovarijektomijom. Katavić i suradnici (249) su pokazali da su miševi soja *gld* zaštićeni od gubitka kosti izazvanog ovarijektomijom, a u modelu koštane regeneracije potaknute ablacijom koštane srži stvarali su više nove kosti od miševa divljeg tipa. Osim toga, Kovačić i suradnici (251) pronašli su da su i miševi Fas  $-/-$  također zaštićeni od gubitka kosti potaknutog ovarijektomijom i to zbog izostanka porasta broja osteoklasta i jačeg poticanja osteoblastogeneze nego u miševa divljeg tipa. Mehanizam nastanka gubitka jukstaartikularne kosti u RA nije u potpunosti razjašnjen, no blizina zgloba zahvaćenog upalom ukazuje da sinovijalna upala izvan kortikalne površine kosti izravno ili neizravno utječe na gubitak trabekularne kosti u blizini zgloba. Zato možemo zaključiti da bi pretpostavljeni mehanizam upalom i sustavom Fas/ligand Fas posredovane smanjene osteoblastogeneze mezenhimnih stromalnih stanica, te posljedično slabije izgradnje kosti kao uzroka nastanka oštećenja subhondralne kosti u RA, mogao biti djelatan i u razgradnji jukstaartikularne kosti.

Treći oblik osteopenije u RA je sustavni gubitak kosti, a rezultat je poremećaja koštane pregradnje uzrokovanoga sustavno prisutnim pro-upalnim citokinima (36). Za sada nije u potpunosti razjašnjeno dominira li poremećajem ravnoteže koštane pregradnje pojačana koštana resorpcija ili smanjeno stvaranje kosti. Histomorfometrijske analize kostiju oboljelih od RA, kao i analiza koštane pregradnje djece oboljele od JIA, govore u prilog smanjenog stvaranja kosti kao primarnog procesa, dok druga istraživanja ukazuju na dominaciju sustavno pojačane koštane resorpcije (59, 60).

Za utvrđivanje učinka nedostatnosti receptora Fas na sustavni gubitak kosti u artritisu potaknutom antigenom, mikro-kompjutoriziranom tomografijom sam analizirala tijela L2 kralježaka miševa divljega tipa i miševa Fas  $-/-$  u subakutnoj fazi artritisa potaknutog antigenom. Gustoća trabekularne kosti tijela L2 kralježaka nije se značajno razlikovala između testiranih skupina miševa, što upućuje na činjenicu da u subakutnoj fazi bolesti ne dolazi do razvoja sustavnog gubitka kosti u modelu artritisa potaknutog antigenom.

### **6.2.3 Zglobna upala u subakutnoj fazi artritisa u mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom potiče *in vitro* osteoblastogenezu iz sinovijalnih mezenhimnih stanica i stanica koštane srži**

Poznato je da se sinovijalna hiperplazija razvija kao posljedica aktivacije NF- $\kappa$ B u sinovijalnim fibroblastima potaknute upalom, koja tada potiče njihovu proliferaciju, a inhibira osteoblastnu i hondroblastnu diferencijaciju (50, 54). Osim toga, pokazano je da aktivacija receptora Fas, uz ograničeni apoptotični učinak, koči diferencijaciju osteoblasta (243).

Kako bih provjerila lokalni učinak zglobne upale i nedostatnosti receptora Fas na osteoblastnu diferencijaciju sinovijalnih mezenhimnih stanica, a potom i na osteoblastnu diferencijaciju mezenhimnih stromalnih stanica koštane srži priležeće kosti, analizirala sam površinu osteoblastnih kolonija, aktivnost AP i izražaj gena specifičnih za osteoblaste u osteoblastnim kulturama mišjih sinovijalnih mezenhimnih stanica koljenog zgloba, odnosno stromalnih stanica koštane srži bedrenih kostiju, u miševa divljega tipa i miševa Fas  $-/-$  kojima je induciran artritis te u kontrolnih miševa.

Rezultati moga istraživanja su pokazali da je zglobna upala u subakutnoj fazi artritisa potaknutog antigenom pojačala *in vitro* osteoblastogenezu sinovijalnih mezenhimnih stanica u miševa divljega tipa, dok u miševa Fas  $-/-$  nije bilo razlike u osteoblastogenezi sinovijalnih mezenhimnih stanica iz zglobova miševa kojima je potaknut artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa. Četrnaestoga dana kulture broj osteoblastnih kolonija bio je veći u miševa divljega tipa kojima je induciran artritis, no bio je veći i ukupni broj stanica i CFU-F kolonija, što pokazuje i jaču proliferaciju sinovijalnih stanica izoliranih iz upaljenih zglobova. Pojačana proliferacija nije primjećena u kulturi stanica miševa Fas  $-/-$ . Analiza izražaja gena specifičnih za osteoblaste pokazala je da su sinovijalne mezenhimne stanice izolirane iz koljena miševa divljega tipa kojima je potaknut artritis, kao i nezreli osteoblasti sedmoga dana kulture, imali povišen omjer RANKL/OPG u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa, dok je u miševa Fas  $-/-$  kojima je induciran artritis omjer RANKL/OPG u nezrelim osteoblasta bio smanjen.

Analizirajući osteoblastnu diferencijaciju stromalnih stanica koštane srži mišjih bedrenih kostiju, pronašla sam pojačanje osteoblastogeneze u obje skupine miševa kojima je induciran artritis u odnosu na kontrolne skupine miševa. Osim toga, analiza izražaja osteoblastnih gena desetoga dana kulture je pokazala porast izražaja gena za OPG, ali i još veći porast izražaja gena za RANKL, i time povećan omjer RANKL/OPG u osteoblasta podrijetlom iz koštane srži miševa divljega tipa kojima je induciran artritis, u odnosu na miševe kontrolne skupine. S

druge strane, zreli osteoblasti miševa Fas –/– kojima je induciran artritis, s obzirom na slabiji porast RANKL-a u odnosu na kontrolnu skupinu miševa, imali su niži omjer RANKL/OPG od miševa kontrolne skupine.

