

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Ozana Jakšić

Učinak modulacije signaliziranja citokinom IL-6 na sazrijevanje
stanica osteoblastne loze uzgojenih iz mišje koštane srži

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Danke Grčević, u sklopu znanstvenog projekta „Notch signalni put u osteoklastnim progenitorima potaknutim reumatoidnim artritism“ (šifra projekta IP-2018-01-2414, voditeljica projekta prof. dr. sc. Danka Grčević) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

POPIS KRATICA

7-AAD	7-amino-aktinomicin D
α -MEM	minimalni esencijalni medij α
ACTB	β -aktin (prema engl. <i>β-actin</i>)
ALP	alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i>)
ANOVA	analiza varijance (prema engl. <i>analysis of variance</i>)
APC	alofikocijanin (prema engl. <i>allophycocyanin</i>)
BMP	koštani morfo-genetski protein (prema engl. <i>bone morphogenic protein</i>)
BMU	temeljna višestanična jedinica (prema engl. <i>basic multicellular unit</i>)
BSP II	koštani sijaloprotein II (prema engl. <i>bone sialoprotein II</i>)
CCL	kemokinski ligand s C-C motivom (prema engl. <i>C-C motif chemokine ligand</i>)
cDNA	komplementarna DNA (prema engl. <i>complementary DNA</i>)
COL1A1	alfa-1 lanac kolagena tipa I (prema engl. <i>collagen1α1</i>)
CXCL12	kemokinski ligand 12 s C-X-C motivom (prema engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>)
DKK-1	inhibicijski protein Dickkopf-1
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ERK	kinaza aktivirana izvanstaničnim receptorom (prema engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
Fc	kristalizirajući fragment (prema engl. <i>crystallizable fragment</i>)
FCS	fetalni teleći serum (prema engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	fluorescein izotiocijanat (prema engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	prednji rasap (prema engl. <i>forward scatter</i>)
gp130	glikoprotein 130 (prema engl. <i>glycoprotein 130</i>)
hIL-6	Hyper-IL-6
HMBS	hidroksimetilbilan sintaza (prema engl. <i>hydroxymethylbilane synthase</i>)
IFN- β	interferon β

IL	interleukin
IL-6	interleukin 6
IL-6R	receptor za interleukin 6 (prema engl. <i>interleukin-6 receptor</i>)
IQR	interkvartilni raspon (prema engl. <i>interquartile range</i>)
JAK	Janus-kinaza (prema engl. <i>Janus kinase</i>)
LPR5/6	protein 5/6 povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće (prema engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>)
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (prema engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mIL-6R	membranski IL-6 receptor
MSC	mezenhimalne matične stanice (prema engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
OCN	osteokalcin (prema engl. <i>osteocalcin</i>)
OPG	osteoprotegerin
OPN	osteopontin
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PE	fikoeritrin (prema engl. <i>phycoerythrin</i>)
PGE2	prostaglandin E2
PI3K/AKT	fosfoinozimid-3-kinaza/AKT (prema engl. <i>phosphoinositide 3-kinase/AKT</i>)
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze (prema engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RANK	aktivirajući receptor nuklearnog faktora κ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor κB</i>)
RANKL	ligand aktivirajućeg receptora nuklearnog faktora κ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (prema engl. <i>ribonucleic acid</i>)
Runx2	transkripcijski faktor 2 povezan s Runtom (prema engl. <i>Runt-related transcription factor 2</i>)

Sca1	matični stanični antigen 1 (prema engl. <i>stem cell antigen-1</i>)
SD	standardna devijacija (prema engl. <i>standard deviation</i>).
sgp130	solubilni ili topljivi glikoprotein 130 (prema engl. <i>soluble glycoprotein 130</i>)
sgp130:Fc	solubilni glikoprotein 130 dimeriziran putem humanog IgG1 Fc-fragmenta
sIL-6R	solubilni ili topljivi IL-6 receptor (prema engl. <i>soluble IL-6 receptor</i>)
SOCS3	supresor citokinske signalizacije 3 (prema engl. <i>suppressor of cytokine signaling 3</i>)
SSC	postranični rasap (prema engl. <i>side scatter</i>)
STAT	signalni prijenosnik i aktivator transkripcije (prema engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TGF- β	transformirajući faktor rasta β (prema engl. <i>transforming growth factor-β</i>)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze α (prema engl. <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. <i>tartarate-resistant acid phosphatase</i>)
YAP	prema engl. <i>Yes-associated protein</i>
Wnt	prema engl. <i>Wingless-related integration site</i>

SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
1.1. Koštano tkivo.....	1
1.2. Razvoj osteoblasta.....	1
1.3. Djelovanje upale na kost.....	2
1.4. Interleukin 6.....	3
1.5. Ciljana modulacija signaliziranja IL-6.....	4
2. HIPOTEZA.....	6
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	6
3.1. Opći cilj.....	6
3.2. Specifični ciljevi.....	6
4. MATERIJAL I METODE.....	7
4.1. Plan pokusa.....	7
4.2. Pokusne životinje.....	7
4.3. Osteoblastogena stanična kultura.....	7
4.4. Tretmani kultura modulatorima signaliziranja citokinom IL-6.....	8
4.5. Detekcija i brojanje kolonija osteoblasta.....	8
4.6. Protočno-citometrijska analiza.....	9
4.7. Izolacija RNA i analiza genskog izražaja postupkom lančane reakcije polimeraze.....	10
4.8. Statistička analiza.....	12
5. REZULTATI.....	13
5.1. Kultivirane stanice koštane srži imaju fenotip nezrelih osteoblastnih prethodnika te sazrijevaju u osteoblaste koji izražavaju maturacijski biljeg ALP.....	13
5.2. Mišji osteoblasti tijekom sazrijevanja izražavaju diferencijacijske biljege osteoblastne loze te obje podjedinice receptora za citokin IL-6.....	16

5.3. Učinak različitih doza agonista signalizacijskih puteva IL-6 (IL-6 i hIL-6) na diferencijaciju osteoblasta u staničnoj kulturi	18
5.4. Učinak različitih doza antagonista signalizacijskih puteva IL-6 (anti-IL-6 i sgp130:Fc) na diferencijaciju osteoblasta u staničnoj kulturi	18
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI.....	24
8. ZAHVALE.....	25
9. POPIS LITERATURE.....	26
10. SAŽETAK.....	28
11. SUMMARY.....	29
12. ŽIVOTOPIS.....	30

1. UVOD

1.1. Koštano tkivo

Kost je mineralizirano vezivno tkivo sastavljeno od stanica (osteoblasta, osteoklasta, obložnih stanica i osteocita) i međustanične tvari. U organizmu koštano tkivo ima brojne uloge poput lokomocije, potpore i zaštite mekih tkiva, skladištenja kalcija i fosfata, a sadrži i koštanu srž (Florencio-Silva *i sur.* 2015). Osteoblasti su stanice koštanoga tkiva koje potiču koštanu izgradnju i zajedno s osteoklastima sudjeluju u koštanoj pregradnji. Koordinirana kontrola pregradnje kosti ostvaruje se djelovanjem aktivirajućeg receptora nuklearnog faktora κB (RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB*) na osteoklastima i liganda aktivirajućeg receptora nuklearnog faktora κB (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*) na osteoblastima. Osteoklasti su velike multinuklearne stanice hematopoetskog podrijetla koje resorbiraju kost stvaranjem kiselog okoliša mehanizmom protonske pumpe te lučenjem proteaza poput kisele fosfataze otporne na tartarat (TRAP, prema engl. *tartarate-resistant acid phosphatase*) (Epsley *i sur.* 2021). Osteoblasti potječu iz stanične linije mezenhimalnih stromalnih stanica, a nakon što završe aktivnu koštanu izgradnju mogu odumrijeti apoptozom ili se dalje diferencirati u obložne stanice ili u osteocite (Roeder *i sur.* 2016). Osteociti čine preko 90% koštanih stanica, a nalaze se unutar lakuna okruženih mineraliziranim koštanim matriksom. Oni imaju mehanosenzitivnu funkciju pretvarajući mehaničke u biokemijske signale kojim upravljaju procesom koštane pregradnje te proizvode čimbenike koji utječu na aktivnost osteoblasta i osteoklasta. Sve vrste koštanih stanica zajedno čine anatomsku i funkcionalnu višestaničnu jedinicu (BMU, prema engl. *basic multicellular unit*) koja koordinira procese koštane pregradnje. Taj je proces pod kontrolom lokalnih faktora (faktori rasta i citokini) te sistemnih faktora, kao što su kalcitonin i estrogen, koji sveukupno pridonose koštanoj homeostazi. Neravnoteža između razgradnje i izgradnje kosti može rezultirati koštanom bolešću (Florencio-Silva *i sur.* 2015).

1.2. Razvoj osteoblasta

Osteoblasti potječu od mezenhimalnih matičnih stanica (MSCs, prema engl. *mesenchymal stem cells*) koje se nalaze unutar populacije stromalnih stanica koštane srži. MSCs su multipotentne stanice koje se, ovisno o specifičnim faktorima prisutnima u mikrookolišu, mogu diferencirati u osteoblaste, adipocite ili hondrocite. Diferencijacija prema lozi osteogenih stanica odvija se aktivacijom transkripcijskog faktora Runx2 (prema engl. *Runx-related transcription factor 2*) te pokretanjem signalnog puta koštanih morfogogenetskih proteina (BMPs, prema engl. *bone morphogenic proteins*) i signalnog puta Wnt (Wingless/Int-1)/ β -katenin.

Daljnja diferencijacija osteoprogenitornih stanica napreduje usporedo s transkripcijom ranih osteoblastnih gena, poput alkalne fosfataze (ALP, prema engl. *alkaline phosphatase*) i alfa-1 lanca kolagena tipa I (COL1A1, prema engl. *collagen1 α 1*), čiji se izražaj nastavlja i u zrelih osteoblasta zajedno s drugim uobičajenim osteoblastnim biljezima kao što su osteopontin (OPN, prema engl. *osteopontin*), koštani sijaloprotein II (BSP II, prema engl. *bone sialoprotein II*) i osteokalcin (OCN, prema engl. *osteocalcin*) (Ponzetti i Rucci 2021). Sa sazrijevanjem osteoblasti prolaze i morfološke promjene čime postaju velike kuboidalne stanice koje proizvode koštani matriks, a na svojoj površini izražavaju RANKL, što dodatno potiču proupalni citokini, glukokortikoidi, manjak estrogena i hiperparatireoidizam (Florencio-Silva *i sur.* 2015). Citokin RANKL se veže na receptor RANK na površini osteoklasta i njihovih prethodnika potičući osteoklastogenezu. Osteoblasti, zajedno s limfocitima B, izlučuju i neutralizirajući receptor osteoprotegerin (OPG) koji se veže za RANKL, čime sprječava njegovu interakciju s receptorom RANK, a time i stvaranje zrelih osteoklasta (Epsley *i sur.* 2021).

1.3. Djelovanje upale na kost

Povezanost između upale i koštane homeostaze vrlo je složena, a dobro je poznato kako je odnos između koštanog stvaranja i koštane razgradnje promijenjen u upalnim stanjima kao što su reumatske bolesti i kronična infekcija (Baker-LePain *i sur.* 2011). Općenito se smatra da upala primarno potiče koštanu razgradnju i time remeti koštanu homeostazu (Epsley *i sur.* 2021). Potičući osteoklastogenezu, brojni citokini, poput čimbenika tumorske nekroze (TNF- α , prema engl. *tumor necrosis factor- α*), interleukina 1 (IL-1) i interleukina 6 (IL-6), uzrokuju koštano razaranje te su zato danas terapijska meta u reumatskim bolestima. *Tocilizumab* je monoklonsko protutijelo koje koči učinke citokina IL-6 vežući se za njegov receptor, što se pokazalo uspješnim u suzbijanju sistemne upale i razaranja kosti u reumatoidnom artritisu. S druge strane citokini poput interleukina 4 (IL-4), interleukina 12 (IL-12), interleukina 18 (IL-18) i interferona β (IFN- β) neizravno potiču koštanu izgradnju povisujući omjer citokina OPG u odnosu na RANKL, što koči osteoklastogenezu. Stadij sazrijevanja osteoblasta iznimno je važan u kontroli ravnoteže između koštane razgradnje i izgradnje, jer nezreliji osteoblasti, kao ključni izvor citokina RANKL, potiču osteoklastogenezu i upalno razaranje kosti, dok zreli osteoblasti, proizvedeći OPG, koče te procese. Upalni medijatori također djeluju na funkcije osteoblasta, tako TNF- α sprječava diferencijaciju zrelih osteoblasta inhibicijom izražaja gena za OCN, ALP i Runx2 (Baker-LePain *i sur.* 2011). Nadalje, TNF- α potiče produkciju inhibicijskog proteina Dickkopf-1 (DKK-1) koji veže receptor LPR5/6 signalnog puta Wnt, kočeći razvoj i funkciju osteoblasta te stvaranje kosti. Povećane cirkulirajuće koncentracije DKK-1 također snižavaju koncentraciju neutralizirajućeg receptora OPG, vodeći koštanoj razgradnji. TNF- α potiče limfocite i endotelne stanice na sustavnu proizvodnju citokina RANKL,

dok IL-1 i IL-6 djeluju na osteoblaste kako bi potaknuli sintezu prostaglandina E2 (PGE2), što neizravno potiče sazrijevanje osteoklasta (Epsley *i sur.* 2021). Transformirajući faktor rasta β (TGF- β , prema engl. *transforming growth factor- β*) može se suprotstaviti djelovanju TNF- α , potičući proliferaciju osteoblasta i njihovu regrutaciju na mjesta oštećene kosti. Osteoblasti prisutni na mjestima upale zglobova pokazuju defekt sazrijevanja što je dokazano niskim izražajem biljega zrelosti poput OCN i ALP. Signalni put Wnt ključni je čimbenik povezanosti upalnog procesa i koštanog oštećenja u upalnim stanjima (Baker-LePain *i sur.* 2011). U današnje vrijeme većina je farmakoterapijskih intervencija usmjereno na upalne citokine, ali su strategije za uspješno liječenje i prevenciju koštane patologije uzorkovane upalom još uvijek ograničene (Epsley *i sur.* 2021).

