

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Martina Fadljević, Igor Radanović

**PROCJENA UČINKA IMUNIZACIJE NA GENERALIZIRANI I
SUBKONDRALNI GUBITAK KOSTI U TIJEKU ARTRITISA POTAKNUTOG
ANTIGENOM**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nataše Kovačić, u okviru projekta „Molekularni posrednici koštane resorpcije uvjetovane receptorom Fas u artritisu“ (br. 7406) te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS KRATICA

7-AAD	7-amino-aktinomicin D
ACCPA	protutijela usmjerena na cikličke citrulinirane peptide (prema engl., <i>anti-cyclic citrullinated peptide antibodies</i>)
AIA	artritis potaknut antigenom (prema engl., <i>antigen-induced arthritis</i>)
BV/TV	udio koštanog volumena u ukupnom volumenu (prema engl., <i>bone volume/tissue volume</i>)
CFA	potpuni Freundov adjuvans (prema engl., <i>complete Freund's adjuvant</i>)
CIA	artritis potaknut kolagenom (prema engl., <i>collagen-induced arthritis</i>)
FLS	sinovijalni fibroblasti (prema engl., <i>fibroblast-like synoviocytes</i>)
GPI	glukoza-6-fosfat izomeraza (prema engl., <i>glucose-6-phosphate isomerase</i>)
HSP	bjelančevina toplinskog šoka (prema engl., <i>heat shock protein</i>)
IFA	nepotpuni Freundov adjuvans (prema engl., <i>incomplete Freund's adjuvant</i>)
IL	interleukin
L2	drugi lumbalni kralježak
mBSA	metilirani goveđi serumski albumin (prema engl., <i>methylated bovine serum albumin</i>)
MHC-II	glavni kompleks antigena tkivne podudarnosti razreda II (prema engl., <i>major histocompatibility complex class II</i>)
NF κ B	jezgreni čimbenik κ B (prema engl., <i>nuclear factor κB</i>)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl., <i>phosphate-buffered saline</i>)
RA	reumatoidni artritis
RANK	receptor za pobudu jezgrinog čimbenika κ B (prema engl., <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika κ B (prema engl., <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
RF	reumatoidni čimbenik (prema engl., <i>rheumatoid factor</i>)
Tb.N.	broj koštanih gredica (prema engl., <i>trabecular number</i>)
Tb.Sp.	razdvojenost koštanih gredica (prema engl., <i>trabecular separation</i>)
Tb.Th.	debljina koštanih gredica (prema engl., <i>trabecular thickness</i>)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze alfa (prema engl., <i>tumor necrosis factor alpha</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Reumatoidni artritis	1
1.2. Životinjski modeli reumatoidnog artritisa.....	3
2. HIPOTEZA	5
3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
4. MATERIJALI I METODE	6
4.1. Pokusne životinje	6
4.2. Ustroj pokusa	6
4.2.1. Poticanje artritisa	6
4.2.2. Žrtvovanje	7
4.3. Protočna citometrija	8
4.4. Mikro-kompjutorizirana tomografija (μ CT)	9
4.5. Statistička analiza	10
5. REZULTATI	11
5.1. Imunizacija izaziva generaliziranu osteopeniju, a za zglobnu upalu specifičan je gubitak subkondralne kosti u epifizama uz zahvaćeni zglob	11
5.2. Imunizacija izaziva sustavnu mobilizaciju i povećanje udjela stanica mijeloidne loze, a zglobna upala specifično potiče njihovo nakupljanje u zahvaćenim zglobovima.....	14
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČCI	21

8.	ZAHVALE	22
9.	POPIS LITERATURE.....	23
10.	SAŽETAK.....	26
11.	SUMMARY.....	27

1. UVOD

1.1. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis (RA) kronična je autoimunosna bolest karakterizirana simetričnim poliartritisom koji zahvaća male zglobove šake i stopala. Procjenjuje se da oboljeli od RA čine oko 1% ukupne svjetske populacije, pri čemu se u žena pojavljuje dvostruko do četverostruko češće nego u muškaraca (Kasper *i sur.* 2015). Važno je naglasiti da RA predstavlja važan javnozdravstveni problem jer dovodi do trajnih deformacija zahvaćenih zglobova i invalidnosti bolesnika.

Etiološki se u RA pretpostavlja uloga egzogenih čimbenika poput stresa, pušenja cigareta, ozljeda ili mikroorganizama te endogena sklonost spontanom stvaranju protutijela na vlastite bjelančevine poput kolagena, imunoglobulina i bjelančevina toplinskog šoka (HSPs, prema engl., *heat shock proteins*). U serumu bolesnika s RA pojavljuju se protutijela usmjerena na konstantni dio (Fc fragment) imunoglobulina (Ig)G, reumatoidni čimbenik (RF, prema engl., *rheumatoid factor*) i protutijela usmjerena na cikličke citrulinirane peptide (ACCPA, prema engl., *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*) (Scott *i sur.* 2010). U patogenezu RA uključeni su i epigenetički mehanizmi, primjerice histonska modifikacija i hipometilacija DNA koje mogu doprinijeti aktivaciji sinovijalnih fibroblasta (Araki i Mimura 2016; Karouzakis *i sur.* 2009).

Artritis je rezultat imunosnog oštećenja sinovijalne ovojnice koje se očituje kao sinovitis, odnosno zadebljanje sinovije praćeno upalnim staničnim infiltratom, upalnim eksudatom u zglobnom prostoru, razaranjem zglobne hrskavice i oštećenjem subkondralne kosti (Schett i Gravallesse 2012). Agresivno zadebljano sinovijalno tkivo naziva se panus, a sastoji se od hiperplastičnih sinovijalnih fibroblasta (FLS, prema engl., *fibroblast-like synoviocytes*), umnoženih krvnih žila, makrofaga te mijeloidnih i limfoidnih stanica upalnog infiltrata (Müller-Ladner *i sur.* 2007). Sinovijalni fibroblasti stanice su mezenhimne loze smještene u unutarnjem sloju sinovijalne ovojnice koje sudjeluju u prehrani zglobnih tkiva, stvaraju kolagen i hijaluronsku kiselinu, ali i enzime koji razgrađuju međustaničnu tvar (Araki i Mimura 2016).