Pojačana osteoblastogeneza u artritisu je u suprotnosti s mojom hipotezom upalom inhibirane osteoblastogeneze posredovano Fas/ligand Fas sustavom. Međutim, s obzirom da sam u svom istraživanju promatrala subakutnu fazu artritisa, moguće je da se radi o kompenzatornom pokušaju reparacije gubitka kosti nakon akutne faze artritisa.

Jimenez-Boj i suradnici (56) pokazali su da erozija lokalne kosti može rezultirati potpunom penetracijom kortikalne barijere te izlaganju koštane srži sinovijalnom tkivu. Tada se na tom mjestu stvaraju limfocitni agregati koje uglavnom tvore limfociti B koji izražavaju BMPs i povezani su s nakupljanjem osteoblasta i stvaranjem kosti na priležećem endostu, što se može protumačiti kao kompenzatorni pokušaj zatvaranja kortikalne kosti (57), a može objasniti pojačanu osteoblastogenezu mezenhimnih stanica koštane srži.

Osim toga, unatoč pojačanoj osteoblastogenezi, omjer RANKL/OPG bio je povećan u osteoblasta sinovijalnoga podrijetla i iz koštane srži u miševa divljega tipa kojima je induciran artritis, što može doprinijeti pojačanju osteoklastogeneze u subakutnoj fazi bolesti, i potaknuti koštanu resorpciju. Suprotno tome, smanjen omjer RANKL/OPG u sinovijalnih osteoblasta i osteoblasta podrijetlom koštane srži miševa Fas –/–, mogao bi biti mehanizam koji doprinosi zaštitnom učinku nedostatka receptora Fas na lokalni i jukstaartikularni gubitak kosti potaknut zglobnom upalom. Daljnja istraživanja ovoga mehanizma trebala bi uključiti analizu osteoklastogeneze te usporedbu osteoblastogeneze i osteoklastogeneze u kroničnim fazama artritisa.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Fas je slabo izražen na nezrelim stanicama osteoblastne loze podrijetla sinovijalnih mezenhimnih stanica izoliranih iz mišjih koljenih zglobova. Njegov se izražaj u početku diferencijacije osteoblasta *in vitro* povećava i na bjelančevinskoj i na genskoj razini, da bi bio najviši sedmog dana kulture, a potom se postupno smanjuje, te je na zrelim osteoblastima četrnaesti dan kulture izražen u jednakom broju kao i u nezrelim osteoblasta.

2. Aktivacija receptora Fas može izazvati apoptozu malog broja nezrelim osteoblasta, sedmoga dana uzgoja osteoblasta *in vitro*, no taj je broj manji od udjela osteoblasta koji izražavaju Fas. Dodavanje aktivirajućeg protutijela anti-Fas ne potiče apoptozu zrelih osteoblasta.

3. Dodavanje aktivirajućeg protutijela anti-Fas kontinuirano tijekom diferencijacije osteoblasta *in vitro* izaziva jaku inhibiciju osteoblastogeneze. Jednokratno dodavanje aktivirajućeg protutijela receptora Fas u ranom i kasnom stadiju diferencijacije osteoblasta šestoga i trinaestoga dana *in vitro* kulture također izaziva nešto slabiju, ali značajnu inhibiciju osteoblastogeneze. Opisano djelovanje protutijela je specifično, što dokazuje izostanak inhibicije osteoblastogeneze dodavanjem izotipskoga kontrolnoga protutijela. Inhibicija osteoblastogeneze izazvana dodavanjem aktivirajućeg protutijela receptora Fas je bila naglašenija nego što bi se moglo očekivati prema znatno slabijem porastu broja apoptotičnih nezrelim osteoblasta nakon dodavanja protutijela receptora Fas. Stoga je smanjenje osteoblastogeneze tek manjim dijelom posljedica apoptoze stanica osteoblastne loze, a drugim je dijelom uzrokovano usporenom diferencijacijom osteoblasta.

4. Nedostatnost receptora Fas ima zaštitni učinak na klinički razvoj artritisa i na histološki procijenjen intenzitet zglobne upale u AIA. Ovi rezultati upućuju na manji značaj smanjene periferne tolerancije uzrokovane pojačanom reaktivnošću limfocita karakterističnom za limfoproliferativni poremećaj miševa s nedostatnosti gena za Fas, a potvrđuju proupalnu ulogu sustava Fas/ligand Fas koja posreduje razaranje zglobnih struktura u artritisu, te nastanak lokalnih koštanih erozija.

5. Nedostatnost receptora Fas priječi subhondralni i jukstaartikularni gubitak kosti u subakutnoj fazi artritisa u mišjem modelu AIA, što upućuju na zaključak da bi nedostatnost

sustava Fas/ligand Fas mogla zaštitno djelovati u stanjima gubitka kosti posredovanoga upalom. Izostanak gubitka kosti u AIA u miševa s izbačenim genom za Fas u skladu je s nalazom zaštitne uloge njegove nedostatnosti na klinički tijek artritisa i razvoj zglobne upale.

6. U mišjem modelu subakutnog AIA izostaje sustavni gubitak kosti procijenjivan na tijelima L2 kralješka u miševa divljega tipa i miševa s izbačenim genom za Fas. Kako je AIA model lokalnog artritisa izazvanoga intraartikularnom injekcijom antigena, može se zaključiti da je promatranje artritisa u subakutnoj fazi nedovoljno dugo vrijeme za učinak upale na sustavni gubitak kosti.

7. Zglobna upala u subakutnoj fazi artritisa u mišjem modelu AIA potiče *in vitro* osteoblastogenezu sinovijalnih mezenhimnih stanica u miševa divljeg tipa, dok se u obje skupine miševa sustavni učinak bolesti očituje potaknutom *in vitro* osteoblastogenezom mezenhimnih stanica koštane srži. Pojačana osteoblastogeneza može se objasniti kao reaktivni odgovor stanica osteoblastne loze na zglobnu upalu u subakutnoj fazi bolesti u smislu pokušaja pojačane koštane izgradnje i reparacije upalom oštećene subhondralne i jukstaartikularne kosti.