Nasuprot nepovoljnog učinka upale na koštano tkivo u upalnim bolestima, pokazalo se da za cijeljenje kosti nakon prijeloma upala i imunološke stanice imaju povoljan učinak (Grčević *i sur.* 2018). Upalna faza cijeljena kosti započinje neposredno nakon prekida vaskularizacije oko prijeloma i potiče infiltraciju hematoma upalnim stanicama. Infiltrirani makrofazi i neutrofili potiču cijeljenje izlučujući citokine (IL-1, IL-6, TNF- α), kemokine (CCL2, CCL4, CCL5, CXCL12) i brojne faktore rasta (BMP-2, BMP-7, TGF- β) (Lukač *i sur.* 2020). U mišjim modelima izbačenih gena za upalne citokine, kao što su IL-6 i TNF- α , cijeljenje prijeloma je odgođeno (Yang *i sur.* 2007, Gerstenfeld *i sur.* 2003). Primjena neutralizirajućih protutijela anti-IL-6 u ranim fazama cijeljenja smanjuje sustavnu upalu, regrutaciju imunoloških stanica te koštanu regeneraciju, oštećujući time cijeljenje kosti (Prystaz *i sur.* 2018). Uočeno je također da je klasična signalizacija citokinom IL-6 putem receptorskog kompleksa izraženog na membrani ciljne stanice važna za koštanu regeneraciju (Lukač *i sur.* 2020). S obzirom na složeni učinak upale na kost te kontradiktorne nalaze u različitim modelima, postoji potreba za daljnjim istraživanjem učinaka upale i upalnih medijatora na koštane stanice.

1.4. Interleukin 6

IL-6 je pleiotropni citokin od 183 aminokiseline koje tvore četiri α -uzvojnice. Brojne studije pokazale su da je IL-6 važan proupalni citokin izražen tijekom infekcije ili oštećenja tkiva pri čemu pomaže u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru. Pretjerano stvaranje IL-6 može dovesti do kroničnih upalnih bolesti poput reumatoidnog artritisa, ali i do citokinske oluje, odnosno nekontroliranog imunološkog odgovora, primjerice u bolesnika zaraženih patogenim bakterijama i virusima, uključujući SARS-CoV-2, i bolesnika s leukemijom koji su liječeni T-staničnom terapijom (Kang i Kishimoto 2021).

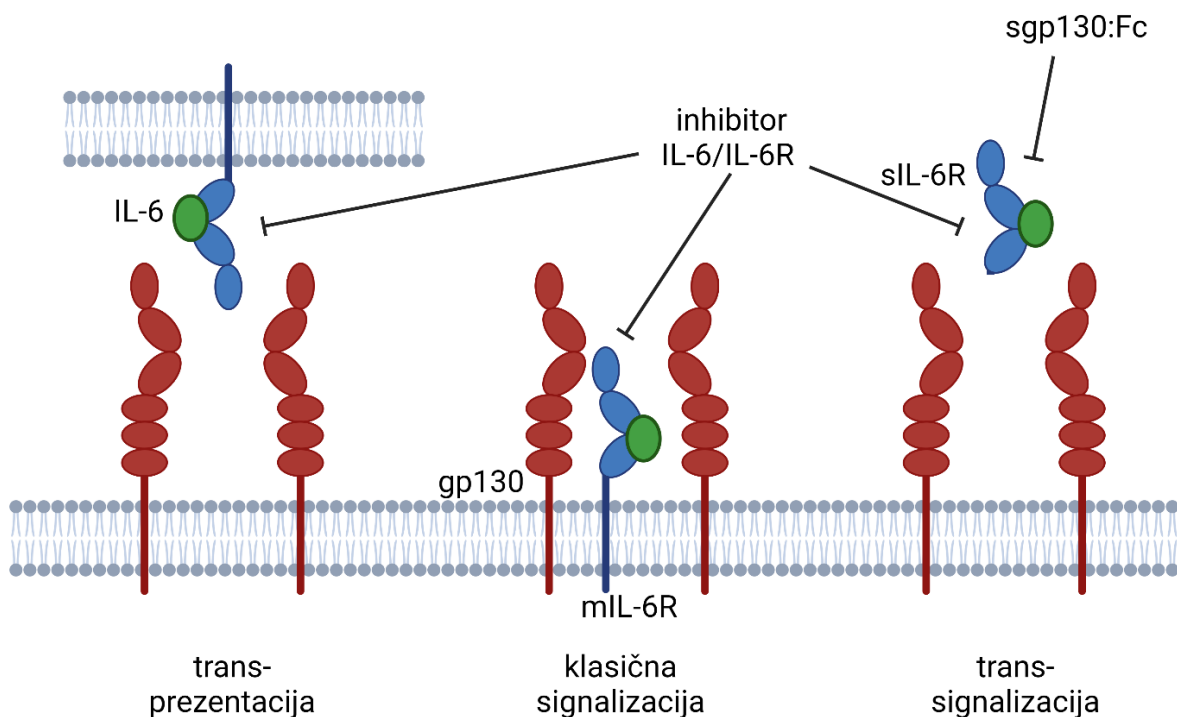
IL-6 postiže svoje učinke klasičnom signalizacijom (ili *cis*-signalizacijom) putem membranski izraženog IL-6-receptora (mIL-6R α -lanac) ili *trans*-signalizacijom putem topljivog ili solubilnog

oblika IL-6-receptora (sIL-6R α -lanac), koji se udružuje sa signalnim glikoproteinom 130 (gp130) (Kang i Kishimoto 2021). Jedan i drugi način signalizacije potiču dimerizaciju podjedinica gp130 i aktivaciju unutarstaničnih signalnih kaskada. U nekim slučajevima IL-6R izražen na jednoj stanici može se udružiti sa podjedinicama gp130 druge stanice, što nazivamo *trans*-prezentacijom (**Slika 1**). Solubilni sIL-6R nastaje različitim molekularnim mehanizmima uključujući alternativno izrezivanje mRNA, proteolizu membranski vezanog receptora i otpuštanje izvanstaničnih vezikula. Membranski mL-6R je tip 1 transmembranskog receptora (stavljen od imunoglobulinu slične domene i dvije domene slične fibronektinu tip III koje slijedi fleksibilna regija, transmembranska i kratka unutarstanična regija), kojeg poglavito izražavaju hepatociti, mišićne stanice, epitelne stanice i različite imunološke stanice uključujući limfocite T i B, monocite, makrofage i megakariocite, čime su podložne klasičnoj signalizaciji citokinom IL-6. S druge strane, gotovo sve tjelesne stanice, s iznimkom granulocita, izražavaju gp130, veliki transmembranski protein koji sadrži šest izvanstaničnih domena, transmembranski dio i unutarstaničnu regiju. Dimerizacija gp130 potiče aktivaciju Janus-kinaza (JAKs, prema engl. *Janus kinases*) koje uz autofosforilaciju, fosforiliraju i specifične tirozinske ostatke na unutarstaničnoj regiji proteina gp130, koji služe kao sidrište za transkripcijske čimbenike proteinske obitelji signalnih prijenosnika i aktivatora transkripcije (STAT, prema engl. *signal transducer and activator of transcription*). Fosforilirani transkripcijski čimbenici STAT dimeriziraju se i premještaju u jezgru te potiču transkripciju ciljanih gena. Jedan od produkata ciljanih gena je supresor citokinske signalizacije 3 (SOCS3, prema engl. *suppressor of cytokine signaling 3*), koji se veže za tirozinski ostatak na gp130 i na kinaze JAK kako bi zaustavio JAK/STAT signalizaciju. Ostale aktivirane signalne kaskade jesu signalni putevi MAPK (prema engl. *mitogen-activated protein kinases*)/ERK (prema engl. *extracellular signal-regulated kinases*), PI3K (prema engl. *phosphoinositide 3-kinase*)/AKT i Src-kinaza/YAP. Topljivi sIL-6R može vezati citokin IL-6 sličnim afinitetom kao membranski mL-6R te nastali kompleks IL-6/sIL-6R djeluje agonistički i može aktivirati brojne stanice putem ubikvitarno izraženog homodimera gp130. Do sada nema dokaza da postoji razlika u unutarstaničnoj signalnoj kaskadi između klasične i *trans*-signalizacije nakon homodimerizacije gp130. Usprkos tome, pretpostavlja se da je regenerativna i protuupalna funkcija IL-6 posredovana klasičnom signalizacijom, dok je *trans*-signalizacija odgovorna je za protumorigene i proupalne učinke, pa njezina selektivna inhibicija pronalazi važnu terapijsku primjenu (Schumertl *i sur.* 2022).

1.5. Ciljana modulacija signaliziranja IL-6

U cilju moduliranja signala citokina IL-6 razvijene su brojne modifikacije citokina i receptorskih podjedinica (Rose-John *i sur.* 2023). Hyper-IL-6 (hIL-6) fuzijski je protein u kojem je C-terminalni kraj sIL-6R spojen s N-terminalnim krajem IL-6 putem fleksibilne peptidne veze.

Pokazalo se da je fuzijski protein hIL-6 višestruko potentniji od pojedinačnih proteina IL-6 i sIL-6R u poticanju jetrene regeneracije, umnožavanju hematopoetskih matičnih stanica, neuronalnoj diferencijaciji i odbacivanju tumorskih stanica. Novija istraživanja pokazala su da taj fuzijski protein uspješno potiče repopulaciju mikroglije u mišjem modelu traumatske ozljede mozga kao i lokomotorni oporavak stražnjih udova nakon nagnječenja kralježnične moždine. Protein sgp130:Fc sastoji se od cjelokupnog izvanstaničnog dijela gp130 dimeriziranog putem humanog IgG1 Fc-fragmenta. Budući da citokin IL-6 ne pokazuje mjerljivi afinitet prema gp130, fuzijski protein sgp130:Fc isključivo koči *trans*-signalizaciju bez da utječe na klasičnu signalizaciju putem membranski vezanog mL-6R (**Slika 1**). Budući da neutralizirajuća protutijela na IL-6 i IL-6R blokiraju i klasičnu i *trans*-signalizaciju, fuzijski protein sgp130:Fc pruža jedinstveno molekularno oruđe za diferencijaciju uloga te dvije vrste signalizacije citokina IL-6. Unazad dvije godine dizajniran je i prvi terapijski pripravak sgp130:Fc (*Olamkicept*), a studije upućuju na protektivnu i regenerativnu ulogu specifične blokade *trans*-signalizacije u raznim upalnim stanjima i tumorima u ljudi (Rose-John 2021).