Druga važna populacija sinovijalnih stanica jesu sinovijalni makrofazi koji imaju važnu ulogu u razvoju i regulaciji upalnih zglobnih zbivanja. Upalno polarizirani makrofazi proizvodnjom interleukina 1 (IL-1, prema engl., *interleukin 1*), čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α , prema

engl., *tumor necrosis factor alpha*) te proupalnih kemokina privlače i aktiviraju druge stanice imunskog sustava poput monocita, neutrofila i limfocita T (Udalova *i sur.* 2016). Nadalje, aktivacijom signalnog puta jezgrinog čimbenika κB (NF κB , prema engl., *nuclear factor κB*) mogu potaknuti proliferaciju sinovijalnih fibroblasta, stvaranje panusa te neoangiogenezu (Firestein i Zvaifler 2002). S druge strane, sinovijalni makrofazi mogu se polarizirati i na način da djeluju protuupalno lučeći citokine poput IL-10 ili antagonista receptora IL-1 (Udalova *i sur.* 2016). Pokazano je da i stanice mezenhimne loze kojoj pripadaju i sinovijalni fibroblasti mogu regulirati imunski odgovor i tijekom artritisa (Chen i Tuan 2008).

S obzirom na složena međudjelovanja velikog broja staničnih populacija RA se danas smatra patogenetski heterogenom bolešću, no usprkos heterogenosti za RA karakteristično je oštećenje subkondralne kosti koje se manifestira pojavom subkondralnih koštanih erozija te jukstaartikularne osteopenije, odnosno gubitka koštanih gredica u kostima smještenim uz zahvaćeni zglob. Postojanje koštanih erozija jedan je od ključnih kriterija za postavljanje dijagnoze RA. Erozivno koštano oštećenje može se pojaviti i u ostalim oblicima artritisa poput spondiloartritisa, osteoartritisa i psorijatičnog artritisa, ali nije njihova glavna značajka. Koštana resorpcija rezultat je poremećene ravnoteže koštane izgradnje posredovane osteoblastima i koštane razgradnje posredovane osteoklastima. Do stvaranja koštanih erozija dolazi vrlo rano u tijeku RA, čak i prije pojave sinovitisa, a istodobno se pojavljuju i ACCPA koja se smatraju prognostičkim biljegom RA, a pokazano je i da mogu potaknuti osteoklastogenezu (Scott *i sur.* 2000). Upalni mikrookoliš nastao kao posljedica djelovanja proupalnih citokina, izravno, ili posredstvom sustava RANK/RANKL (engl., *receptor activator of nuclear factor kappa-B/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), može potaknuti sazrijevanje i aktivnost osteoklasta ili zakočiti aktivnost i sazrijevanje osteoblasta (Schett i Gravallesse 2012). Ključni proupalni citokini u zahvaćenim zglobovima su TNF- α , IL-1 i IL-6, a navedeni citokini djeluju i proresorptivno privlačenjem osteoklastnih prethodničkih stanica u zglob ili poticanjem sazrijevanja osteoklasta (McHugh *i sur.* 2010). Inhibicija djelovanja navedenih citokina jedan je od pristupa u liječenju RA, čime se uspješno smanjuje lokalna i sustavna upalna aktivnost, međutim djelovanje na koštano resorpciju je ograničeno (Stolina *i sur.* 2009).

Pored lokalnog gubitka kosti, u tijeku RA pojavljuje se i generalizirana osteopenija ili osteoporoza koja može povećati sklonost prijelomima u ovih bolesnika, ali ne utječe izravno na razvoj invalidnosti. Mehanizam nastanka osteopenije različit je od mehanizma nastanka koštanih erozija, a u podlozi je opći poremećaj ravnoteže proupalnih citokina poput TNF α , IL-1 i IL-6 u

koštanom mikrookolišu koji je zajednički s drugim upalnim bolestima i postmenopauzalnom osteoporozom (Deal 2012).

1.2. Životinjski modeli reumatoidnog artritisa

Budući da je patogeneza RA složena i uključuje brojne stanične populacije na sustavnoj i lokalnoj razini, za istraživanje mehanizma i potencijalnih lijekova za ovu bolest nužna je uporaba životinjskih modela. Postoji velik broj životinjskih modela koji se međusobno razlikuju u mehanizmu nastanka artritisa, a možemo ih podijeliti na spontane i potaknute (Brand 2005). Potaknuti modeli uključuju imunizaciju na antigene poput albumina ili autoantigene poput kolagena tipa II. Spontani modeli artritisa razvijaju se u transgeničnih miševa s poremećajima u izražaju proupalnih citokina, primjerice TNF- α i IL-1 (Keffer *i sur.* 1991). Spontanim modelima artritisa pripada i mišji model K/BxN koji je otkriven tijekom istraživanja uloge glavnog kompleksa antigena tkivne podudarnosti razreda II (MHC-II, prema engl., *major histocompatibility complex class II*) kada je primijećeno da miševi koji izražavaju transgen KRN receptora limfocita T i molekulu MHC-II Ag⁷ (miševi K/BxN) razvijaju teški destruktivni artritis nalik RA u ljudi (Kouskoff *i sur.* 1996). Autoimunost je u tom modelu posredovana visokim titrom protutijela na enzim glukoza-6-fosfat izomerazu (GPI, prema engl., *glucose-6-phosphate isomerase*) koji sudjeluje u glikolitičkom putu (Matsumoto 1999).

Spontani modeli najčešće uzrokuju kronični, progresivni oblik artritisa s izmjenjivanjem faza remisije i relapsa, a njihova je prednost točnije reproduciranje tijeka ljudskog RA. Prednost je izazvanih modela predvidljivo vrijeme početka i tijek bolesti čime se smanjuje unutarnja varijabilnost pokusa jer se mjerenja i uzimanje uzoraka obavljaju u istoj fazi. Najčešće je korišten potaknuti model artritis potaknut kolagenom (CIA, prema engl., *collagen-induced arthritis*) koji se izaziva imunizacijom miša emulzijom kolagena tipa II u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl., *complete Freund's adjuvant*). CIA se očituje kao poliartikularni simetrični artritis sličan ljudskom RA koji se razvija 4-8 tjedana poslije imunizacije (Brand *i sur.* 2007; Trentham *i sur.* 1978). Nedostatci ovog modela jesu varijabilna pojava i vrijeme nastupa i jačina zglobne upale te pojava artritisa na različitim zglobovima stopala, što otežava međusobnu usporedbu pokusnih skupina. Također, soj C57BL/6 smatra se relativno otpornim na izazivanje ovog oblika artritisa (Pan *i sur.* 2004). Drugi najčešće korišten model jest artritis potaknut