## 8. SAŽETAK

Artritis potaknut antigenom je eksperimentalni mišji model reumatoidnog artritisa induciran metiliranim goveđim serumskim albuminom. Jedna od glavnih karakteristika upalnog zglobnog zbivanja je sinovijalna hiperplazija, pri čemu hiperplastična sinovija sadrži mezenhimne prethodnike čija je diferencijacija u osteoblaste, hondroblaste ili adipocite poremećena. Kako se zna da Fas može inhibirati diferencijaciju osteoblasta podrijetlom iz koštane srži, cilj je ove studije bio pokazati izražavaju li osteoblasti sinovijalnih mezenhimnih stanica uzgojenih *in vitro* receptor Fas, opisati ulogu receptora Fas u njihovoj apoptozi i diferencijaciji, te razjasniti *in vivo* ulogu nedostatnosti receptora Fas u razvoju artritisa potaknutog antigenom.

Osteoblasti sinovijalnog podrijetla slabo izražavaju receptor Fas, čija je aktivacija *in vitro* povećala broj apoptotičnih nezrelih osteoblasta, no taj je broj bio manji od udjela osteoblasta koji su izražavali Fas. Dodavanje protutijela anti-Fas nije potaklo apoptozu u zrelih osteoblasta. Usprkos ograničenom apoptotičnom djelovanju, aktivacija receptora Fas *in vitro* je značajno smanjila diferencijaciju osteoblasta sinovijalnoga podrijetla.

Za procjenu *in vivo* učinka nedostatnosti receptora Fas koristila sam mišji model artritisa potaknutog antigenom, koji sam izazvala u miševa divljega tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ). Zglobnu upalu izazvala sam injekcijom metiliranog goveđeg serumskog albumina u životinja prethodno hiperimuniziranih istim antigenom, a potom zglobne promjene uspoređivala s kontrolnim miševima injiciranim fiziološkom otopinom puferiranom fosfatima, i to četrnaest dana nakon intraartikularne injekcije. Artritis je u miševa divljega tipa izazvao značajno povećanje promjera koljenih zglobova u usporedbi s kontrolnim miševima, a to je povećanje izostalo u miševa Fas  $-/-$ . Histološka procjena pokazala je znatno upalno oštećenje u miševa divljeg tipa kojima je potaknut artritis, koje je također bilo puno slabijeg intenziteta u miševa Fas  $-/-$ .

Histomorfometrijska analiza jukstaartikularnih metafiza pokazala je smanjenje volumena trabekularne kosti, broja i širine koštanih gredica te povećanje odvojenosti koštanih gredica u miševa divljega tipa s artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu miševa. Sličan je bio i nalaz mikro-kompjutorizirane tomografije koji je potvrdio smanjenje volumena trabekularne kosti i broja koštanih gredica te povećanje razdvojenosti koštanih gredica u odnosu na kontrole. Navedene promjene nisu opažene u Fas  $-/-$  miševa s artritismom, čiji su koštani parametri u skupini miševa s artritismom bili slični kontrolnoj skupini miševa. Artritis potaknut antigenom



pojačao je osteoplastnu diferencijaciju sinovijalnih mezenhimnih prethodnika, te mezenhimnih prethodnika koštane srži u miševa divljega tipa, a u miševa Fas  $-/-$  je taj učinak opažen samo u mezenhimnih prethodnika koštane srži.

Temeljni zaključak ovoga istraživanja je da sustav Fas/ligand Fas ima ulogu u nadzoru nad brojem i diferencijacijom osteoblasta sinovijalnog podrijetla, pri čemu u manjoj mjeri time što potiče njihovu apoptozu, a značajnije inhibicijom osteoplastogeneze. Nedostatnost receptora Fas ima zaštitni učinak na lokalni i jukstaartikularni gubitak kosti u artritisu potaknutom antigenom.

## 9. SUMMARY

Elvira Lazić Mosler, MD: *The role of the Fas/Fas ligand system in synovia-derived osteoblasts and murine model of antigen induced arthritis*; 2012

Antigen induced arthritis is a murine experimental model of rheumatoid arthritis induced by methylated bovine serum albumin. One of the main characteristics of joint inflammation is synovial hyperplasia, whereas hyperplastic synovium in arthritis contains mesenchymal progenitors with reduced ability to differentiate into osteoblasts, chondroblasts or adipocytes. Since Fas has been shown to inhibit osteoblast differentiation, the purpose of this study was to determine whether synovia-derived osteoblasts express Fas *in vitro*; describe the role of Fas in apoptosis and differentiation of synovia-derived osteoblasts *in vitro*; as well as elucidate the *in vivo* role of Fas deficiency in antigen induced arthritis.

Fas receptor was weakly expressed on synovia-derived osteoblasts. Fas activation increased the number of apoptotic immature osteoblasts *in vitro* but the number was smaller than the proportion of Fas expressing osteoblasts. Addition of activating anti-Fas antibody did not induce apoptosis of mature osteoblasts. Despite the limited induction of apoptosis, Fas activation significantly inhibited differentiation of synovia-derived osteoblasts *in vitro*.

In order to assess the *in vivo* effect of Fas deficiency, I used the experimental model of antigen induced arthritis in wild-type mice and mice knocked-out for Fas gene (Fas  $-/-$ ). Arthritis was induced by intraarticular injection of methylated bovine albumine into the knees of animals pre-immunized by the same antigen. The changes of knee joints were compared with control mice injected by phosphate buffered saline, 14 days after intraarticular injection. Knee diameters were significantly increased in wild-type mice with induced arthritis compared to their controls, while this increase was not significant in Fas  $-/-$  mice. Histology revealed pronounced inflammatory parameters in joints of wild-type mice with arthritis, while the inflammation in arthritis-induced Fas  $-/-$  mice was significantly less developed.

Histomorphometric analysis showed a decreased trabecular bone volume, trabecular number and thickness, as well as increased trabecular separation in wild-type mice with arthritis compared to controls. Additionally, micro-computerized tomography analysis showed that wild-type mice with arthritis had a decreased trabecular bone volume and trabecular number, as well as increased trabecular separation compared to controls. Described changes in trabecular bone were not found in Fas  $-/-$  mice with arthritis, whose bone parameters were

similar to those of controls. *In vitro* osteoblast differentiation from both synovial mesenchymal cells and bone marrow cells was increased in wild-type mice with induced arthritis, whereas only osteoblast differentiation from bone marrow mesenchymal stromal cells was increased in arthritic Fas  $-/-$  mice.