Slika 1. Tri vrste signalizacije citokinom IL-6. Za aktivaciju unutarstaničnih signalnih puteva, citokin IL-6 se mora vezati za dvije receptorske podjedinice, IL-6R i gp130. IL-6 može vezati membranski IL-6R (mIL-6R), što predstavlja klasični (*cis*-) put signalizacije. *Trans*-signalizacija ostvaruje se kada IL-6 veže topljivi IL-6R (sIL-6R). Membranski oblik mL-6R također može biti prezentiran od strane druge stanice i vezati se na gp130, što se zove *trans*-prezentacija. U svakom od tri vrste IL-6 signalizacije formiran je kompleks između IL-6R s dimeriziranom signalnom podjedinicom gp130, čiji unutarstanični tirozinski nastavak pokreće unutarstanični signalni put. Monoklonsko protutijelo anti-IL-6 ili anti-IL-6R inhibira sva tri tipa IL-6 signalizacije, dok topljivi gp130 vezan za Fc-fragment (sgp130:Fc) inhibira samo *trans*-signalizaciju. Created with BioRender.com

2. HIPOTEZA

Različiti oblici signalizacije citokina IL-6 (*cis*- i *trans*-) imaju različit učinak na sazrijevanje mišjih stanica osteoblastne loze izdvojenih iz koštane srži, s tim da smo pretpostavili da klasično ili *cis*-signaliziranje potiče, dok *trans*-signaliziranje koči sazrijevanje osteoblasta, stoga smo očekivali da kočenje *trans*-signalizacije, koja je posebice izražena u upalnim stanjima, djeluje poticajno na sazrijevanje mišjih osteoblasta.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Cilj ovoga rada bio je istražiti djelovanje različitih doza agonista i antagonista signaliziranja citokinom IL-6 na sazrijevanje stanica osteoblastne loze uzgojenih u osteoblastogenim kulturama iz mišje koštane srži *in vitro*.

3.2. Specifični ciljevi

1. Optimizirati uvjete osteoblastogene kulture stanica mišje koštane srži te utvrditi fenotip nezrelih stanica osteoblastogene loze uzgojenih *in vitro*.
2. Utvrditi izražaj diferencijacijskih osteoblastnih gena te izražaj podjedinica receptora za IL-6 (α -lanac i gp130) tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*.
3. Testirati učinak primjene agonista citokina IL-6 (citokin IL-6 i fuzijski protein hIL-6 koji se sastoji od citokina IL-6 i α -lanca receptora za IL-6) u osteoblastogenim kulturama.
4. Testirati učinak primjene antagonista citokina IL-6 (protutijelo anti-IL-6 i sgp130:Fc koji se sastoji od topljivog lanca gp130 i Fc-fragmenta protutijela) u osteoblastogenim kulturama.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Plan pokusa

U prvom setu pokusa stanice koštane srži miševa soja B6 (C57BL/6) zasađene su u staničnoj kulturi s kultivacijskim medijem te je protočno-citometrijskom analizom utvrđen fenotip stanica prije sađenja i sedmog dana kulture te su optimizirani daljnji uvjeti osteoblastogene kulture. U drugom setu pokusa osteoblasti su analizirani tijekom više vremenskih točaka diferencijacije izolacijom ribonukleinske kiseline (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*), obrnutim prepisivanjem u komplementarnu deoksiribonukleinsku kiselinu (cDNA, prema engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) te metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time qPCR, prema engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) radi utvrđivanja izražaja karakterističnih diferencijacijskih osteoblastnih gena te podjedinica receptora za IL-6. U zadnjem setu pokusa učinjeni su tretmani kultura *in vitro* modulatorima signaliziranja citokinom IL-6 kako bi se testirao učinak različitih doza agonista i antagonistu u osteoblastogenim kulturama. Osteoblastne kolonije obojane su na enzim ALP, a njihova je veličina utvrđena računalnim programom za analizu slika.

4.2. Pokusne životinje

U pokusima su korišteni uzorci tkiva (koštana srž dugih kostiju koja sadrži mezenhimalne stromalne stanice s osteoblastogenim potencijalom) mužjaka mišjeg visokorođenog soja B6 (C57BL/6), starosti 12-14 tjedana, uzgojenih u nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusi su izvedeni u okviru projekta za koji je izdana dopusnica Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja Ministarstva poljoprivrede (UP/I-322-01/18-01/50, 14. 11. 2018.) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (641-01/18-02/01, 19. 09. 2018.). Postupke sa živim životinjama provodili su za to osposobljeni istraživači Laboratorija za molekularnu imunologiju s važećim dopusnicama Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja Ministarstva poljoprivrede.

4.3. Osteoblastogena stanična kultura

Jednostanična suspenzija koštane srži pripremljena je pomoću 1 mL minimalnog esencijalnog medija α (α -MEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i igle veličine 23G kojima smo ispuhali koštanu srž iz femoralne i tibijalne kosti miševa. Ponavljanim istrčavanjem otopine iglom razbili smo cilindre koštane srži i pripremili jednostanične suspenzije stanica. Kako bismo odredili koncentraciju stanica koristili smo Bürker-Türkovu komoricu, uz

isključivanje mrtvih stanica bojenjem u 0,05%-tnom tripanskom plavilu u omjeru 1:10. Stanice smo resuspendirali u mediju α -MEM s 10% fetalnog telećeg seruma (FCS, prema engl. *fetal calf serum*), 1% PenStrep i 1% Glutamax. Zasadili smo 1 mL dobivene suspenzije na pločicu s 24 zdenaca, u koncentraciji $1,5 \times 10^6$ stanica po zdencu, a preostale prazne rubne zdence ispunili smo destiliranom vodom radi ujednačenijih uvjeta vlage. Stanice su inkubirane na 37°C u vlažnom zraku s 5% CO₂. Četvrti dan stanične kulture izmijenili smo 0,5 mL medija. Medij se mijenja da bi se uklonile hematopoetske stanice, a obogatile adherentne stromalne stanice u zdencu. Sedmi dan stanične kulture zamijenili smo cijeli medij i u zdence dodali 1 mL diferencijacijskog medija koji se sastoji od medija α -MEM s 10% FCS, 1% PenStrep i 1% Glutamax s dodatkom 8 mM β -glicerofosfata i 50 μ g/mL askorbinske kiseline. Od tog trenutka, diferencijacijski medij mijenjali smo u potpunosti svaki drugi dan stanične kulture, do 14. dana, kada smo fiksirali stanice na pločici pomoću 96%-tnog etanola koji smo u količini 1 mL po zdencu ostavili 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega smo zdence pažljivo isprali destiliranom vodom.

4.4. Tretmani kultura modulatorima signaliziranja citokinom IL-6

U pokusima su kao agonisti signala IL-6 korišteni: mišji rekombinantni IL-6 – agonist klasičnog signalizacijskog puta i hIL-6, fuzijski protein sIL6-R i IL-6 – agonist *trans*-signalizacije. U drugom setu pokusa testiran je učinak antagonista signaliziranja citokinom IL-6: neutralizacijsko protutijelo anti-IL-6 – antagonist klasične i *trans*-signalizacije te sgp130:Fc, gp130 dimeriziran putem humanog IgG1 Fc-fragmenta – antagonist *trans*-signalizacije. Sedmi dan stanične kulture, usporedo s dodavanjem 1 mL diferencijacijskog medija, započeli smo tretiranje *in vitro* kultura dodatkom tri različite doze agonista i antagonista kako bismo testirali učinak dodanih modulacijskih reagensa na diferencijaciju osteoblasta ovisno o primijenjenoj dozi. Reagense i diferencijacijski medij u potpunosti smo mijenjali svaki drugi dan stanične kulture sve do 14. dana, kada smo fiksirali stanice u zdencima i analizirali diferencirane ALP⁺ kolonije. Primijenjene doze za rekombinantni IL-6 bile su: 6,25 ng/mL, 25 ng/mL i 100 ng/mL; za anti-IL-6: 0,125 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 2 μ g/mL; za fuzijski protein hIL-6: 6,25 ng/mL, 25 ng/mL, 100 ng/mL i za fuzijski protein sgp130:Fc: 0,125 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 2 μ g/mL. Svi reagensi poklon su profesora Stefana Rose-Johna, Biochemical Institute, Medical Faculty, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany, u okviru suradnje s prof. Dankom Grčević.

4.5. Detekcija i brojanje kolonija osteoblasta

Nakon fiksacije etanolom, stanice smo obojali na izražaj enzima ALP tako da smo neposredno prije pripremili boju redom miješajući 1 M Tris, destiliranu vodu, magnezijev-klorid heksahidrat,

naftol fosfat Mx prethodno otopljen u N-N-dimetilformamidu i FastRed TR. U svaki zdenac dodali smo 400 μ L pripremljene boje i inkubirali stanice 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Pločicu smo potom isprali i ostavili da se osuši na zraku. Sve su pločice s osteoblastnim kolonijama fotografirane. Slike pločica korištene su za kompjutersku analizu udjela površine zdenca prekrivenog detektiranim ALP⁺ osteoblastnim kolonijama pomoću računalnog programa Fiji za obradu slika.

U pokusim optimizacije osteoblastogene kulture uz bojanje na izražaj enzima ALP, za detekciju svih kolonija adherentnih stanica korištena je boja metilensko plavilo tako da su stanice prethodno fiksirane etanolom kako je opisano, a nakon toga obojane 2%-tnim metilenskim plavilom u 50% etanolu i inkubirane tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Za detekciju mineraliziranih kolonija, koje predstavljaju krajnji stupanj diferencijacije osteoblasta, stanice su fiksirane u 4%-tnim paraformaldehidu tijekom 5 minuta, a zatim su obojane otopinom 2%-tnog Alizarin Red S u vodi (pH 4.1-4.3) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Pločicu smo potom isprali destiliranom vodom i ostavili da se osuši na zraku.

4.6. Protočno-citometrijska analiza

Sedmi dan kulture koštane srži, stanice smo isprali fosfatnim puferom puferiranom fiziološkom otopinom (PBS, prema engl. *phosphate-buffered saline*) i na stanice smo potom dodali 0,5 mL TripLE Express enzima te je pločica inkubirana 10 minuta na 37°C da bismo odvojili adherentne stanice. Nakon vizualne potvrde odvajanja stanica od dna zdenca, suspenziju stanica prikupili smo u epruvete uz dodatak otopine PBS s 2% FCS (PBS/2%FCS), centrifugirali 5 minuta na brzini 250xg te odlili nadtalog. Kao uzorak za usporedbu adherentnih stromalnih stanica koštane srži koristili smo suspenziju svježe izolirane koštane srži. Na stanični talog dodali smo komercijalno dostupna monoklonska protutijela konjugirana s fluorescentnim bojama (**Tablica 1**) te su stanice inkubirane 30 min na 4°C u mraku. Stanice smo oprali dodatkom 1 mL PBS/2%FCS, centrifugirali 5 min na 250xg i odlili nadtalog. Stanicama smo na kraju dodali 0,2 mL PBS/2%FCS i 2,5 μ L boje 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) za označavanje mrtvih stanica prije propuštanja na protočnom citometru BD FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Uzorke smo analizirali u računalnom programu FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, SAD), a analizu izražaja pojedinih biljega odredili smo koristeći pripadajući neobojeni uzorak kao kontrolu. Prvo smo na prikazu prednjeg rasapa (FSC, prema engl. *forward scatter*) i postraničnog rasapa (SSC, prema engl. *side scatter*) odabrali populaciju stanica iz kojih smo zatim na prikazu omjera površine i visine stanica na FSC (FSC-A i FSC-H, prema engl. *FSC-area* i *FSC-height*) odabrali populaciju jednostrukih stanica. Zatim smo na temelju izražaja boje 7-AAD iz analize isključili mrtve stanice i potom odabrali

stromalne stanice kao stanice koje ne izražavaju biljege hematopoetskih (CD45), eritroidnih (Ter119) i endotelnih (CD31) stanica. Na navedenoj populaciji stanica analizirali smo izražaj biljega mezenhimalne osteogene loze: Sca1 (prema engl. *stem cell antigen-1*), CD90.2, CD200, CD105, CD51 i CD44 paralelno na kultiviranim stromalnim stanicama i svježe izoliranim stanicama koštane srži.