antigenom (AIA, engl., *antigen-induced arthritis*) u kojem se pokusni miševi imuniziraju metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl., *methylated bovine serum albumin*), a potom se zglobna upala izaziva injekcijom mBSA izravno u koljeni zglob 21. dan poslije imunizacije (Brackertz *i sur.* 1977). U ovom se modelu artritis pojavljuje u koljenom zglobu svih uspješno imuniziranih životinja nekoliko dana nakon intraartikularne (i.a.) injekcije antigena. Artritis ima jasno definiran početak, tijek i trajanje čime je omogućena reproducibilnost mjerenja u željenoj fazi bolesti te međusobna usporedba pokusnih skupina. Artritis nastupa između 3. i 5. dana, upala je najizraženija 7. dana poslije i.a. injekcije, a nakon 3 tjedna mikroskopski je vidljivo samo zadebljanje sinovijalne ovojnice (van den Berg *i sur.* 2007). Artritis potaknut antigenom (AIA) smatra se modelom ograničenim na oboljeli zglob s minimalnim sustavnim učincima. Lokalno koštano razaranje od najvećeg je interesa u procjeni artritisa s obzirom da je upravo lokalno oštećenje uzrok invalidnosti bolesnika. Međutim, model AIA uključuje primjenu Freundovog adjuvansa za koji je poznato da ima sustavne učinke na stanice hematopoetskog sustava, posebice akumulaciju nezrelih CD11b⁺ stanica mijeloidne loze koje mogu doprinijeti razvoju i intenzitetu autoimunog artritisa (Billiau i Matthys 2001). U ovom istraživanju željeli smo utvrditi postoji li sustavno djelovanje imunizacije na stanice mijeloidne loze i gustoću kosti te mogu li se navedeni sustavni učinci razgraničiti od lokalnog razarajućeg učinka artritisa na kost.

2. HIPOTEZA

Pretpostavka je našeg rada da imunizacija tijekom poticanja AIA izaziva sustavni upalni odgovor praćen generaliziranim gubitkom trabekularne kosti. Gubitak metafiznih koštanih gredica kojim se standardno procjenjuje koštana resorpcija u artritisu nije dovoljno specifičan kvantitativni pokazatelj koštanog razaranja potaknutog zglobnom upalom, već je velikim dijelom odraz generalizirane osteopenije. Specifičan pokazatelj koštanog razaranja potaknutog zglobnom upalom gubitak je epifiznih koštanih gredica uz zahvaćeni zglob.

3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj istraživanja bio je utvrditi u kojoj mjeri imunizacija koja se rabi za poticanje AIA izaziva generaliziranu osteopeniju, a u kojoj mjeri doprinosi razaranju kosti uz zahvaćeni zglob.

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

1. Pomoću mikro-kompjutorizirane tomografije (μ CT) odrediti volumen trabekularne kosti u drugom lumbalnom kralješku (L2) te u epifizama i metafizama bedrene kosti miševa s artritisom te miševa kontrolne imunizirane i neimunizirane skupine.
2. Protočnom citometrijom odrediti udio mijeloidnih stanica u slezeni (pokazatelj sustavnog upalnog odgovora), metafiznoj koštanoj srži te u sinovijalnom odjeljku (pokazatelj lokalnog upalnog odgovora) te utvrditi povezanost udjela tih stanica s gubitkom trabekularne kosti u L2 te u femoralnim epifizama i metafizama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korištene ženke soja B6 (C57BL/6) u dobi 12 tjedana, uzgojene u vivariju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusi su izvedeni u okviru projekta 7406 Hrvatske zaklade za znanost za koji je izdana dopusnica Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te odobrenje Ministarstva poljoprivrede RH. Živim miševima rukovali su članovi tima Laboratorija za molekularnu imunologiju osposobljeni za rad s pokusnim životinjama.

4.2. Ustroj pokusa

Artritis je potaknut intraartikularnom (i.a) injekcijom metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl., *methylated bovine serum albumin*), (Sigma-Aldrich, Darmstadt Njemačka) nakon imunizacije dvjema potkožnim injekcijama emulzije mBSA u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl., *complete Freund's adjuvant*). Miševi su podijeljeni u tri skupine (Slika 1):

- Neimunizirani miševi (NI)
- Imunizirani miševi bez artritisa (CTRL)
- Imunizirani miševi s artritisom (AIA)

4.2.1. Poticanje artritisa

Primarna imunizacija izvedena je potkožnom injekcijom 200 μ L mBSA koncentracije 1 mg/mL u CFA, raspodijeljeno u dvije doze koje su injicirane obostrano u slabinsko područje miševima AIA i CTRL skupine. Neimuniziranim miševima (NI) injicirano je 200 μ L 0.1M fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS, prema engl., *phosphate-buffered saline*), također 100 μ L potkožno u svako slabinsko područje.

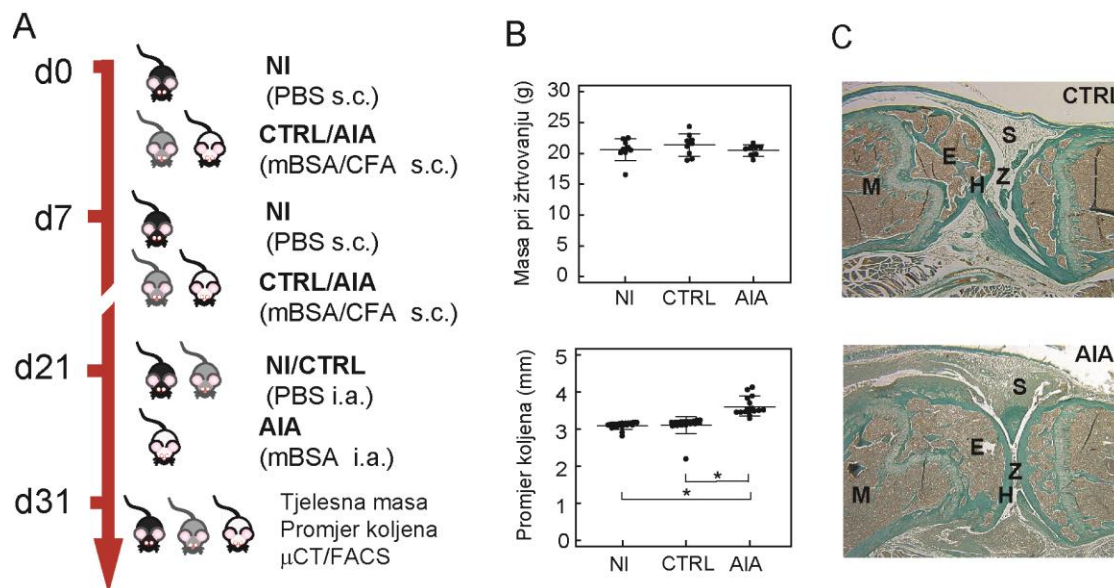
Emulzija mBSA pripravljena je otapanjem 10 mg mBSA u 4.5 mL destilirane vode te dodavanjem 0.5 mL 1M pufera PBS da bi se dobila otopina mBSA koncentracije 2 mg/mL. CFA

je pripremljen suspendiranjem 1 mg/mL *M. Tuberculosis* u nepotpunom Freundovom adjuvansu (IFA, prema engl., *incomplete Freund's adjuvant*, BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka). Potom se otopina mBSA pomiješa s CFA u volumnom omjeru 1:1, uvlačenjem nekoliko puta kroz injekcijsku iglu provrta 22G kako bi se sastojci dobro promiješali i nastala emulzija. Konačna je koncentracija mBSA u emulziji 1 mg/mL, a *M. Tuberculosis* 0,5 mg/mL. Primarna imunizacija izvodi se u anesteziji izazvanoj intraperitonealnom injekcijom 10 µL otopine 2,5% tribrometanova/g tjelesne mase (Sigma-Aldrich).