The main conclusion of this study is that the Fas/FasL system regulates the number and differentiation of synovial-derived osteoblasts, which is only partially related to the induction of apoptotic cell death but dominantly to the inhibition of osteoblastogenesis. Fas deficiency has a protective role in local and juxtaarticular bone loss in antigen induced arthritis.

## 10. LITERATURA

1. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:372-8.
2. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.
3. Lundkvist J, Kastang F, Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ* 2008;8 Suppl 2:S49-60.
4. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978;298:869-71.
5. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:399-402.
6. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009;4:417-34.
7. Plant D, Flynn E, Mbarek H, *i sur.* Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1548-53.
8. Orozco G, Eyre S, Hinks A, *i sur.* Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:813-6.
9. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
10. Scott IC, Steer S, Lewis CM, Cope AP. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25:447-68.
11. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008;10:223.
12. Goldring SR. Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J Rheumatol Suppl* 2002;65:44-8.
13. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233-55.
14. Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995;54:392-4.
15. Tarner IH, Harle P, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:19-35.
16. Valencia X, Higgins JM, Kiener HP, *i sur.* Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. *J Exp Med* 2004;200:1673-9.
17. Chang SK, Gu Z, Brenner MB. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev* 2010;233:256-66.
18. Kiener HP, Lee DM, Agarwal SK, Brenner MB. Cadherin-11 induces rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes to form lining layers in vitro. *Am J Pathol* 2006;168:1486-99.
19. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, *i sur.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007;315:1006-10.
20. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007;9:223.
21. Cho ML, Ju JH, Kim HR, *i sur.* Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* 2007;108:121-8.
22. Jung YO, Cho ML, Kang CM, *i sur.* Toll-like receptor 2 and 4 combination engagement upregulate IL-15 synergistically in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* 2007;109:21-7.
23. Pierer M, Rethage J, Seibl R, *i sur.* Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol* 2004;172:1256-65.
24. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000;190:150-6.
25. Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, *i sur.* Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by *in situ* hybridization. *Arthritis Rheum* 1995;38:976-84.
26. Honda S, Migita K, Hirai Y, *i sur.* Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 2001;126:131-6.
27. Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, *i sur.* CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine* 2011;53:184-90.

28. Kobayashi I, Ziff M. Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 1973;16:471-86.
29. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, *i sur.* Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R15.
30. Maruotti N, Crivellato E, Cantatore FP, Vacca A, Ribatti D. Mast cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:1-4.
31. Dobloug JH, Forre O, Kvien TK, Egeland T, Degre M. Natural killer (NK) cell activity of peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1982;41:490-4.
32. Tak PP, Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2619-33.
33. Paleolog EM, Young S, Stark AC, *i sur.* Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1258-65.
34. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S81-90.
35. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, *i sur.* Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994;180:341-6.
36. Schett G, Redlich K, Smolen JS. Inflammation-induced bone loss in the rheumatic diseases. U: Favus MJ, urednik Primer on the metabolic diseases and disorders of mineral metabolism. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006, s. 310-3.
37. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, *i sur.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
38. van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995;34 Suppl 2:74-8.
39. Scott DL, Pugner K, Kaarela K, *i sur.* The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:122-32.
40. van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van der Heijde DM, *i sur.* The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. *Br J Rheumatol* 1993;32 Suppl 3:9-13.
41. Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1984;27:968-75.
42. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, *i sur.* Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943-51.
43. Lam J, Takeshita S, Barker JE, *i sur.* TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000;106:1481-8.
44. Deleuran BW, Chu CQ, Field M, *i sur.* Localization of interleukin-1 alpha, type 1 interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992;31:801-9.
45. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, *i sur.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2523-30.
46. Redlich K, Hayer S, Ricci R, *i sur.* Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002;110:1419-27.
47. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, *i sur.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;159:1689-99.
48. Kong YY, Feige U, Sarosi I, *i sur.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-9.
49. Smolen JS, Han C, Bala M, *i sur.* Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum* 2005;52:1020-30.
50. Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E1011-8.
51. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986;319:516-8.
52. Jones EA, English A, Henshaw K, *i sur.* Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:817-27.
53. Liu H, Kemeny DM, Heng BC, *i sur.* The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol* 2006;176:2864-71.

54. Li X, Makarov SS. An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17432-7.
55. Shimizu S, Shiozawa S, Shiozawa K, Imura S, Fujita T. Quantitative histologic studies on the pathogenesis of periarticular osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1985;28:25-31.
56. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, *i sur*. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005;175:2579-88.
57. Gortz B, Hayer S, Redlich K, *i sur*. Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2004;19:990-8.
58. Sinigaglia L, Nervetti A, Mela Q, *i sur*. A multicenter cross sectional study on bone mineral density in rheumatoid arthritis. Italian Study Group on Bone Mass in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 2000;27:2582-9.
59. Gough AK, Lillley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:23-7.
60. Compston JE, Vedi S, Croucher PI, Garrahan NJ, O'Sullivan MM. Bone turnover in non-steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:163-6.
61. Kvien TK, Haugeberg G, Uhlig T, *i sur*. Data driven attempt to create a clinical algorithm for identification of women with rheumatoid arthritis at high risk of osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:805-11.
62. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:325-8.
63. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008;29:403-40.
64. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, *i sur*. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841-6.
65. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:449-55.
66. Lacey DL, Timms E, Tan HL, *i sur*. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
67. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
68. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
69. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994;84:4164-73.
70. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, *i sur*. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
71. Sung JH, Yang HM, Park JB, *i sur*. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2008;40:2649-54.
72. Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors* 2010;36:25-32.
73. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
74. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:98-105.
75. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76:899-910.
76. Stein GS, Lian JB, Stein JS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and osteoblast differentiation in vitro. U: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GE, urednici. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press; 1996.
77. Cook AC, Tuck AB, McCarthy S, *i sur*. Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six "hallmarks of cancer" in a model of breast cancer progression. *Mol Carcinog* 2005;43:225-36.
78. Standal T, Hjorth-Hansen H, Rasmussen T, *i sur*. Osteopontin is an adhesive factor for myeloma cells and is found in increased levels in plasma from patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:174-82.
79. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
80. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793-802.
81. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 2002;173:387-94.