Tablica 1. Konjugirana monoklonska protutijela za protočno-citometrijsku analizu

Biljeg	Klon	Fluorokrom	Proizvođač
Sca1	D7	Pacific Blue	BioLegend (San Diego, CA, SAD)
CD90.2	53-2.1	FITC	eBiosciences (San Diego, CA, SAD)
CD200	OX90	PE	eBiosciences (San Diego, CA, SAD)
CD105	MJ7/18	PE/Cyanine7	eBiosciences (San Diego, CA, SAD)
CD51	RMV-7	PE-CF594	BioLegend (San Diego, CA, SAD)
CD31	390	APC	BioLegend (San Diego, CA, SAD)
CD45	30-F11	APC	BioLegend (San Diego, CA, SAD)
TER-119	TER-119	APC	eBiosciences (San Diego, CA, SAD)
CD44	IM7	APC-eFluor™ 780	eBiosciences (San Diego, CA, SAD)

4.7. Izolacija RNA i analiza genskog izražaja postupkom lančane reakcije polimeraze

U ovom dijelu pokusa korištene su Eppendorf epruvete bez onečišćenja nukleinskim kiselinama ili nukleazama te nastavci za pipete s filterom kako ne bi došlo do onečišćenja među uzorcima. Izolacija RNA iz više vremenskih točaka staničnih kultura osteoblasta započeta je uklanjanjem medija te ispiranjem otopinom PBS. Kada smo uklonili PBS, u zdence je ravnomjerno raspoređeno 1 mL otopine za izolaciju RNA (TRIzol, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Dobivenu otopinu u svakom smo zdencu žustro pomiješali pipetom, potom smo skupili sadržaj svakog zdenca i ostavili da se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dodali smo zatim 200 µL kloroforma za izolaciju RNA i dobro protresli epruvetu. Nakon 2 minute inkubacije na sobnoj temperaturi, centrifugiranjem na 12000xg u vremenu od 15 minuta na temperaturi 4°C, razdvojili smo sadržaj epruvete u tri sloja. Donji sloj sadrži bjelančevine, srednji sloj sadrži DNA, a gornja vodena faza sadrži RNA, te smo njega pažljivo otpipetirali u čistu epruvetu. Za precipitaciju RNA dodali smo 70%-tni izopropanol u omjeru 1:1 te ostavili uzorke na -20°C preko noći. Sljedeći dan smo uzorke centrifugirali 30 minuta na 12000xg na temperaturi 4°C. Nakon odlijevanja nadtaloga, talog RNA ispran je dodatkom 1 mL 75%-tnog etanola. Uzorci su potom centrifugirani 15 minuta na 7500xg i temperaturi 4°C. Zatim smo odlili etanol, a epruvete ostavili otvorene kako bi se talog RNA osušio na zraku i preostali etanol ishlapio tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Talog

RNA potom je otopljen u 20 μ L destilirane vode uz dobro miješanje pipetom. Koncentracija i čistoća izolirane RNA izmjerena je pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD).

Za obrnuto prepisivanje, tj. reverznu transkripciju izdvojene RNA u cDNA, odvojili smo 1-2 μ g izolirane RNA iz svakog uzorka. Za taj postupak korišten je komercijalno dostupni set kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). Prema uputama proizvođača, izoliranoj RNA dodano je 2 μ L RT-pufera, 0,8 μ L deoksiribonukleotida, 2 μ L početnica, 1 μ L mješavine enzima reverzne transkriptaze, 0,5 μ L inhibitora RNaza te destilirane vode do volumena od 20 μ L. Uzorci su potom inkubirani 120 minuta na temperaturi od 37°C u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), a reakcija je zaustavljena grijanjem 5 minuta na 95°C. Dobivena cDNA pohranjena je potom u zamrzivaču na -20°C do postupka umnažanja.

Kako bismo odredili izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena i podjedinica receptora za IL-6 (IL-6R i gp130) koristili smo postupak qPCR u stvarnom vremenu (real-time qPCR) pomoću uređaja ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Korišteni su komercijalno dostupni setovi kemikalija za detekciju TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Gene Expression Assay sadrži početnice i probe koje su specifične za ciljne gene. Fluorescentna boja 6-FAM obilježava probe na njihovom 5'-kraju dok je 3'-kraj proba obilježen prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). TaqMan Gene Expression Master mix sadrži DNA polimerazu (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems) i deoksiribonukleotide u odgovarajućoj puferskoj otopini. U optičku pločicu s 96 zdenaca (ABI Prism Optical 96- Well Plate, Applied Biosystems) ispipetirali smo uzorke s reakcijskom smjesom. Optička pločica prvo se inkubira 2 minute na 50 °C čime se aktivira uracil N-glikozilaza (AmpErase; Applied Biosystems) koja svojom enzimskom aktivnošću uklanja vezani uracil. Slijedi 10 minuta inkubacije na 95°C kako bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala. Pritom se aktivira DNA polimeraza čime započinje umnažanje DNA. Odvija se 40 naizmjeničnih ciklusa inkubacije na 95°C od 15 sekundi, pri čemu dolazi do denaturacije DNA, te na 60°C od 60 sekundi, pri čemu dolazi do vezanja početnica i stvaranja komplementarnog lanca DNA. Proba se veže na cDNA ciljnog gena, a DNA polimeraza produljuje početnice te pritom cijepa probu pri čemu se prigušivač NFQ odvaja od fluorescentne boje 6-FAM što izaziva pojavu fluorescencije. Fluorescentni signal, čiji se intenzitet mjeri, proporcionalan je broju umnoženih fragmenata DNA. Dobiven je grafički prikaz s brojem ciklusa na apscisi, a intenzitetom fluorescencije na ordinati koji je logaritamski određen kao razlika izmjerene vrijednosti fluorescentnog signala i pozadinskog signala fluorescencije. Prag vrijednosti fluorescencije određen je sredinom eksponencijalnog rasta

krivulje umnažanja, pri kojem je izmjereni fluorescentni signal veći od pozadinskog signala, a za postizanje tog praga potom je određen i kritični broj ciklusa (CT, prema engl. *cycle threshold*) zaslužan za interpretaciju relativne količine RNA ispitivanih gena. Standardnom krivuljom serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzorka analiziranih stanica (cDNA izolirana iz kalibracijskog uzorka sedmi dan kulture), određena je relativna količina cDNA. Relativna količina glasniče RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*) ispitivanih gena izražena je u odnosu na mRNA ubikvitarno izraženih endogenih kontrolnih gena β -aktina (ACTB, prema engl. *β -actin*) ili HMBS (Tablica 2).

Tablica 2. TaqMan eseji korištenih u analizi postupkom qPCR u stvarnom vremenu

Analizirani gen	Simbol gena	Identifikacijski broj
RANKL	<i>Tnfsf11</i>	Mm00441906_m1
Alkalna fosfataza	<i>Alpl</i>	Mm00475834_m1
OPG	<i>Tnfrsf11b</i>	Mm00435452_m1
Osteokalcin	<i>Bglap</i>	Mm03413826_mH
Runx2	<i>Runx2</i>	Mm00501584_m1
IL-6 receptor, alfa	<i>Il6ra</i>	Mm00439653_m1
gp130	<i>Il6st</i>	Mm00439665_m1
β -actin	<i>ACTB</i>	Mm02619580_g1
HMBS	<i>HMBS</i>	Mm01143545_m1

4.8. Statistička analiza

Provedeno je testiranje normalnosti raspodjele podataka D'Agostino-Pearsonovim testom. Normalno raspodijeljeni podatci (izražaj gena) prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD, prema engl. *standard deviation*). Podatci koji su odstupali od normalne raspodjele (površina osteoblastnih kolonija) prikazani su kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR, prema engl. *interquartile range*). Za usporedbu skupina pri analizi izražaja gena korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) sa Student-Newman-Keul *post-hoc* testom za određivanje razlika između pojedinih skupina. Za usporedbu skupina pri analizi površine osteoblastnih kolonija korišten je Kruskal-Wallis test s Conover *post-hoc* testom za određivanje razlika između pojedinih skupina. Statističke analize su učinjene pomoću programa MedCalc, verzije 9.4.2.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). U svim testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost α) postavljena je vrijednost $p < 0,05$.

5. REZULTATI

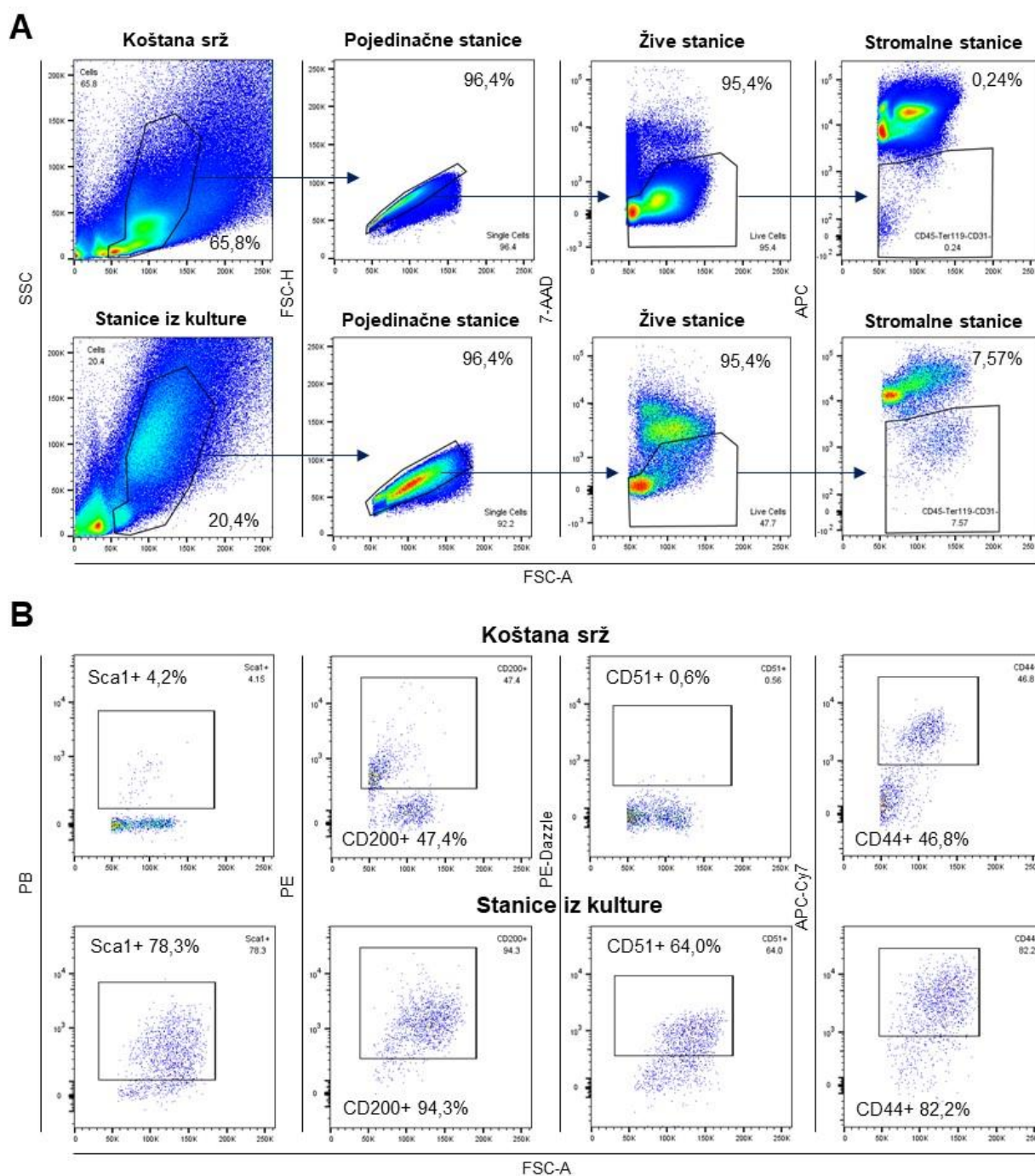
5.1. Kultivirane stanice koštane srži imaju fenotip nezrelih osteoblastnih prethodnika te sazrijevaju u osteoblaste koji izražavaju maturacijski biljeg ALP

U prvom nizu pokusa cilj nam je bio potvrditi da stanice koštane srži neposredno prije dodavanja diferencijacijskih čimbenika izražavaju biljege karakteristične za nezrele osteoblastne stanice te se dalje mogu diferencirati u zrele osteoblaste *in vitro*.

Da bi potvrdili fenotip nezrelih osteoblastnih prethodnika, stanice mišje koštane srži prikupili smo ispiranjem koštanih šupljina dugih kostiju i uzgajali ih u staničnoj kulturi tijekom sedam dana u kultivacijskom mediju α -MEM obogaćenom serumom FCS. Adherentne stanice odvojene su od površine plastičnih zdenaca te analizirane pomoću protočnog citometra usporedno sa svježe izoliranim stanicama koštane srži. Za utvrđivanje fenotipa stromalnih mezenhimalnih stanica koje uključuju osteoblastne prethodnike koristili smo izravno konjugirana fluorescentna protutijela za biljege hematopoetskih i endotelnih stanica (CD45, Ter119, CD31) te biljege mezenhimalne loze (Sca1, CD90, CD105, CD200, CD51, CD44).