Sedmi dan nakon primarne imunizacije imuniziranim skupinama miševa (CTRL, AIA) ponovno je injicirana emulzija mBSA u CFA, intradermalnom injekcijom 100 µL emulzije u bazu repa (*booster*), dok je neimuniziranim miševima (NI) injicirano 100 µL 0,1M pufera PBS na isti način. Dvadeset i prvi dan nakon primarne imunizacije izravno u koljena injicirana je otopina mBSA koncentracije 5 µg/µL pripremljena otapanjem 5 mg mBSA u 0,9 mL destilirane vode i naknadnim dodavanjem 0,1 mL 1M pufera PBS. U anesteziji tribrometanolom napravljena je mala (<2 mm) kožna incizija iznad oba koljena zgloba. Skupini miševa s artritidom (AIA) injicirano je 10 µL otopine mBSA (ukupno 50 µg mBSA) u oba koljena zgloba, dok je miševima kontrolne imunizirane skupine (CTRL) te neimuniziranim miševima (NI) injicirano 10 µL 0,1M pufera PBS.

4.2.2. Žrtvovanje

Miševi su žrtvovani 10. dan poslije indukcije artritisa, odnosno 31. dan poslije primarne imunizacije. Nakon vaganja i uklanjanja kože iznad koljenog zgloba u tri uzastopna mjerenja kaliperom su određeni poprečni promjeri koljena flektiranog pod kutem od 90°. Potom su izvađena oba koljena zgloba zajedno s distalnim polovicama bedrene kosti i proksimalnim polovicama goljenične kosti te slezena i L2.



Slika 1. Ustroj pokusa. (A) Shematski prikaz vremenskog slijeda pokusa. (B) Tjelesna masa miševa (gornji graf) i promjer koljenog zgloba mjereno kaliperom (donji graf), 31. dan poslije imunizacije (10. dan artritisa). (C) Mikrofotografije reprezentativnih histoloških rezova koljenog zgloba obojani postupkom Goldner-Trichrome (povećanje 50x). Gore - zglob bez upalnih promjena; dolje - upalno promijenjeni zglob. M, metafiza; E, epifiza; H, hrskavica; Z, zglobna pukotina; S, sinovijalna ovojnica. Na upalno promijenjenom zglobovidljiva je zadebljana sinovijalna ovojnica prožeta upalnim stanicama, eksudat u zglobnom prostoru, oštećenje subkondralne kosti te gubitak metafiznih i epifiznih koštanih gredica. d, dan poslije imunizacije; NI, neimunizirana skupina miševa; CTRL, imunizirana kontrolna skupina miševa bez artritisa; AIA, skupina miševa s artritisom; μCT, mikro-kompjutorizirana tomografija; FACS, protočno-citometrijska analiza (prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*). * $p < 0,05$, Kruskal-Wallis test

4.3. Protočna citometrija

Za analizu stanica slezene jednostanična suspenzija pripremljena je usitnjavanjem tkiva slezene pritiskanjem pomoću klipa šprice te višestrukim protiskivanjem suspenzije kroz iglu provrta 23 G, a potom kroz najlonsku mrežicu promjera okna 100 μm. Suspenzija stanica koštane srži dobivena je ispiranjem koštane srži puferom PBS-a koristeći iglu provrta 23G, dok su stanice sinovijalnog odjeljka dobivene izoliranjem koljena presijecanjem u razini epifizne ploče bedrene i goljenične kosti te ispiranjem preostale subepifizijalne koštane srži, nakon čega je u izolirano koljeno injicirana otopina 1 mg/mL kolagenaze tipa IV (Sigma-Aldrich) i inkubirana 1 sat na 37°C. Nakon inkubacije koljena su otvorena i isprana puferom PBS-a te je jednostanična suspenzija pripremljena višestrukim protiskivanjem kroz iglu provrta 23G, a potom kroz

najlonsku mrežicu promjera okna 100 μm . Nakon spuštanja stanica na dno epruvete centrifugiranjem 5 minuta/250g pri temperaturi 4°C dodano je 2 mL pufera za lizu eritrocita, inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi te su stanice ponovno oprane centrifugiranjem 5 minuta/250g, pri temperaturi 4°C i resuspendirane u puferu PBS. Udio upalnih stanica određen je bojenjem pomoću fluorescentno konjugiranih protutijela Gr1-PE (klon RB6-8C5, razrjeđenje 1:400, BD eBioscience, SAD) te CD11b-PECy7 (klon M1/70, razrjeđenje 1:400, eBioscience, SAD) 30min/4°C. Vezanje fluorescentno obilježenih protutijela mjereno je pomoću Attune uređaja za protočnu citometriju (Applied Biosystems, Foster City, SAD), a podatci su analizirani korištenjem programa FlowJo (FlowJo, Ashland, Oregon, SAD). Mrtve stanice uklonjene su iz analize na temelju vezivanja 7-amino-aktinomicina (7-AAD, BD Biosciences, SAD).

4.4. Mikro-kompjutorizirana tomografija (μCT)

Lijeve bedrene kosti i kralješci L2 snimljeni su uređajem za mikro-kompjutoriziranu tomografiju (1076 SkyScan, SkyScan, Kontich, Belgija), svakih 0.4° kroz 180° rotacije pri rezoluciji od 9 μm uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm. Skenirane slike rekonstruirane su pomoću programa NRecon (SkyScan). Ispravljanje položaja kosti napravljeno je pomoću programa Dataviewer (SkyScan). Kvantitativna analiza koštanih gredica provedena je pomoću programa CTAnalyser (SkyScan). Područje su mjerenja cilindri tijela kralješka duljine 0,9 mm (100 presjeka), udaljeni 0,9 mm (100 presjeka) od gornje granice hrskavice i kosti obuhvaćajući isključivo trabekularnu kost.