82. Pead MJ, Suswillo R, Skerry TM, Vedi S, Lanyon LE. Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tissue Int* 1988;43:92-6.
83. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 1989;4:783-8.
84. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, *i sur.* Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2003;18:807-17.
85. Belanger LF. Osteocytic osteolysis. *Calcif Tissue Res* 1969;4:1-12.
86. Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 2002;85:185-97.
87. Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 2004;294:458-68.
88. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* 2008;23:915-27.
89. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, *i sur.* Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone* 2009;45:1161-8.
90. Gutierrez OM. Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1710-6.
91. Feng JQ, Ward LM, Liu S, *i sur.* Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 2006;38:1310-5.
92. Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, *i sur.* Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res* 1995;10:231-42.
93. Qing H, Bonewald LF. Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int J Oral Sci* 2009;1:59-65.
94. Potter R, Miller M, Moravits Dis. Raman spectroscopic characterization of bone tissue material properties around the osteocyte lacuna: effect of aging. *J Bone Miner Res* 2009;suppl1:Su0266.
95. Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986;122:363-78.
96. Inoue D, Shih C, Galson DL, *i sur.* Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology* 1999;140:1060-8.
97. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 2003;18:599-609.
98. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J* 1998;17:4456-68.
99. Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990;127:2592-4.
100. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, *i sur.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988;123:2600-2.
101. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, *i sur.* The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 1989;125:1805-13.
102. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-46.
103. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, *i sur.* Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259-69.
104. Teitelbaum SL. RANKing c-Jun in osteoclast development. *J Clin Invest* 2004;114:463-5.
105. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, *i sur.* Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004;114:475-84.
106. Prockop DJ. Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth. *J Biol Chem* 1990;265:15349-52.
107. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.
108. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994;8:163-73.
109. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55:273-86.

110. Rodan GE, Raisz LG, Bilezikian JP. Pathophysiology of osteoporosis. U: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GE, urednici. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press; 2002.
111. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. Mol Reprod Dev 1992;32:160-7.
112. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. Am J Med 2000;108:153-64.
113. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J 2000;19:1745-54.
114. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 2004;15:49-60.
115. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, *i sur.* PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. J Bone Miner Res 2004;19:235-44.
116. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, *i sur.* Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. Eur J Pharmacol 2004;485:89-96.
117. Katsuyama H, Sunami S, Fukunaga M. [Influence of nutrients intake on bone turnover markers]. Clin Calcium 2005;15:1529-34.
118. Wong BR, Josien R, Lee SY, *i sur.* TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med 1997;186:2075-80.
119. Wong BR, Rho J, Arron J, *i sur.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997;272:25190-4.
120. Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. J Immunol 1999;162:2562-8.
121. Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. Arthritis Rheum 2005;52:2307-12.
122. Barbaroux JB, Beleut M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal receptor activator of NF-kappaB ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation. J Immunol 2008;181:1103-8.
123. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *i sur.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997;89:309-19.
124. Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, *i sur.* Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 1998;251:796-801.
125. Choi SJ, Cruz JC, Craig F, *i sur.* Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. Blood 2000;96:671-5.
126. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. J Bone Miner Res 2004;19:2065-77.
127. Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, *i sur.* Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. Biomaterials 2005;26:5677-86.
128. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. Nat Immunol 2000;1:469-74.
129. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 2003;3:745-56.
130. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993;75:1169-78.
131. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:193-209.
132. Fava RA, Notidis E, Hunt J, *i sur.* A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. J Immunol 2003;171:115-26.
133. Criswell LA. Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF-kappaB signaling pathway in disease pathogenesis. Immunol Rev 2010;233:55-61.
134. Tu-Rapp H, Hammermuller A, Mix E, *i sur.* A proinflammatory role for Fas in joints of mice with collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2004;6:R404-14.
135. Feldmann M, Maini RN, Bondeson J, *i sur.* Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. Adv Exp Med Biol 2001;490:119-27.
136. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, *i sur.* Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. Pharmacol Ther 2000;88:333-47.
137. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. FASEB J 2009;23:1625-37.



138. French LE, Tschopp J. Constitutive Fas ligand expression in several non-lymphoid mouse tissues: implications for immune-protection and cell turnover. *Behring Inst Mitt* 1996;156-60.
139. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.
140. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, *i sur*. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-43.
141. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;2:420-30.
142. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932-7.
143. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000;103:273-82.
144. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, *i sur*. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630-2.
145. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189-92.
146. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, *i sur*. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996;2:1361-6.
147. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 1999;9:1441-7.
148. Ayroldi E, D'Adamio F, Zollo O, *i sur*. Cloning and expression of a short Fas ligand: A new alternatively spliced product of the mouse Fas ligand gene. *Blood* 1999;94:3456-67.
149. Strasser A, O'Connor L. Fas ligand--caught between Scylla and Charybdis. *Nat Med* 1998;4:21-2.
150. Holler N, Tardivel A, Kovacovics-Bankowski M, *i sur*. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 2003;23:1428-40.
151. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:353-66.
152. Suzuki I, Fink PJ. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med* 1998;187:123-8.
153. Yu KY, Kwon B, Ni J, *i sur*. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:13733-6.
154. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, *i sur*. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288:2351-4.
155. Papoff G, Hausler P, Eramo A, *i sur*. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 1999;274:38241-50.
156. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004;21:461-5.
157. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, *i sur*. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004;200:353-65.
158. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:53-66.
159. Yokota A, Takeuchi E, Iizuka M, *i sur*. Prominent dominant negative effect of a mutant Fas molecule lacking death domain on cell-mediated induction of apoptosis. *Mol Immunol* 2005;42:71-8.
160. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, *i sur*. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;22:207-20.
161. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002;7:313-9.
162. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10964-7.
163. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010;316:887-99.
164. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005;118:265-7.
165. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
166. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-90.
167. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:917-24.