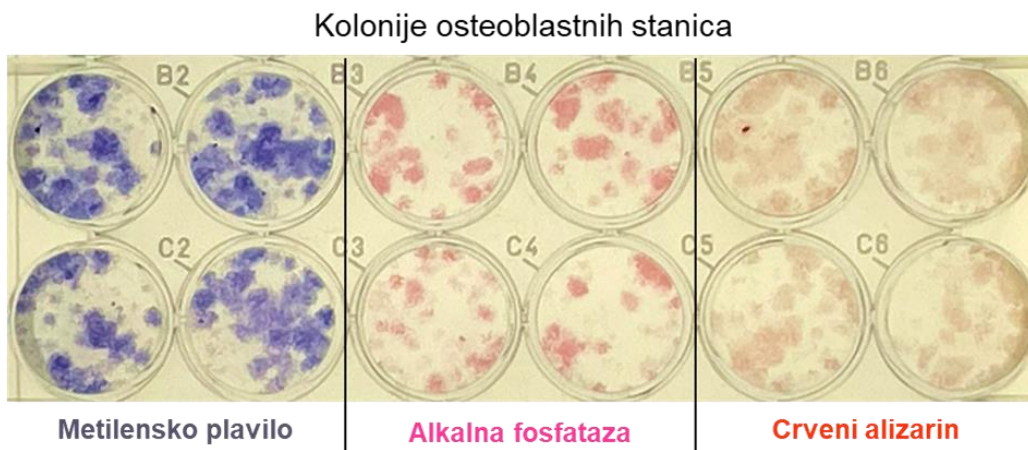
Strategija analize izrađena je tako da smo najprije odabrali populaciju stanica prema značajkama veličine i granuliranosti u svim događajima, zatim populaciju jednostrukih stanica (prema površini i širini signala) te populaciju živih stanica (7-AAD-negativnih) (**Slika 2**). 7-AAD obilježava nukleinske kiseline u mrtvim stanicama koje su izgubile integritet stanične membrane (Schmid *i sur.* 1992). Zatim smo isključili populaciju hematopoetskih i endotelnih stanica, a unutar odabrane trostruko-negativne populacije (CD45-Ter119-CD31-) koja sadrži stromalne mezenhimalne stanice analizirali smo izražaj pojedinih biljega (Sca1, CD90, CD105, CD200, CD51, CD44), koji se uobičajeno koriste za identifikaciju osteoblastnih prethodnika (Lukač *i sur.* 2020, Grčević *i sur.* 2018).

Rezultati analize pokazali su kako je odabrana populacija pojedinačnih živih stanica izoliranih sedmog dana stanične kulture obogaćena mezenhimalnim stromalnim stanicama u odnosu na istu populaciju stanica koštane srži, jer je udio trostruko-negativnih stanica CD45-Ter119-CD31- u populaciji iz stanične kulture 7,57%, što je znatno više od 0,24 % u svježe izoliranoj koštanoj srži (**Slika 2A**). Prethodnim istraživanjima potvrđeno je da identificirana obogaćena populacija adherentnih mezenhimalnih stromalnih stanica, koje stvaraju kolonije, te su fenotipa CD45-Ter119-CD31- (ne pripadaju ni hematopoetskoj niti endotelnoj lozi), posjeduje sposobnost *in vitro* diferencijacije u tri različite stanične loze: adipocite, hondroblaste i osteoblaste. Time ta populacija ispunjava funkcionalne i morfološke kriterije za osteoblastne prethodnike (Lukač *i sur.* 2020, Roeder *i sur.* 2016).



Slika 2. Protočno-citometrijska analiza nezrelih osteoblastnih prethodnika uzgojenih iz mišjih stanica koštane srži. Jednostanične suspenzije svježe izoliranih stanica koštane srži i stanica koštane srži uzgajanih sedam dana *in vitro* analizirane su protočno-citometrijski. Točkastim grafikonima prikazani su reprezentativni uzorci. **A.** Zastupljenost trostruko-negativne populacije (CD45-Ter119-CD31-) koja ne sadrži hematopoetske i endotelne stanice, unutar populacije pojedinačnih živih stanica svježe izolirane koštane srži i adherentnih stanica sedmi dan kulture. **B.** Izražaj biljega osteoblastnih prethodnika (Sca1, CD200, CD51, CD44) unutar odabrane populacije trostruko-negativnih mezenhimalnih stromalnih stanica (CD45-Ter119-CD31-) svježe izolirane koštane srži i adherentnih stanica sedmi dan kulture.

Obogaćena populacija mezenhimskih stromalnih stanica u velikom udjelu sadrži osteoblastne prethodnike, što smo fenotipski potvrdili analizom izražaja uobičajenih membranskih biljega tih stanica: matični stanični antigen Sca1, OX-2 membranski glikoprotein ili CD200, integrin alfa V ili CD51 te membranski glikoprotein CD44. Za sve analizirane biljege u kulturi je uočen porast udjela unutar stromalne populacije CD45-Ter119-CD31- (**Slika 2B**). Udio Sca1⁺ stromalnih stanica je 78,3 % u kulturi, što je znatno više u odnosu na 4,2 % u koštanoj srži. Porast bilježe i stromalne stanice CD200⁺ (94,3 % u kulturi u odnosu na 47,4 % u koštanoj srži), CD51⁺ (64,0 % u kulturi u odnosu na 0,6 % u koštanoj srži) te CD44⁺ (82,2 % u kulturi u odnosu na 46,8 % u koštanoj srži) (**Slika 2B**). Nasuprot tome, stromalne stanice iz kulture i koštana srž izražavale su podjednak udio stanica CD90⁺ (oko 10%) i CD105⁺ (oko 40%). Iz rezultata možemo zaključiti da je kultivirana populacija stanica bogata osteoblastnim prethodnicima, koji se daljnjim dodatkom diferencijacijskog medija mogu razviti u zrele osteoblaste.



Slika 3. Reprezentativni prikaz osteoblastne diferencijacije u staničnoj kulturi usporedbom tri postupka bojenja stanica. Stanice koštane srži kultivirane su tijekom 14 dana, a od sedmog dana kulture tretirane su diferencijacijskim medijem. **Lijevo** su prikazani zdenci sa staničnim kolonijama bojenim metilenskim plavilom, koje boja sve adherentne stanice. U **sredini** je prikazano bojenje na prisutnost enzima alkalne fosfataze, kao biljega osteoblastne loze. **Desno** je prikazano bojenje crvenim alizarinom, čime su vidljivi kalcijски depoziti koje stvaraju zreli osteoblasti.

Diferencirane osteoblastne kolonije bojane su trima različitim postupcima (**Slika 3**). Metilenskim plavilom obojene su sve stanične kolonije prisutne u zdencima, bojenje na prisutnost enzima ALP specifično boji diferencirane osteoblaste, a crveni alizarin uobičajeno se koristi za detekciju mineraliziranog matriksa koji stvaraju osteoblasti u kasnim stadijima diferencijacije. Usporedbom obojenih zdenaca na slici možemo uočiti kako osteoblasti čine većinu ukupnih kolonija kultiviranih stanica, čime je pokazano da su uvjeti kultivacije stanica koštane srži uspješno optimizirani za diferencijaciju osteoblasta.

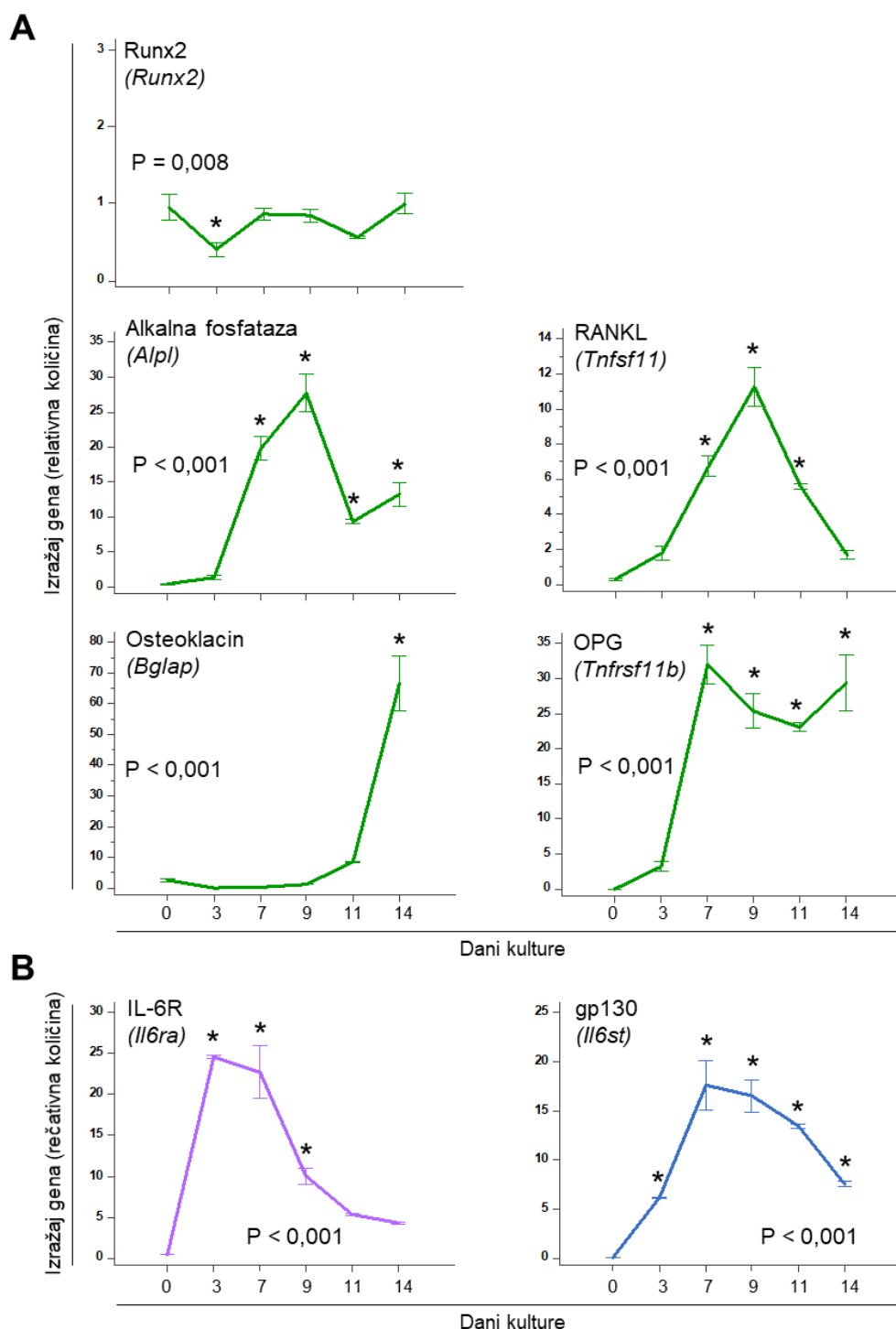
5.2. Mišji osteoblasti tijekom sazrijevanja izražavaju diferencijacijske biljege osteoplastne loze te obje podjedinice receptora za citokin IL-6

Da bismo dodatno potvrdili uspješnost diferencijacije osteoblasta u optimiziranim osteoplastogenim kulturama iz stanica koštane srži, u drugom nizu pokusa analizirali smo izražaj diferencijacijskih osteoplastnih gena tijekom više vremenskih točaka sazrijevanja osteoplasta. Ispitivani geni bili su diferencijacijski osteoplastni geni: *Runx2* koji kodira transkripcijski faktor ključan za usmjeravanje mezenhimskih stromalnih stanica u osteogenu lozu, *Alpl* koji kodira enzim ALP važan za regulaciju mineralizacije, *Bglap* koji kodira OCN ključan za organizaciju organskog koštanog matriksa, *Tnfsf11* koji kodira citokin RANKL važan za koštanu pregradnju aktivacijom osteoklasta te *Tnfrsf11b* koji kodira neutralizacijski receptor OPG s osteoprotektivnim učinkom putem inhibicije osteoklasta (Florencio-Silva *i sur.* 2015).

U više vremenskih točaka pratili smo dinamiku izražaja pojedinih diferencijacijskih gena, od trenutka izolacije svježe koštane srži (dan 0) do kraja diferencijacije osteoplastnih kolonija u kulturi (dan 14). Od sedmog dana kulture dodani su β -glicerofosfat i askorbinska kiselina, kao diferencijacijski faktori osteoplasta. Iz prikupljenih stanica izolirali smo RNA, a nakon obrnutog prepisivanja izolirane RNA u cDNA, kvantificirali smo relativni izražaj ciljnih gena postupkom qPCR u odnosu na izražaj kontrolnog ubikvitarno izraženog gena (**Slika 4A**). Izražaj gena *Runx2* nije pokazao značajniju dinamiku promjene tijekom trajanja kulture, ali je njegova izraženost govorila u prilog osteogene loze. Vrhunac izražaja gena *Alpl* pojavljuje se sredinom trajanja kulture (dan 9), kao i za gen *Tnfsf11*, a oba gena do kraja kulture dijelom smanjuju izražaj. Izražaj gena *Bglap* pokazuje nagli porast tek krajem trajanja kulture (između dana 11 i 14), dok je gen *Tnfsf11b* kontinuirano izražen od sedmog dana pa sve do kraja trajanja kulture (**Slika 4A**).