Slično, područje bedrene epifizne trabekularne kosti za analizu i trodimenzionalnu rekonstrukciju određeno je isječcima duljine 300 μm dobivenim ručnim iscrtavanjem područja interesa (ROI, prema engl., *region of interest*) na svakih 50 μm između razine spajanja kondila proksimalno i epifizine hrskavice distalno, izbjegavajući početak subepifiznih koštanih zgušnjavanja, a obuhvaćajući isključivo trabekularnu kost.

Područje metafizne trabekularne kosti za analizu i trodimenzionalnu rekonstrukciju određeno je isječcima duljine 1 mm dobivenim ručnim iscrtavanjem područja interesa na svakih 200 μm , udaljeno 500 μm od epifizine hrskavice, a obuhvaćajući isključivo trabekularnu kost.

Analizom su određene sljedeće varijable: postotak koštanog volumena u ukupnom volumenu područja interesa (BV/TV, prema engl., *bone volume/tissue volume*; %), debljina koštanih gredica

(Tb.Th., prema engl., *trabecular thickness*; μm), broj koštanih gredica (Tb.N., prema engl., *trabecular number*; mm^{-1}) te razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp., prema engl., *trabecular separation*; μm).

4.5. Statistička analiza

Na grafičkim prikazima označene su pojedinačne vrijednosti za svakog miša, a vodoravne crte označavaju srednju vrijednost i standardnu devijaciju. Za usporedbu između skupina korišten je Kruskal-Wallis test s post-hoc usporedbom između skupina (Conover 1999). Razina značajnosti postavljena je na $p < 0.05$. Za analizu povezanosti korišten je neparametrijski Spearmanov korelacijski test, a prikazane su vrijednosti Spearmanovog korelacijskog koeficijenta (ρ) i razina značajnosti (p).

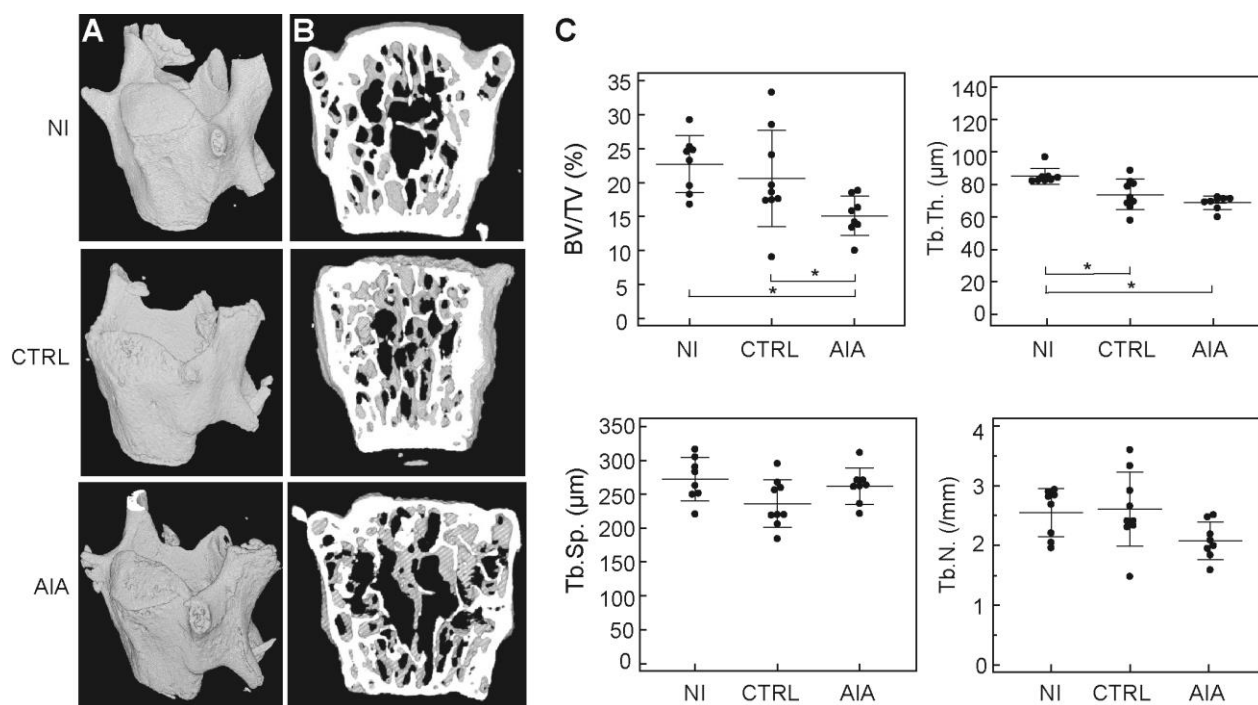
5. REZULTATI

5.1. Imunizacija izaziva generaliziranu osteopeniju, a za zglobnu upalu specifičan je gubitak subkondralne kosti u epifizama uz zahvaćeni zglob

Na površini tijela drugih lumbalnih kralježaka imuniziranih skupina (CTRL, AIA) vidljiva su višestruka erozivna oštećenja koja nedostaju u neimuniziranih miševa (NI, Slika 2A). Analiza trabekularne kosti u tijelu drugog lumbalnog kralješka učinjena postupkom μ CT pokazala je značajno stanjenje koštanih gredica u obje imunizirane skupine miševa, koje je bilo posebno naglašeno u skupini AIA (slika 2B-C). Debljina gredica u skupini NI ($88,93 \pm 4,98 \mu\text{m}$) bila je značajno veća u odnosu na skupine CTRL ($77,35 \pm 9,55 \mu\text{m}$) i AIA ($72,26 \pm 4,19 \mu\text{m}$) ($p=0,0012$, Kruskal-Wallis test). Usprkos stanjenju gredica volumen trabekularne kosti nije bio značajno manji u skupini CTRL ($20,64 \pm 7,10 \%$) u odnosu na skupinu NI ($22,73 \pm 4,18 \%$), uz značajno smanjenje volumena u skupini AIA u odnosu na obje kontrolne skupine ($15,13 \pm 2,89 \%$, $p=0,01$, Kruskal-Wallis test, Slika 2B-C). Udaljenost i broj koštanih gredica nisu se međusobno razlikovali između pokusnih skupina. Ovaj nalaz potvrđuje da sama imunizacija izaziva generaliziranu osteopeniju koja se manifestira stanjenjem koštanih gredica bez gubitka koštanog volumena drugog lumbalnoga kralješka. Nastup zglobne upale dodatno pojačava koštanu resorpciju i dovodi do još većeg generaliziranog smanjenja koštanog volumena.