168. Cefai D, Schwaninger R, Balli M, Brunner T, Gimmi CD. Functional characterization of Fas ligand on tumor cells escaping active specific immunotherapy. *Cell Death Differ* 2001;8:687-95.
169. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998;282:1714-7.
170. Suzuki A, Enari M, Eguchi Y, *i sur.* Involvement of Fas in regression of vaginal epithelia after ovariectomy and during an estrous cycle. *EMBO J* 1996;15:211-15.
171. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;280:243-8.
172. De Maria R, Testa U, Luchetti L, *i sur.* Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999;93:796-803.
173. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* 2005;105:1396-404.
174. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, *i sur.* The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J* 2003;17:1751-3.
175. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1998;187:1427-38.
176. Trimble LA, Prince KA, Pestano GA, Daley J, Cantor H. Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and lpr disease. *J Immunol* 2002;168:4960-7.
177. Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2001;2:1025-31.
178. Wong B, Arron J, Choi Y. T cell receptor signals enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:1939-44.
179. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, *i sur.* Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995;373:441-4.
180. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995;373:438-41.
181. Ju ST, Panka DJ, Cui H, *i sur.* Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444-8.
182. Gorbachev AV, Fairchild RL. CD4+ T cells regulate CD8+ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2004;172:2286-95.
183. Lee HO, Ferguson TA. Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:325-35.
184. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994;152:5624-32.
185. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, *i sur.* CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995;376:181-4.
186. Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13862-7.
187. Mizuno T, Zhong X, Rothstein TL. Fas-induced apoptosis in B cells. *Apoptosis* 2003;8:451-60.
188. Theofilopoulos AN, Balderas RS, Gozes Y, *i sur.* Association of lpr gene with graft-vs.-host disease-like syndrome. *J Exp Med* 1985;162:1-18.
189. Su X, Hu Q, Kristan JM, *i sur.* Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000;164:2523-32.
190. Li NL, Nie H, Yu QW, *i sur.* Role of soluble Fas ligand in autoimmune diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:3151-6.
191. D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, *i sur.* Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3316-21.
192. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 1997;158:4122-8.
193. Frangmyr L, Baranov V, Nagaeva O, *i sur.* Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005;11:35-41.
194. Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* 2004;173:3660-7.
195. Santiago-Schwarz F. Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J Leukoc Biol* 1999;66:209-16.
196. Rescigno M, Piguat V, Valzasina B, *i sur.* Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of

- IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 2000;192:1661-8.
197. Alenzi FQ, Marley SB, Lewis JL, *i sur*. A role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics. *Exp Hematol* 2002;30:1428-35.
  198. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 1999;190:1891-6.
  199. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 1999;190:1879-90.
  200. Wilhelm S, Wagner H, Hacker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol* 1998;28:891-900.
  201. Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, *i sur*. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol* 2010;6:352.
  202. Giroux M, Denis F. CD1d-unrestricted human NKT cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood* 2005;105:703-10.
  203. Josefsen D, Myklebust JH, Lynch DH, *i sur*. Fas ligand promotes cell survival of immature human bone marrow CD34+CD38- hematopoietic progenitor cells by suppressing apoptosis. *Exp Hematol* 1999;27:1451-9.
  204. Barcena A, Muench MO, Song KS, Ohkubo T, Harrison MR. Role of CD95/Fas and its ligand in the regulation of the growth of human CD34(++)CD38(-) fetal liver cells. *Exp Hematol* 1999;27:1428-39.
  205. Thome M, Hofmann K, Burns K, *i sur*. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 1998;8:885-8.
  206. Juttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* 2002;8:268-75.
  207. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, *i sur*. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559-64.
  208. Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA. Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 1999;5:292-7.
  209. Sata M, Perlman H, Muruve DA, *i sur*. Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1213-7.
  210. Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 2003;8:551-62.
  211. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, *i sur*. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994;76:969-76.
  212. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, *i sur*. gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 1994;24:928-33.
  213. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314-7.
  214. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, *i sur*. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1978;148:1198-215.
  215. Giese T, Davidson WF. The accumulation of B220+ CD4- CD8- (DN) T cells in C3H-lpr/lpr mice is not accelerated by the stimulation of CD8+ T cells or B220+ DN T cells with staphylococcal enterotoxin B and occurs independently of V beta 8+ T cells. *Int Immunol* 1995;7:1213-23.
  216. Cohen PL, Eisenberg RA. The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992;13:427-8.
  217. Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 1998;187:1825-38.
  218. Sobel ES, Kakkanaiah VN, Schiffenbauer J, *i sur*. Novel immunoregulatory B cell pathways revealed by lpr+ mixed chimeras. *J Immunol* 1998;160:1497-503.
  219. Allen RD, Marshall JD, Roths JB, Sidman CL. Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules. *J Exp Med* 1990;172:1367-75.
  220. Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 1994;24:3119-23.
  221. Hahne M, Peitsch MC, Irmeler M, *i sur*. Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol* 1995;7:1381-6.
  222. Adachi M, Suematsu S, Kondo T, *i sur*. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 1995;11:294-300.