Nadalje nam je cilj bio utvrditi izražaj gena za podjedinice receptora za IL-6, kako bismo zaključili mogu li osteoplastne stanice tijekom diferencijacije odgovoriti na učinak modulatora signaliziranja citokinom IL-6. Relativna količina izražaja gena *Il6a* i *Il6st*, za podjedinice receptora IL-6R i gp130, naglo raste do sedmog dana kulture nakon čega se postepeno smanjuje do kraja trajanja kulture (**Slika 4B**).

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da geni za RANKL i ALP predstavljaju rane osteoplastne diferencijacijske gene koji vrhunac dosežu u trenutku nakon dodatka diferencijacijskog medija. Pri kraju stanične kulture dominantni je izražaj diferencijacijskih gena za OCN i OPG. Usporedno s planiranim početkom tretmana kultura modulatorima signaliziranja citokinom IL-6, vrhunac izražaja imaju podjedinice receptora za IL-6 te se njihov izražaj nastavlja uz postepeno smanjivanje do kraja kulture, što opravdava daljnji plan pokusa primjene agonista i antagonista.



Slika 4. Izražaja diferencijacijskih osteoblastnih gena i podjedinica receptora za IL-6 tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro*. Stanice su uzgajane u triplikatima (n=3), koji su korišteni za analizu genskog izražaja tijekom više točaka kulture. Na slici su navedeni nazivi gena (genski simboli). **A.** Izražaj diferencijacijskih osteoblastnih gena (Runx2, alkalna fosfataza, osteoklacin, RANKL i OPG). **B.** Izražaj podjedinica receptora za IL-6 (IL-6R i gp130). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Za analizu razlika korištena je ANOVA sa Student-Neuman-Keul post-hoc testom, a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Zvezdice označavaju značajnu razliku pojedinih točaka kulture u odnosu na svježe izoliranu koštanu srž (dan 0).

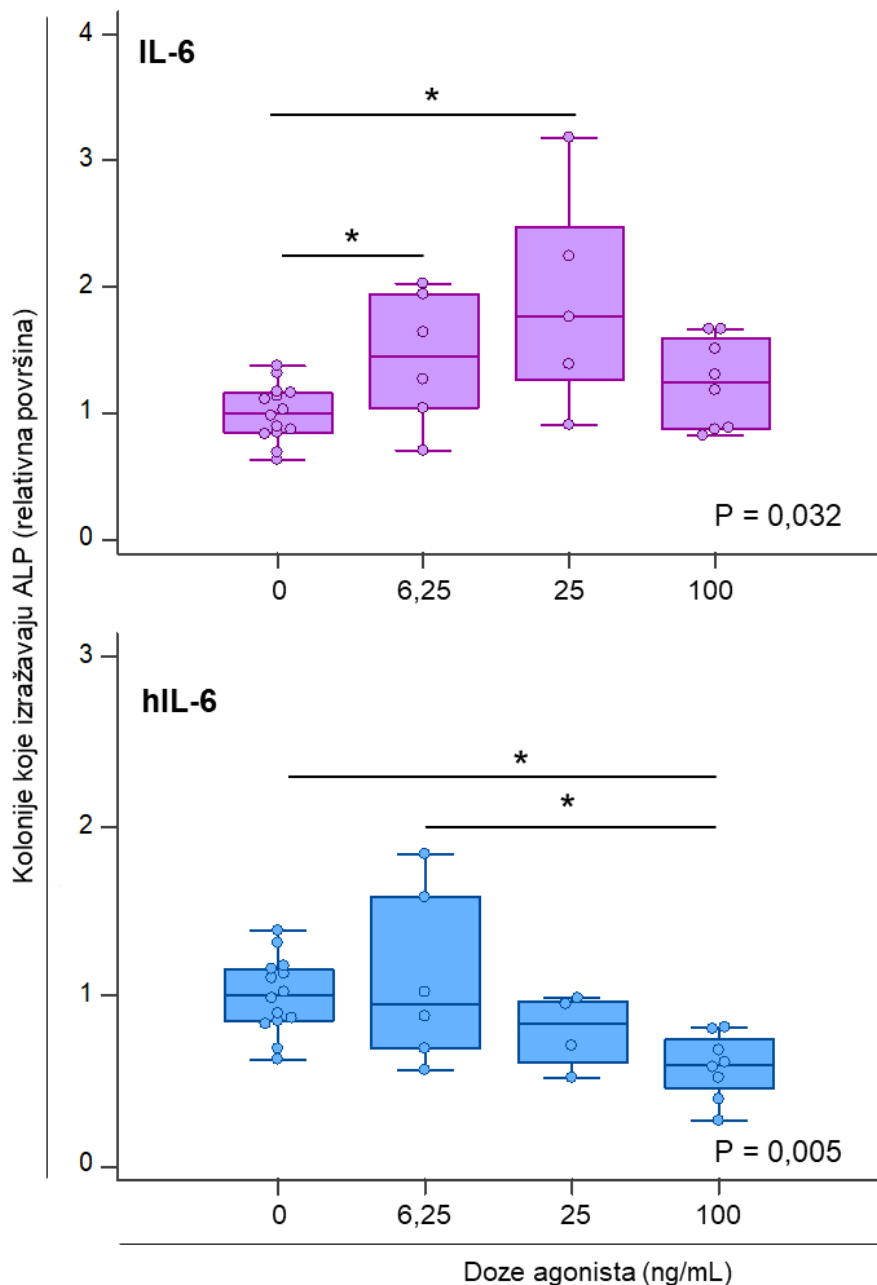
5.3. Učinak različitih doza agonista signalizacijskih puteva IL-6 (IL-6 i hIL-6) na diferencijaciju osteoblasta u staničnoj kulturi

Nakon što je utvrđeno da smo uspjeli optimizirati osteoblastogenu kulturu i diferencirati stanice koštane srži u osteoblaste koji izražavaju obje podjedinice receptora za IL-6, započeti su tretmani kultura modulatorima signalizacije citokinom IL-6. Tretmani su primijenjeni od sedmog dana stanične kulture zajedno s dodatkom diferencijacijskog medija te mijenjani svaka dva dana kulture s cjelokupnim kultivacijskim medijem sve do 14. dana, kada smo stanice fiksirali. Diferencijacija osteoblastnih kolonija procijenjena je izražajem enzima ALP, uz kvantifikaciju udjela površine zdenca prekrivenog ALP⁺ kolonijama računalnom obradom.

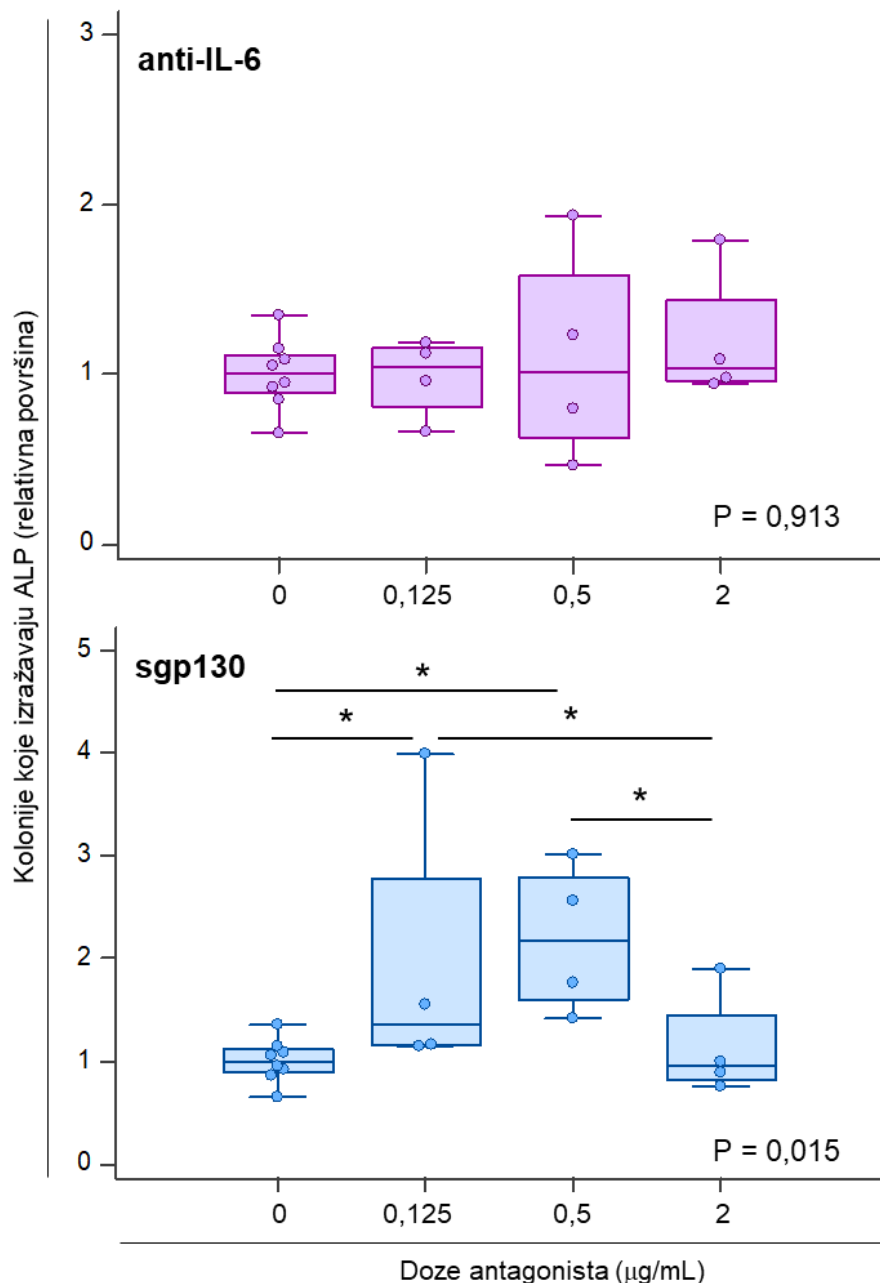
U prvom dijelu testiran je učinak dodavanja rekombinantnog mišjeg citokina IL-6, koji predstavlja agonista klasične signalizacije, te učinak dodavanja fuzijskog proteina hIL-6, koji je agonist *trans*-signalizacije citokinom IL-6 (Rose-John *i sur.* 2023). Primijenjene su različite doze reagensa kako bi se ispitala ovisnost učinka o dozi modulatora (**Slika 5**). Rezultati analize pokazuju da dodavanjem citokina IL-6 značajano raste površina diferenciranih ALP⁺ kolonija u primijenjenoj koncentraciji od 6,25 ng/mL, a još značajnije za 25 ng/mL. Stoga smo zaključili da aktivacija klasične signalizacije do određene mjere pozitivno utječe na diferencijaciju osteoblasta. S druge strane, aktivacija *trans*-signalizacije primjenom hIL-6 ne utječe na diferencijaciju osteoblasta u nižim dozama, dok ju u maksimalno primijenjenoj koncentraciji od 100 ng/mL čak i inhibira (**Slika 5**).

5.4. Učinak različitih doza antagonista signalizacijskih puteva IL-6 (anti-IL-6 i sgp130:Fc) na diferencijaciju osteoblasta u staničnoj kulturi

U drugom dijelu tretiranja staničnih kultura modulatorima, ispitan je učinak neutralizacijskog protutijela anti-IL-6, antagonista i klasične i *trans*-signalizacije te učinak fuzijskog topljivog proteina sgp130:Fc, koji djeluje kao selektivni antagonist *trans*-signalizacije (Rose-John *i sur.* 2023). Reagensi su primijenjeni u više doza i na isti način kao i agonisti (**Slika 6**). Rezultati analize pokazuju da učinak inhibicije ukupne signalizacije citokinom IL-6 na diferencijaciju osteoblasta *in vitro* nije značajan, što je vjerojatno rezultat suprotnih učinaka klasične i *trans*-signalizacije na diferencijaciju osteoblasta. S druge strane, uočen je značajni porast površine diferenciranih ALP⁺ kolonija inhibicijom *trans*-signalizacije pomoću reagensa sgp130:Fc u dozama od 0,125 i 0,5 µg/mL u odnosu na netretiranu kontrolu. Međutim, primjenom najviše doze sgp130:Fc od 2 µg/mL, uočeno je značajno smanjenje površine ALP⁺ osteoblastnih kolonija u odnosu na niže doze. Na temelju rezultata smo zaključili da u optimalnim dozama, inhibicija *trans*-signalizacije reagensom sgp130:Fc pozitivno djeluje na diferencijaciju ALP⁺ osteoblastnih kolonija *in vitro* (**Slika 6**).