U metafiznim dijelovima bedrene kosti vidljivo je stanjenje i gubitak koštanih gredica u metafiznom dijelu bedrene kosti (Slika 3A). Kvantitativna analiza trabekularne kosti u femoralnim metafizama pokazala je značajno ($p=0,0014$) smanjenje koštanog volumena i debljine koštanih gredica u imuniziranih kontrolnih miševa (CTRL, BV/TV $5,97 \pm 2,85 \%$, Tb.Th. $70,68 \pm 8,89 \mu\text{m}$) i miševa s artritismom (AIA, BV/TV $3,88 \pm 1,59 \%$, Tb.Th. $62,48 \pm 5,45 \mu\text{m}$) u odnosu na neimuniziranu skupinu miševa (NI, BV/TV $11,16 \pm 2,32 \%$, Tb.Th. $75,15 \pm 4,84 \mu\text{m}$). Za razliku od L2 u metafizama bedrene kosti značajno je povećana razdvojenost koštanih gredica u CTRL ($351,57 \pm 39,75 \mu\text{m}$) i AIA ($401,34 \pm 58,45 \mu\text{m}$) skupini u odnosu na neimuniziranu skupinu ($298,55 \pm 23,48 \mu\text{m}$, $p=0,0004$) te smanjen broj koštanih gredica ($0,84 \pm 0,36 /\text{mm}$ u CTRL skupini, $0,61 \pm 0,22 /\text{mm}$ u AIA skupini) u odnosu na NI skupinu ($1,45 \pm 0,24 /\text{mm}$, $p=0,0005$, Kruskal-Wallis test, Slika 3C). Statistički su se značajno razlikovali i svi navedeni parametri

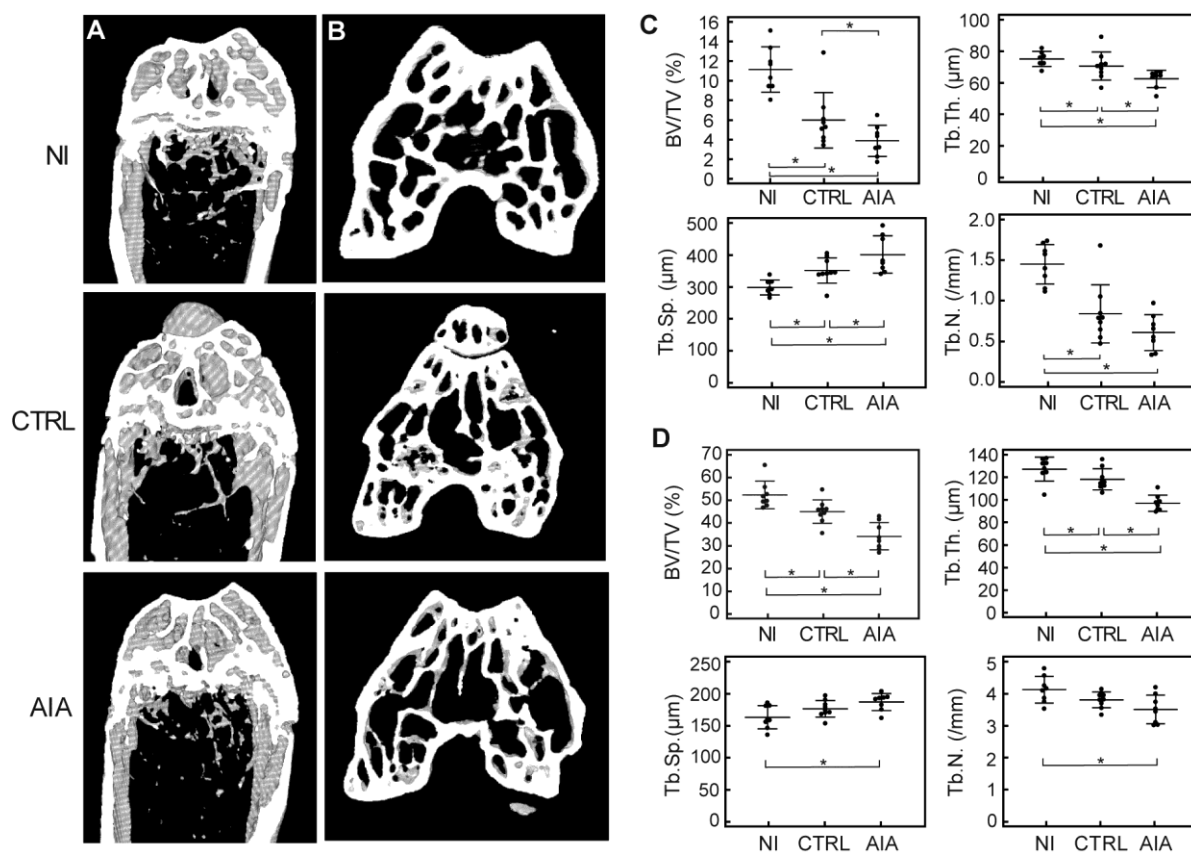
između skupina AIA i CTRL. Razlika između skupina CTRL i NI bila je veća nego razlika između skupina CTRL i AIA, što upućuje na dominantan utjecaj imunizacije na gubitak metafizne trabekularne kosti koji je dodatno potaknut zglobnom upalom.



Slika 2. Reprezentativni 3D modeli vanjske građe (A) i frontalni presjeci (B) kroz tijela drugog lumbalnog kralješka dobiveni postupkom mikro-kompjutorizirane tomografije neimuniziranih miševa (NI, n=8), miševa imunizirane kontrolne skupine (CTRL, n=9) i miševa s artritismom (AIA, n=8). Pokusi su ponovljeni tri puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Višestruke koštane erozije i stanjenje/gubitak koštanih gredica vidljivi su na kralješcima skupina CTRL i AIA, dok iste promjene nedostaju u skupini NI. (C) Volumen koštanih gredica (BV/TV, prema engl., *bone volume/tissue volume*; %), debljina gredica (Tb.Th., prema engl., *trabecular thickness*; µm), razdvojenost gredica (Tb.Sp., prema engl., *trabecular separation*; µm) i broj gredica (Tb.N., prema engl., *trabecular number*; mm⁻¹). Označene su pojedinačne vrijednosti unutar svake skupine (crni kružići), a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu ±SD, * statistički značajna razlika, p<0,05, Kruskal-Wallis test.