223. Karray S, Kress C, Cuvellier S, *i sur.* Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of *gld* allele. *J Immunol* 2004;172:2118-25.
224. Ratkay LG, Tait B, Tonzetich J, Waterfield JD. Lpr and MRL background gene involvement in the control of adjuvant enhanced arthritis in MRL-lpr mice. *J Autoimmun* 1994;7:561-73.
225. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* 2003;10:117-23.
226. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* 1999;130:591-601.
227. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 2001;40:275-84.
228. Garcia-Moreno C, Catalan MP, Ortiz A, Alvarez L, De la Piedra C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone* 2004;35:170-7.
229. Bu R, Borysenko CW, Li Y, *i sur.* Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone* 2003;33:760-70.
230. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2003;144:5545-55.
231. Wu X, Pan G, McKenna MA, *i sur.* RANKL regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2005;20:107-16.
232. Hatakeyama S, Tomichi N, Ohara-Nemoto Y, Satoh M. The immunohistochemical localization of Fas and Fas ligand in jaw bone and tooth germ of human fetuses. *Calcif Tissue Int* 2000;66:330-7.
233. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, *i sur.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007;130:811-23.
234. Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, *i sur.* Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J* 2008;27:535-45.
235. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, *i sur.* Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest* 1998;101:1942-50.
236. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 2002;47:511-7.
237. Wang XM, Yu SF, Yang ZP. Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression. *Chin J Dent Res* 2000;3:26-32.
238. Kitaura H, Nagata N, Fujimura Y, *i sur.* Effect of IL-12 on TNF-alpha-mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 2002;169:4732-8.
239. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, *i sur.* Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 1997;12:1637-46.
240. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:709-20.
241. Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, *i sur.* Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:46-51.
242. Duque G, El Abdaimi K, Henderson JE, Lomri A, Kremer R. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone* 2004;35:57-64.
243. Kovacic N, Lukic IK, Grcevic D, *i sur.* The Fas/Fas ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis. *J Immunol* 2007;178:3379-89.
244. Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, *i sur.* IL-12 inhibits TNF-alpha induced osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism in vivo. *Bone* 2009;45:1010-6.
245. Wang K, Scheel-Toellner D, Wong SH, *i sur.* Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. *J Immunol* 2003;171:1035-41.
246. Kogianni G, Mann V, Ebetino F, *i sur.* Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci* 2004;75:2879-95.
247. Mori S, Nose M, Chiba M, *i sur.* Enhancement of ectopic bone formation in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Pathol Int* 1997;47:112-6.
248. Katavic V, Grcevic D, Lukic IK, *i sur.* Non-functional Fas ligand increases the formation of cartilage early in the endochondral bone induction by rhBMP-2. *Life Sci* 2003;74:13-28.
249. Katavic V, Lukic IK, Kovacic N, *i sur.* Increased bone mass is a part of the generalized lymphoproliferative disorder phenotype in the mouse. *J Immunol* 2003;170:1540-7.
250. Lukic IK, Kovacic N, Katavic V, *i sur.* Shared circulation in parabiosis leads to the transfer of bone phenotype from *gld* to the wild-type mice. *Cell Immunol* 2005;233:133-9.

251. Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, *i sur.* Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *Lab Invest* 2010;90:402-13.
252. Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:26-30.
253. Du F, Wang L, Zhang Y, *i sur.* Role of GADD45 beta in the regulation of synovial fluid T cell apoptosis in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 2008;128:238-47.
254. Grcevic D, Jajic Z, Kovacic N, *i sur.* Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol* 2010;37:246-56.
255. Telegina E, Reshetnyak T, Moshnikova A, *i sur.* A possible role of Fas-ligand-mediated "reverse signaling" in pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2009;122:12-7.
256. Kuhn K, Lotz M. Regulation of CD95 (Fas/APO-1)-induced apoptosis in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:1644-53.
257. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, *i sur.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:71-7.
258. Abdelnour A, Bremell T, Holmdahl R, Tarkowski A. Role of T lymphocytes in experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Scand J Immunol* 1994;39:403-8.
259. Schaible UE, Kramer MD, Wallich R, Tran T, Simon MM. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in inbred mouse strains: antibody response and association of H-2 genes with resistance and susceptibility to development of arthritis. *Eur J Immunol* 1991;21:2397-405.
260. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;91:95-101.
261. Wooley PH, Seibold JR, Whalen JD, Chapdelaine JM. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1989;32:1022-30.
262. Vingsbo C, Sahlstrand P, Brun JG, *i sur.* Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol* 1996;149:1675-83.
263. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857-68.
264. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987;30:201-12.
265. Carlsen S, Hansson AS, Olsson H, Heinegard D, Holmdahl R. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* 1998;114:477-84.
266. Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, *i sur.* Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1115-25.
267. Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 2004;172:4503-9.
268. Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, *i sur.* Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science* 1991;253:1026-8.
269. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, *i sur.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-31.
270. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, *i sur.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87:811-22.
271. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, *i sur.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003;426:454-60.
272. Ratkay LG, Zhang L, Tonzetich J, Waterfield JD. Complete Freund's adjuvant induces an earlier and more severe arthritis in MRL-lpr mice. *J Immunol* 1993;151:5081-7.
273. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977;20:841-50.
274. van den Berg WB, Joosten LAB, van Lent PLEM. Murine antigen-induced arthritis. U: Cope A, *urednik Methods in molecular medicine: Arthritis research*, Vol. 2. Totowa (NJ): Humana Press Inc.; 2007, s. 243-53.
275. Armaka M, Gkretsi V, D.L. K, Kollias G. 2009. A standardized protocol for the isolation and culture of normal and arthritogenic murine synovial fibroblasts. U: *Nature protocols*, Vol. 2012.
276. Zakeri Z, Lockshin RA. Cell death during development. *J Immunol Methods* 2002;265:3-20.
277. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:99-104.

278. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
279. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;25:443-51.
280. Odobasic D, Leech MT, Xue JR, Holdsworth SR. Distinct in vivo roles of CD80 and CD86 in the effector T-cell responses inducing antigen-induced arthritis. *Immunology* 2008;124:503-13.
281. Stahlberg A, Hakkanson J, Xian X. 2003. Advanced quantitative real-time PCR in clinical diagnostics and cDNA microarray validation. U: 1st European Conference in Functional Genomics and Diseases, Prague, Czech Republic.
282. Altman DG, Bland JM. Statistics notes: the normal distribution. *BMJ* 1995;310:298.
283. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996;24:131-9.
284. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
285. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *i sur*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
286. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, *i sur*. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
287. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, *i sur*. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88.
288. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, *i sur*. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.
289. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004;50:1522-32.
290. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
291. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52:2521-9.
292. Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funo K, Maini RN, Zvaifler NJ. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:507-13.
293. Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V, *i sur*. Functional mesenchymal stem cell niches in the adult knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum* 2011;63:1289-300.
294. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, *i sur*. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1595-603.
295. Djouad F, Bony C, Haupl T, *i sur*. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1304-15.
296. Kalajzic I, Staal A, Yang WP, *i sur*. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005;280:24618-26.
297. Lepri E, Delfino DV, Migliorati G, *i sur*. Functional expression of Fas on mouse bone marrow stromal cells: upregulation by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Exp Hematol* 1998;26:1202-8.
298. Wieczorek G, Steinhoff C, Schulz R, *i sur*. Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis. *Cell Tissue Res* 2003;311:227-37.
299. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:79-102.
300. Schneider E, Moreau G, Arnould A, *i sur*. Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood* 1999;94:2613-21.
301. Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002;80:131-7.
302. Van Landuyt KB, Jones EA, McGonagle D, Luyten FP, Lories RJ. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R15.
303. al-Rubeai M. Apoptosis and cell culture technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1998;59:225-49.
304. Chan FK. The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i50-3.

305. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997;138:3849-58.
306. Debais F, Lefevre G, Lemonnier J, *i sur*. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent, -beta-catenin-independent signaling pathway. *Exp Cell Res* 2004;297:235-46.
307. Hay E, Lemonnier J, Fromigie O, Marie PJ. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276:29028-36.
308. Imamura R, Konaka K, Matsumoto N, *i sur*. Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2004;279:46415-23.
309. Leo E, Deveraux QL, Buchholtz C, *i sur*. TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:8087-93.
310. Kamogawa J, Terada M, Mizuki S, *i sur*. Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. *Arthritis Rheum* 2002;46:1067-74.
311. Aggarwal BB, Singh S, LaPushin R, Totpal K. Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett* 1995;364:5-8.
312. Chou CT, Yang JS, Lee MR. Apoptosis in rheumatoid arthritis--expression of Fas, Fas-L, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. *J Pathol* 2001;193:110-6.

## 11. ŽIVOTOPIS

### Elvira Lazić Mosler

Adresa:  
Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak  
Odjel za kožne i spolne bolesti  
J. J. Strossmayera 59  
44000 Sisak  
Mobitel: 091 531 5352  
e-mail: elvira.lazic@gmail.com

Kućna adresa:  
Žuti jarak 1, 10040 Zagreb

Datum i mjesto rođenja:  
17. srpnja, 1982., Sisak

#### OBRAZOVANJE:

2000.-2006.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srednja ocjena 4.6  
2006.-2008.: Poslijediplomski studij menadžmenta u zdravstvu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Smjer: Upravljanje u znanosti  
2008.-2011.: Doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

#### AKADEMSKI NASLOVI:

2006.: Doktor medicine  
2009.: Sveučilišni magistar menadžmenta u zdravstvu

#### RADNO ISKUSTVO:

2006.-2007.: Pripravnički staž, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb  
2007.-2010.: Znanstveni novak u Laboratoriju za molekularnu imunologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, na projektu prof. dr. sc. Ane Marušić „*Molekularne interakcije koštanog i imunološkog sustava*“  
2010.-2011.: Asistent na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu  
2008. i 2010.: Instruktor na EMBO tečaju – „*Anatomija i embriologija miša*“  
2011.-: Specijalizacija iz dermatologije i venerologije. Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak

#### OBJAVLJENI RADOVI:

1. **Lazić E**, Dujmović J, Hren D. Retention of basic sciences knowledge at clinical years of medical curriculum. *Croat Med J* 2006;47:882-887.
2. Mosler D, Cavrić G, Naumovski-Mihalić S, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Jelić-Puškarčić B, Prkačin I, Premužić Meštrović I, Bradić T, Nazor A, **Lazić Mosler E**. Erythroblasts in the peripheral blood of adult patient as an adverse prognostic sign – a case report. *Acta Med Croatica* 2011;65(Supl. 1):183-7.
3. Premužić Meštrović I, Dragičević M, Mosler D, Meštrović T, **Lazić Mosler E**, Kozmar D, Kranjčević S, Počanić D, Cavrić G, Narančić Skorić K, Letilović T, Jerkić H, Zeljko H, Kardum-Skelin I. Pleural mesothelioma – case report. *Acta Med Croatica* 2011;65(Supl. 1):213-6.
4. **Lazić E**, Jelušić M; Grčević D, Marušić A, Kovačić N. Osteoblastogenesis from synovial fluid derived cells is related to type and severity of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012,14:R139.



## 11. ŽIVOTOPIS

### Elvira Lazić Mosler

Adresa:  
Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak  
Odjel za kožne i spolne bolesti  
J. J. Strossmayera 59  
44000 Sisak  
Mobitel: 091 531 5352  
e-mail: elvira.lazic@gmail.com

Kućna adresa:  
Žuti jarak 1, 10040 Zagreb

Datum i mjesto rođenja:  
17. srpnja, 1982., Sisak

#### OBRAZOVANJE:

2000.-2006.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srednja ocjena 4.6  
2006.-2008.: Poslijediplomski studij menadžmenta u zdravstvu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Smjer: Upravljanje u znanosti  
2008.-2011.: Doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

#### AKADEMSKI NASLOVI:

2006.: Doktor medicine  
2009.: Sveučilišni magistar menadžmenta u zdravstvu

#### RADNO ISKUSTVO:

2006.-2007.: Pripravnički staž, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb  
2007.-2010.: Znanstveni novak u Laboratoriju za molekularnu imunologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, na projektu prof. dr. sc. Ane Marušić „*Molekularne interakcije koštanog i imunološkog sustava*“  
2010.-2011.: Asistent na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu  
2008. i 2010.: Instruktor na EMBO tečaju – „*Anatomija i embriologija miša*“  
2011.-: Specijalizacija iz dermatologije i venerologije. Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak

#### OBJAVLJENI RADOVI:

1. **Lazić E**, Dujmović J, Hren D. Retention of basic sciences knowledge at clinical years of medical curriculum. *Croat Med J* 2006;47:882-887.
2. Mosler D, Cavrić G, Naumovski-Mihalić S, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Jelić-Puškarčić B, Prkačin I, Premužić Meštrović I, Bradić T, Nazor A, **Lazić Mosler E**. Erythroblasts in the peripheral blood of adult patient as an adverse prognostic sign – a case report. *Acta Med Croatica* 2011;65(Supl. 1):183-7.
3. Premužić Meštrović I, Dragičević M, Mosler D, Meštrović T, **Lazić Mosler E**, Kozmar D, Kranjčević S, Počanić D, Cavrić G, Narančić Skorić K, Letilović T, Jerkić H, Zeljko H, Kardum-Skelin I. Pleural mesothelioma – case report. *Acta Med Croatica* 2011;65(Supl. 1):213-6.
4. **Lazić E**, Jelušić M; Grčević D, Marušić A, Kovačić N. Osteoblastogenesis from synovial fluid derived cells is related to type and severity of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012,14:R139.