Slika 5. Učinak različitih doza agonista citokina IL-6 na diferencijaciju osteoblasta in vitro. Stanice koštane srži uzgajane su u kulturi tijekom 14 dana, a od sedmog dana tretirane su diferencijacijskim medijem i pojedinim agonistima u naznačenim dozama. Stanice su uzgajane u duplikatima ili triplikatima (n=2-3) u tri neovisna pokusa. Diferencijacija je analizirana kao površina zdenca prekrivenog kolonijama koje izražavaju enzim ALP. **Gornji** (ljubičasti) grafikon predstavlja učinak aktivacije klasične signalizacije rekombinantnim citokinom IL-6 u dozama 6,25 ng/mL, 25 ng/mL i 100 ng/mL u odnosu na netretiranu kontrolu. **Donji** (plavi) grafikon predstavlja učinak aktivacije *trans*-signalizacije fuzijskim proteinom hIL-6 u dozama 6,25 ng/mL, 25 ng/mL i 100 ng/mL u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati sva tri pokusa prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon. Za analizu razlika korišten Kruskal-Wallis s Conover *post-hoc* testom, a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Zvezdice označavaju značajnu razliku pojedinih točaka kulture označenih crtom.



Slika 6. Učinak različitih doza antagonista citokina IL-6 na diferencijaciju osteoblasta in vitro. Stanice koštane srži uzgajane su u kulturi tijekom 14 dana, a od sedmog dana tretirane su diferencijacijskim medijem i pojedinim antagonistima u naznačenim dozama. Stanice su uzgajane u duplikatima ili triplikatima (n=2-3) u tri neovisna pokusa. Diferencijacija je analizirana kao površina zdenca prekrivenog kolonijama koje izražavaju enzim ALP. **Gornji** (ljubičasti) grafikon predstavlja učinak inhibicije signala IL-6 neutralizacijskim protutijelom anti-IL-6 u dozama 0,125 µg/mL, 0,5 µg/mL i 2 µg/mL u odnosu na netretiranu kontrolu. **Donji** (plavi) grafikon predstavlja učinak kočenja *trans*-signalizacije proteinom sgp130:Fc u dozama 0,125 µg/mL, 0,5 µg/mL i 2 µg/mL u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati sva tri pokusa prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon. Za analizu razlika korišten Kruskal-Wallis s Conover *post-hoc* testom, a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Zvijezdice označavaju značajnu razliku pojedinih točaka kulture označenih crtom.

6. RASPRAVA

U istraživanju učinka modulacije signaliziranja citokinom IL-6 na sazrijevanje mišjih osteoblasta, najprije je dokazano da su stromalne mezenhimske stanice obogaćene sedmi dan kulture mišje koštane srži na oko 7,5% u odnosu na 0,2% u svježe izoliranoj koštanoj srži, te se s diferencijacijom očekuje njihovo daljnje umnažanje. Ta populacija pokazuje povećan fenotipski izražaj karakterističnih biljega osteoblastnih prethodnika, posebice Sca1, CD200, CD51 i CD44 (Lukač *i sur.* 2020). Za pouzdano izvođenje pokusa bilo je važno optimizirati osteoblastogenu kulturu koja će uspješno potaknuti diferencijaciju osteoblastne loze, što smo potvrdili kroz značajan porast izražaja ranih i kasnih osteoblastnih diferencijacijskih gena (Roeder *i sur.* 2016). Osim klasičnih osteoblastnih biljega, rezultati su pokazali da osteoblasti u kulturi stanica izražavaju i obje podjedinice receptora za IL-6, što ih čini podložnim signaliziranju citokinom IL-6 i opravdava daljnje provođenje istraživanja o učinku modulacije signaliziranja. Važno je naglasiti da je već od trećeg dana kulture uočen nagli porast izražaja gena za podjedinice receptora IL-6R i gp130 u odnosu na svježe izoliranu koštanu srž. Budući da izražaj gena prethodi nastanku i izražaju proteina (Yamada *i sur.* 2013), očekuje se da će proteinske receptorske podjedinice biti pojačano izražene na osteoblastima sedmi dan kulture, u trenutku kada započinjemo tretmane modulatorima signaliziranja citokinom IL-6.

Citokin IL-6 pokazuje složen pleiotropni učinak te je važan i u poticanju i u suzbijanju upale, a do danas nije razjašnjeno postoji li specifična razlika u unutarstaničnom provođenju signala koji pokreće *trans*-signalizacija u odnosu na signal koji pokreće klasična (*cis*-) signalizacija citokinom IL-6. *Trans*-signalizacija se do sada pokazala kao proupalna i protumorogena, što ju čini važnim potencijalnim terapijskim ciljem u upalnim, autoimunim i malignim bolestima (Rose-John *i sur.* 2023). Naši rezultati tretmana osteoblastogenih staničnih kultura agonistima citokina IL-6 mogu se interpretirati na sljedeći način. Primjena citokina IL-6 kao *cis*-agonista potvrdila je da je izraženi membranski receptor mIL-6R na osteoblastima funkcionalan i da pokreće unutarstanični signal putem dimeriziranog gp130. Klasična ili *cis*-signalizacija potiče sazrijevanje osteoblasta razmjerno dozama od 6,25 i 25 ng/mL. Primjenom veće doze od 100 ng/mL uočen je inhibitoryni učinak koji bi se mogao objasniti na nekoliko načina. Istraživanja su pokazala da je količina izraženih citokinskih membranskih receptora regulirana i količinom samih liganada (citokina) u okolini, posebice u upalnim stanjima (Schumacher *i sur.* 2015). Postoji mogućnost da visoka doza IL-6 uzrokuje odcjepljenje receptora s membrane, stvarajući topljivi sIL-6R koji veže višak IL-6 i pokreće *trans*-signalizaciju koja koči sazrijevanje osteoblasta. Pitanje je nadalje i razlike afiniteta citokina IL-6 za različite forme receptora te njihova međusobna količina, sIL-6R u odnosu na mIL-6R, što može voditi kompeticiji receptora za ligand ili zasićenju određene vrste receptora i aktivaciji alternativne signalizacije (Rose-John *i sur.* 2023). Druga je mogućnost da stanična kultura osteoblasta nije potpuno homogena

te da sadrži i neke hematopoetske stanice na koje IL-6 u suvišku djeluje bilo klasičnom signalizacijom (ako stanice izražavaju IL6-R), bilo *trans*-signalizacijom (ako se IL-6 veže za sIL-6R u mikrookolišu). Te stanice potaknute citokinom IL-6 mogu djelovati nepogodno na sazrijevanje osteoblasta lučenjem upalnih medijatora jer je za osteoplastni razvoj važno i njihovo okruženje, a ne samo autonomni odgovor na IL-6 (Naot *i sur.* 2022). Primjena agonista *trans*-signalizacije, fuzijskog proteina hIL-6 u visokoj koncentraciji (100 ng/mL) smanjuje površinu ALP⁺ kolonija, što potvrđuje našu hipotezu da *trans*-signalizacija inhibira sazrijevanje osteoblasta.

Primjena neutralizacijskog protutijela anti-IL-6 koji koči i klasičnu i *trans*-signalizaciju, nije pokazala značajan učinak na površinu ALP⁺ osteoplastnih kolonija što upućuje na zaključak da u kontrolnim uvjetima postoji malo endogenog IL-6 koji ne aktivira značajno ni klasičnu niti *trans*-signalizaciju (Li *i sur.* 2008). Da postoji velika količina endogenog IL-6 kojeg luče osteoplasti tijekom diferencijacije, dodatkom egzogenog IL-6 možda bi odmah došlo do inhibitornog učinka na sazrijevanje osteoplasta kao što smo uočili za dozu citokina od 100 ng/mL. Druga mogućnost je da se blokiranjem oba načina signalizacije, *cis*- koja djeluje poticajno i *trans*- koja djeluje inhibicijski, učinci međusobno ponište pa je ukupan rezultat tretiranja neutralizacijskim protutijelom anti-IL-6 bez promjena u odnosu na netretirane kulture. Blokodom *trans*-signalizacije fuzijskim proteinom sgp130:Fc povećala se površina ALP⁺ osteoplastnih kolonija što potvrđuje pretpostavljeni inhibitorni učinak *trans*-signalizacije (Rose-John *i sur.* 2023). Međutim, sgp130:Fc primijenjen u visokoj dozi od 2 µg/mL koči diferencijaciju osteoplastnih kolonija u odnosu na doze od 0,125 i 0,5 µg/mL. Taj učinak mogao bi se objasniti pretpostavkom da velika količina molekula sgp130:Fc inhibira ne samo *trans*- nego i klasičnu signalizaciju na način da se u suvišku sgp130:Fc veže i na kompleks IL-6/mIL-6R te onemogućava udruživanje s membranskim gp130 te susljedno provođenje *cis*-signalizacije, no tu bi pretpostavku trebalo detaljno istražiti u budućim pokusima.

U dosadašnjim istraživanjima rezultati su pokazivali kontradiktorne učinke citokina IL-6 na diferencijaciju osteoplasta. Suprotstavljeni rezultati vjerojatno su dijelom posljedica različitih eksperimentalnih uvjeta i različitih diferencijacijskih stadija ispitivanog staničnog modela osteoplasta (Rose-John *i sur.* 2023). Nekoliko ranijih *in vitro* istraživanja pokazalo je da IL-6 djeluje na osteoplaste jedino ako je u kulturi istodobno dodan sIL-6R te da je mIL-6R odsutan ili vrlo slabo izražen na stromalnim/osteoplastnim staničnim linijama (Bellido *i sur.* 1997, Malaval *i sur.* 1998). To je kontradiktorno nalazima da su i IL-6 i IL-6R izraženi u osteoplastima koštane srži *in vivo*, a osteoplastni izražaj IL-6R nadalje postupno raste tijekom kultivacije u diferencijacijskom mediju (Li *i sur.* 2008). Također, pokazano je da IL-6 ima proliferacijski, maturacijski i apoptotični učinak na osteoplaste, ovisan o njihovom diferencijacijskom stadiju, tako da djeluje kao regulator, odnosno akcelerator diferencijacije preosteoplastnih stanica, ali

kao inicijator apoptoze u zrelijih stanica. To znači da bi osteoblasti mogli kontrolirati svoje preživljenje odgovorom na IL-6 regulirajući izražaj IL-6R tijekom diferencijacije (Li *i sur.* 2008). Citokin IL-6 u kombinaciji s topljivim sIL-6R smanjuje proliferaciju mišjih preosteoblastnih stanica MC3T3 (Bellido *i sur.* 1997) što je analogno našem rezultatu da *trans*-signalizacija inhibira sazrijevanje osteoblasta u kulturi. Potrebno je spomenuti da podjedinica receptora za IL-6, gp130 ujedno služi kao signalna podjedinica receptora za interleukin 11 (IL-11) stoga je moguće da sgp130:Fc inhibira i IL-11 *trans*-signalizaciju koja može djelovati na sazrijevanje osteoblasta (Rose-John *i sur.* 2023). Istraživanje na mišjem modelu *in vivo* pokazalo je da farmakološka inhibicija *trans*-signalizacije cirkulirajućim sgp130:Fc ima poticajni učinak na koštano izgradnju premda ne znamo radi li se i izravnom ili neizravnom učinku na osteoblaste. Međutim, kada cirkulirajuće razine sgp130:Fc prijeđu koncentraciju od 10 µg/mL, imaju negativan učinak na koštani metabolizam (McGregor *i sur.* 2019). Premda se radi o različitim modelima, ti rezultati pokazuju određenu analogiju s našim *in vitro* rezultatima gdje je zamijećeno kočenje diferencijacije osteoblasta pri koncentraciji sgp130:Fc u kulturi od 2 µg/mL u odnosu na niže primijenjene doze.

Koštano cijeljenje kompleksni je proces koji uključuje različite vrste stanica te usko povezane faze upale, regeneracije i pregradnje (Grčević *i sur.* 2018). Klasična signalizacija citokinom IL-6, ali ne i *trans*-signalizacija, odgovorna je za cijeljenje kosti. To je dokazano u mišjem modelu *in vivo* kada je inhibicija oba načina signalizacije usporila cijeljenje kosti, za razliku od selektivne inhibicije *trans*-signalizacije pomoću sgp130:Fc, koja nije pokazala značajni učinak na kost (Prystaz *i sur.* 2018). Rezultati su u skladu s našim modelom *in vitro* gdje smo pokazali da IL-6 poticajno djeluje na sazrijevanje osteoblasta klasičnim načinom signaliziranja. Određeni računalni modeli pokazali su da je ključna razlika učinka klasične i *trans*-signalizacije u omjeru podjedinica receptora za IL-6 na staničnoj površini. Ukoliko količina podjedinica gp130 nadmašuje količinu mL-6R, *trans*-signalizacija je jače potaknuta od klasične signalizacije, a u suprotnom omjeru nema razlike u jačini aktivacije nizvodnoga signalnog puta (Reeh *i sur.* 2019). U budućim pokusima planiramo odrediti količinu endogeno proizvedenog IL-6 i sIL-6R u staničnoj kulturi kao i genski izražaj podjedinica receptora za IL-6 tijekom tretmana modulatorima, usporedo s izražajem osteoblastnih diferencijacijskih gena.