U epifiznim dijelovima bedrene kosti vidljivo je stanjenje koštanih gredica u obje skupine imuniziranih miševa koje je posebno naglašeno u skupini AIA (Slika 3B). Kvantitativna analiza volumena gredica u femoralnim epifizama pokazala je značajno smanjenje volumena u obje skupine imuniziranih životinja (CTRL 45,06±5,17 % , AIA 34,21±6,04 % skupini) u odnosu na skupinu neimuniziranih životinja (NI, 52,40±6,03 %, p=0.0002, Kruskal-Wallis test, Slika 3D). Debljina epifiznih koštanih gredica bila je također značajno smanjena u imuniziranih miševa (CTRL, 118,16±9,36 µm, AIA 97,12±7,16 µm) u odnosu na skupinu neimuniziranih miševa (NI

127,25±10,48 μm , $p=0,0003$, Kruskal-Wallis test, Slika 3D). I volumen i debljina koštanih gredica bila je dodatno značajno smanjena u skupini AIA u odnosu na CTRL (Slika 3D). Razdvojenost koštanih gredica bila je značajno veća, a njihov broj značajno manji u skupini AIA (Tb.Th. 187,13±13,25 μm , Tb.N. 3,51±0,45 mm^{-1}) u odnosu na skupinu NI (Tb.Th. 163,24±18,01 μm , Tb.N. 4,13±0,42 mm^{-1} , $p<0,05$, Kruskal-Wallis test). Razlika u koštanim parametrima bila je veća između skupine miševa s artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu miševa nego razlika između kontrolne imunizirane i neimunizirane skupine, na temelju čega možemo zaključiti da je najveći dio gubitka epifizne kosti posljedica zglobne upale.



Slika 3. Reprezentativni 3D modeli frontalnih presjeka kroz proksimalni dio bedrene kosti (A) i vodoravnih presjeka kroz femoralnu epifizu (B) dobiveni postupkom mikro-kompjutorizirane tomografije bedrenih kostiju neimuniziranih miševa (NI, n=9), imuniziranih kontrolnih miševa (CTRL, n=9) i miševa s artritismom (AIA, n=8). Pokusi su ponovljeni tri puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Stanjenje i/ili gubitak metafiznih i epifiznih koštanih gredica vidljivo je u CTRL i AIA skupini miševa, u usporedbi sa skupinom NI. (C) Statistička analiza volumena koštanih gredica (BV/TV, prema engl., *bone volume/ tissue volume*; %), debljine gredica (Tb.Th., prema engl., *trabecular thickness*; μm), razdvojenosti gredica (Tb.Sp., prema engl., *trabecular separation*; μm) i broja gredica (Tb.N., prema engl., *trabecular number*; mm^{-1}) u metafiznom i (D) epifiznom dijelu bedrene kosti. Označene su pojedinačne vrijednosti unutar svake skupine (crni kružići), a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu $\pm\text{SD}$, * statistički značajna razlika, $p<0,05$, Kruskal-Wallis test

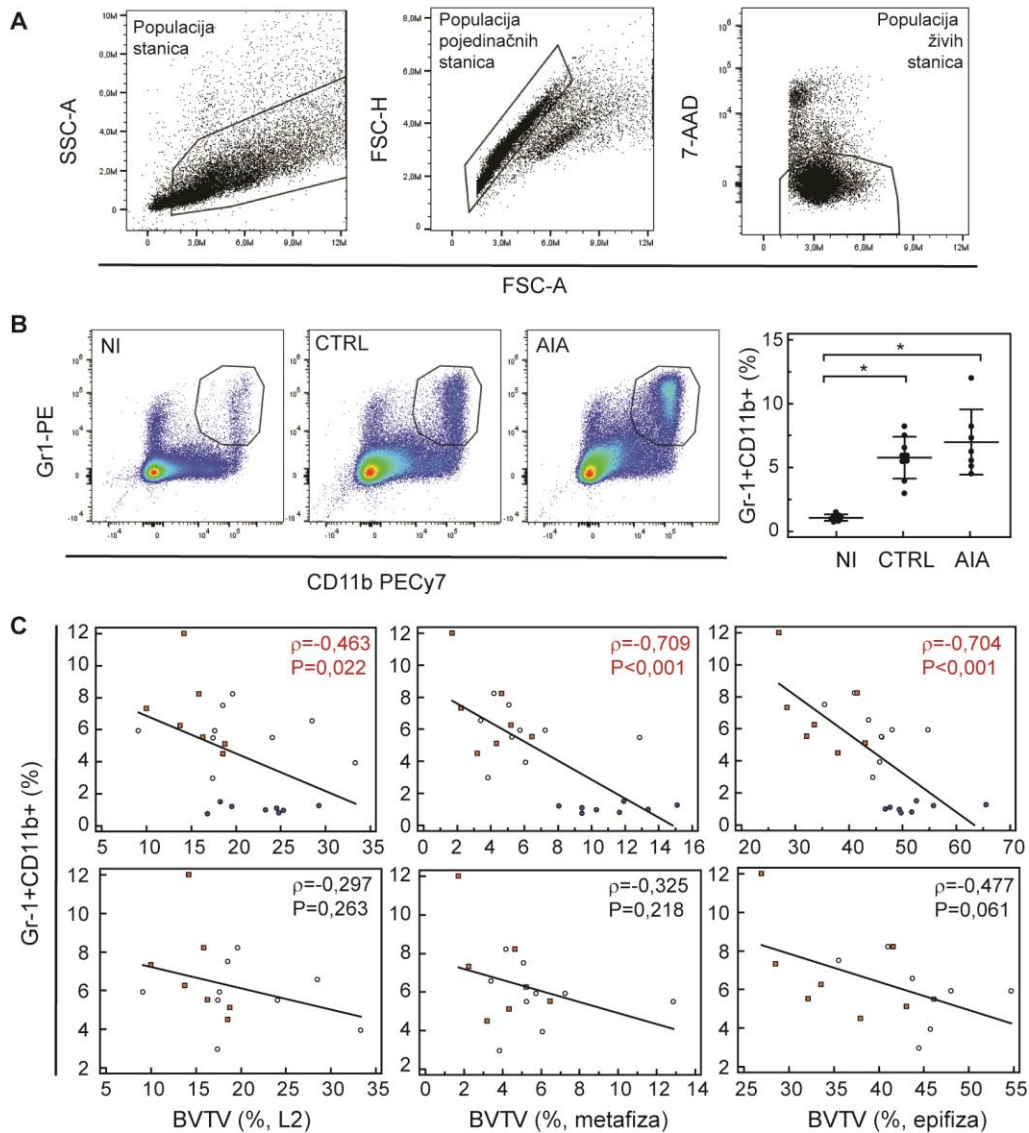
5.2. Imunizacija izaziva sustavnu mobilizaciju i povećanje udjela stanica mijeloidne loze, a zglobna upala specifično potiče njihovo nakupljanje u zahvaćenim zglobovima