Sve navedeno upućuje na zaključak da je razjašnjavanje djelovanja različitih oblika signalizacije citokinom IL-6 važno u fiziološkim i patološkim stanjima. Potrebna su dodatna istraživanja učinaka signalizacije citokinom IL-6 te aktivacije unutarstaničnog signalnog puta koji potiče klasična u odnosu na *trans*-signalizaciju kako bi se u potpunosti definirala razlika njihovog izravnog učinka na osteoblaste te omogućila primjena blokade *trans*-signalizacije u terapijske svrhe.

7. ZAKLJUČCI

1. Stanice izdvojene iz mišje koštane srži sedmi dan kulture izražavaju karakteristične mezenhimske biljege osteoblastnih prethodnika, a stanične kolonije 14. dan kulture boje se pozitivno na alkalnu fosfatazu i crveni alizarin što dokazuje prisutnost osteoblasta.
2. Osteoblasti tijekom sazrijevanja *in vitro* pokazuju izražaj diferencijacijskih osteoblastnih gena i izražaj obje podjedinice receptora za IL-6 (IL-6R i gp130) što ih čini podložnima učinku modulatora signalizacije citokinom IL-6.
3. Aktivacija klasične signalizacije citokinom IL-6 potiče sazrijevanje osteoblasta u optimalnoj dozi od 6,25 i 25 ng/mL, dok aktivacija *trans*-signalizacije velikom dozom od 100 ng/mL fuzijskim proteinom hIL-6 inhibira sazrijevanje osteoblasta.
4. Inhibicija klasične i *trans*-signalizacije protutijelom anti-IL-6 nije pokazala značajne učinke na diferencijaciju osteoblasta, dok je inhibicija *trans*-signalizacije dozama sgp130:Fc od 0,125 i 0,5 µg/mL pokazala poticajni učinak na sazrijevanje osteoblasta.

8. ZAHVALE

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danki Grčević što mi je pružila priliku da se uključim u znanstveni rad Laboratorija za molekularnu imunologiju. Zahvaljujem joj na iznimnom trudu, vremenu, strpljenju te svemu što me naučila o znanstvenom radu, znanosti i ljubavi prema istoj.

Posebna zahvala i dr.sc. Maši Filipović na svoj poduci o radu u laboratoriju i što je u svako vrijeme bila spremna podijeliti svoje veliko znanje i pomoći.

Zahvaljujem i svim ostalim članovima Laboratorija na susretljivosti i pomaganju.

Zahvaljujem prof. Stefanu Rose-Johnu, voditelju odjela na Biokemijskom institutu Medicinskog fakulteta Sveučilišta Christian-Albrechts u Kelnu, u Njemačkoj.

Hvala mojim bližnjima na podršci tijekom pripremanja ovog rada!

9. POPIS LITERATURE

- Baker-LePain JC, Nakamura MC, Lane NE. Effects of inflammation on bone: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(4):389-95. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283474dbe.
- Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 1997;138(9):3666-76. doi: 10.1210/endo.138.9.5364.
- Epsley S, Tadros S, Farid A, Kargilis D, Mehta S, Rajapakse CS. The Effect of Inflammation on Bone. *Front Physiol*. 2021;11:511799. doi: 10.3389/fphys.2020.511799.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.
- Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J i sur. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1584-92. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.9.1584.
- Grčević D, Sironi M, Valentino S, Deban L, Cvija H, Inforzato A i sur. The Long Pentraxin 3 Plays a Role in Bone Turnover and Repair. *Front Immunol*. 2018;9:417. doi: 10.3389/fimmu.2018.00417..
- Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med*. 2021;53(7):1116-1123. doi: 10.1038/s12276-021-00649-0.
- Li Y, Bäckesjö CM, Haldosén LA, Lindgren U. IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. *Cytokine*. 2008;43(2):165-73. doi: 10.1016/j.cyto.2008.05.007.
- Lukač N, Katavić V, Novak S, Šućur A, Filipović M, Kalajzić I i sur. What do we know about bone morphogenetic proteins and osteochondroprogenitors in inflammatory conditions? *Bone*. 2020;137:115403. doi: 10.1016/j.bone.2020.115403.
- Malaval L, Gupta AK, Liu F, Delmas PD, Aubin JE. LIF, but not IL-6, regulates osteoprogenitor differentiation in rat calvaria cell cultures: modulation by dexamethasone. *J Bone Miner Res*. 1998;13(2):175-84. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.2.175.
- McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, Crimeen-Irwin B i sur. IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2019;294(19):7850-7863. doi: 10.1074/jbc.RA119.008074.
- Naot D, Pool B, Chhana A, Gao R, Munro JT, Cornish J i sur. Factors secreted by monosodium urate crystal-stimulated macrophages promote a proinflammatory state in osteoblasts: a potential indirect mechanism of bone erosion in gout. *Arthritis Res Ther*. 2022;24(1):212. doi: 10.1186/s13075-022-02900-z.

- Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6651. doi: 10.3390/ijms22136651.
- Prystaz K, Kaiser K, Kovtun A, Haffner-Luntzer M, Fischer V, Rapp AE i sur. Distinct Effects of IL-6 Classic and Trans-Signaling in Bone Fracture Healing. *Am J Pathol.* 2018;188(2):474-490. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.10.011.
- Reeh H, Rudolph N, Billing U, Christen H, Streif S, Bullinger E i sur. Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):46. doi: 10.1186/s12964-019-0356-0.
- Roeder E, Matthews BG, Kalajzic I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. *Bone.* 2016;92:189-195. doi: 10.1016/j.bone.2016.09.004.
- Rose-John S. Blocking only the bad side of IL-6 in inflammation and cancer. *Cytokine.* 2021;148:155690. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155690..
- Rose-John S, Jenkins BJ, Garbers C, Moll JM, Scheller J. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. *Nat Rev Immunol.* 2023 Apr 17:1–16. doi: 10.1038/s41577-023-00856-y.
- Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(2):204-8. doi: 10.1002/cyto.990130216
- Schumacher N, Meyer D, Mauermann A, von der Heyde J, Wolf J, Schwarz J i sur. Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles. *J Biol Chem.* 2015;290(43):26059-71. doi: 10.1074/jbc.M115.649509.
- Schumertl T, Lokau J, Rose-John S, Garbers C. Function and proteolytic generation of the soluble interleukin-6 receptor in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2022;1869(1):119143. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119143.
- Yamada S, Yoshizawa Y, Kawakubo A, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. *Dent Mater J.* 2013;32(2):233-40. doi: 10.4012/dmj.2012-188.
- Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone.* 2007;41(6):928-36. doi: 10.1016/j.bone.2007.07.022.

10. SAŽETAK

Učinak modulacije signaliziranja citokinom IL-6 na sazrijevanje stanica osteoblastne loze uzgojenih iz mišje koštane srži

Ozana Jakšić

Interleukin 6 (IL-6) pleiotropni je citokin koji vezanjem na membranske podjedinice receptora, IL-6R i signalni glikoprotein gp130, ostvaruje klasičnu signalizaciju. *Trans*-signalizaciju aktivira kompleks citokina i solubilnog receptora (sIL-6R) vezanjem na membranski gp130. Cilj ovoga rada je istražiti učinak modulatora signaliziranja citokinom IL-6 na diferencijaciju mišjih osteoblasta *in vitro*.

U radu su optimizirani uvjeti osteoblastogene kulture mišje koštane srži i fenotipizirane nezrele stanice osteoblastogene loze protočnom citometrijom. Analiziran je izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena i podjedinica receptora za IL-6 tijekom sazrijevanja osteoblasta *in vitro* postupkom qPCR. Ispitan je o dozi ovisan učinak agonista klasične signalizacije (citokin IL-6), agonista *trans*-signalizacije (fuzijski protein IL-6/sIL-6R), antagonista *trans*-signalizacije (sgp130:Fc) i antagonista obje vrste signalizacije (protutijelo anti-IL-6) na sazrijevanje osteoblasta *in vitro*.

Utvdili smo da stanice mišje koštane srži sedmi dan kulture izražavaju mezenhimske biljege osteoblastnih prethodnika. Izražaj podjedinica receptora za IL-6 usporedo s izražajem diferencijacijskih gena čini kultivirane osteoblaste podložnima učinku modulatora signalizacije. Aktivacija klasične signalizacije i inhibicija *trans*-signalizacije potiču sazrijevanje osteoblasta, dok aktivacija *trans*-signalizacije inhibira sazrijevanje osteoblasta *in vitro*. Istovremena inhibicija klasične i *trans*-signalizacije nema značajne učinke.

Zaključili smo da klasična signalizacija citokinom IL-6 potiče, dok *trans*-signalizacija koči diferencijaciju osteoblasta *in vitro* što može uputiti na terapijsku primjenu njezine inhibicije u koštanim bolestima.

Ključne riječi: interleukin 6, receptor za IL-6, osteoblast, klasična signalizacija, *trans*-signalizacija

11. SUMMARY

Effect of IL-6 cytokine signaling modulation on the maturation of osteoblast lineage cells cultured from mouse bone marrow

Ozana Jakšić

Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine that activates classical signaling by binding membrane receptor subunits, IL-6R, and signaling glycoprotein gp130. *Trans*-signaling is activated by the soluble receptor(sIL-6R)/IL-6 complex which binds membrane gp130. Our study aimed to investigate the effects of IL-6 signaling modulators on mouse osteoblast differentiation *in vitro*.

We optimized conditions of osteoblastogenic mouse bone marrow culture and phenotyped immature osteoblastogenic lineage cells by flow cytometry. The expression of osteoblast differentiation genes and IL-6R subunits during osteoblast maturation *in vitro* was analyzed by qPCR. The dose-dependent effect of classical signaling agonist (IL-6), *trans*-signaling agonist (IL-6/sIL-6R fusion protein), *trans*-signaling antagonist (sgp130:Fc) and antagonist of both signaling types (anti-IL-6 antibody) was tested.

We found that mouse bone marrow cells express mesenchymal markers of osteoblast progenitors on the seventh day of culture. The simultaneous expression of IL-6 receptor subunits and differentiation genes renders cultured osteoblasts susceptible to signaling modulators. Activation of classical and inhibition of *trans*-signaling promotes, while activation of *trans*-signaling inhibits osteoblast maturation *in vitro*. Simultaneous inhibition of classical and *trans*-signaling has no significant effects.

We concluded that IL-6 classical signaling promotes, while *trans*-signaling inhibits osteoblast differentiation *in vitro*, indicating the possible therapeutic application of its inhibition in bone diseases.

Key words: interleukin 6, IL-6 receptor, osteoblast, classical signaling, *trans*-signaling

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. siječnja 2001. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i XV. gimnaziju. Osvojila sam 1. nagradu na Državnom natjecanju iz fizike i 3. mjesto na Državnom natjecanju iz hrvatskog jezika. 2016. – 2018. sudjelovala sam u radu laboratorija Instituta za fiziku. U Istanbulu sam 2018. sudjelovala na međunarodnom natjecanju učeničkih znanstvenih radova pod mentorstvom dr. sc. Nataše Vujičić i dr. sc. Marka Kralja. 2019. upisala sam Medicinski fakultet, a Dekanova nagrada dodijeljena mi je za postignut uspjeh na prvoj godini studija. Demonstrator sam na kolegiju Anatomija (2020. – 2022.) te kolegijima Imunologija i Fiziologija (2021. – danas). Od 2021. godine sudjelujem u laboratorijskim istraživanjima pod vodstvom prof. Danke Grčević te sam koautorica na dva znanstvena sažetka prezentirana na "Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2022" i "5th Meeting of Middle European Societies for Immunology and Allergology (MESIA) 2022". Od 1. do 30. rujna 2022. boravila sam na edukaciji u laboratoriju Molecular Biotechnology Center u sklopu znanstvenog projekta prof. Silvije Deaglio u Torinu. Dio sam vodstva Studentske sekcije za ORL i kirurgiju glave i vrata te organizatorica multidisciplinarnog projekta obilježavanja Svjetskog dana glasa. Autorica sam nekoliko sažetaka na studentskim kongresima. Dobitnica sam Stipendije Grada Zagreba za izvrsnost posljednjih šest godina. Volontirala sam u pozivnom centru za oboljele od COVID-19 tijekom pandemije. Od osnovne škole polaznica sam dramskog studija Učilišta ZKM-a.