Imunizacija pokusnih miševa izaziva pojačanu mobilizaciju mijeloidnih stanica fenotipa CD11b⁺Gr1⁺ (Slika 4B) i porast njihovog udjela u slezeni u obje skupine imuniziranih miševa (CTRL 5,78±1,62 %, AIA 6,13±3,38%) u odnosu na skupinu neimuniziranih miševa (1,07±0,25 %, p=0,0004, Kruskal-Wallis test, Slika 4B). Udio mijeloidnih stanica u slezeni negativno je značajno povezan s volumenom koštanih gredica u kralješcima te femoralnim metafizama i epifizama (Slika 4C, gornji panel). Slična povezanost pronađena je i za ostale koštane parametre (nije pokazano). Ukoliko se iz analize izuzme neimunizirana skupina miševa, ta se povezanost gubi (slika 4C, donji panel) što upućuje na zaključak da sam postupak imunizacije izaziva pojačanu mobilizaciju mijeloidnih stanica i generalizirani gubitak kosti koji podjednako zahvaća sve dijelove kostura, a sama zglobna upala nema učinka na sustavno povećanje udjela mijeloidnih stanica i generaliziranu osteopeniju.

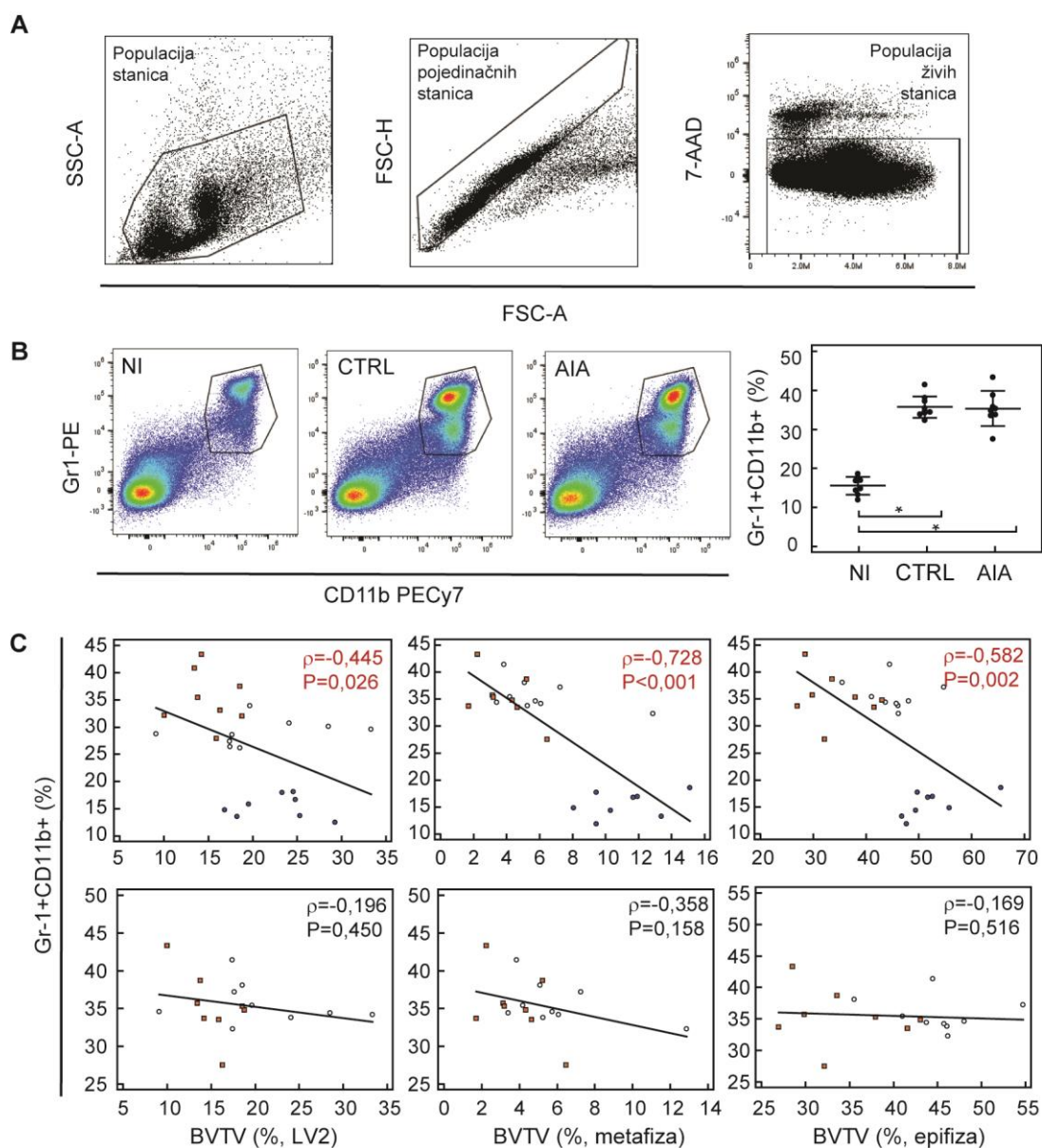
Mijeloidne stanice pojačano se nakupljaju i u subkondralnoj koštanoj srži imuniziranih životinja gdje je njihov udio značajno veći (CTRL 35,71±2,76 %, AIA 35,31±4,51 %) u odnosu na skupinu neimuniziranih miševa (NI, 15,55±2,31 %, p=0,0004, Kruskal-Wallis test, Slika 5B). Udio mijeloidnih stanica u koštanoj srži analiziran u svih pokusnih životinja značajno je negativno povezan sa volumenom koštanih gredica u L2 te femoralnim metafizama i epifizama (Slika 5C, gornji panel), a slično analizi stanica slezene ta povezanost nestaje kad se iz analize izuzme neimunizirana skupina (Slika 5C, donji panel), što upućuje na zaključak da je nakupljanje upalnih stanica u metafiznoj koštanoj srži posljedica imunizacije i povezano je s razvojem generalizirane osteopenije.

Udio mijeloidnih stanica u zglobu povećan je skupini CTRL (38,16±4,80 %) u odnosu na skupinu NI (10,80±4,16 %), ali je značajno manji u odnosu na skupinu AIA (50,58±10,11 %, p=0,0001, Kruskal-Wallis test, Slika 6B). Udio mijeloidnih stanica u zglobu analiziran u svih pokusnih životinja značajno je negativno povezan s volumenom koštanih gredica u femoralnim metafizama i epifizama (Slika 6C, gornji panel) uz vrlo slabu povezanost s volumenom koštanih gredica u lumbalnim kralješcima. Suprotno analizi stanica slezene i koštane srži ta povezanost ostaje značajna i kad se iz analize izuzme neimunizirana skupina miševa (Slika 6C, donji panel), što

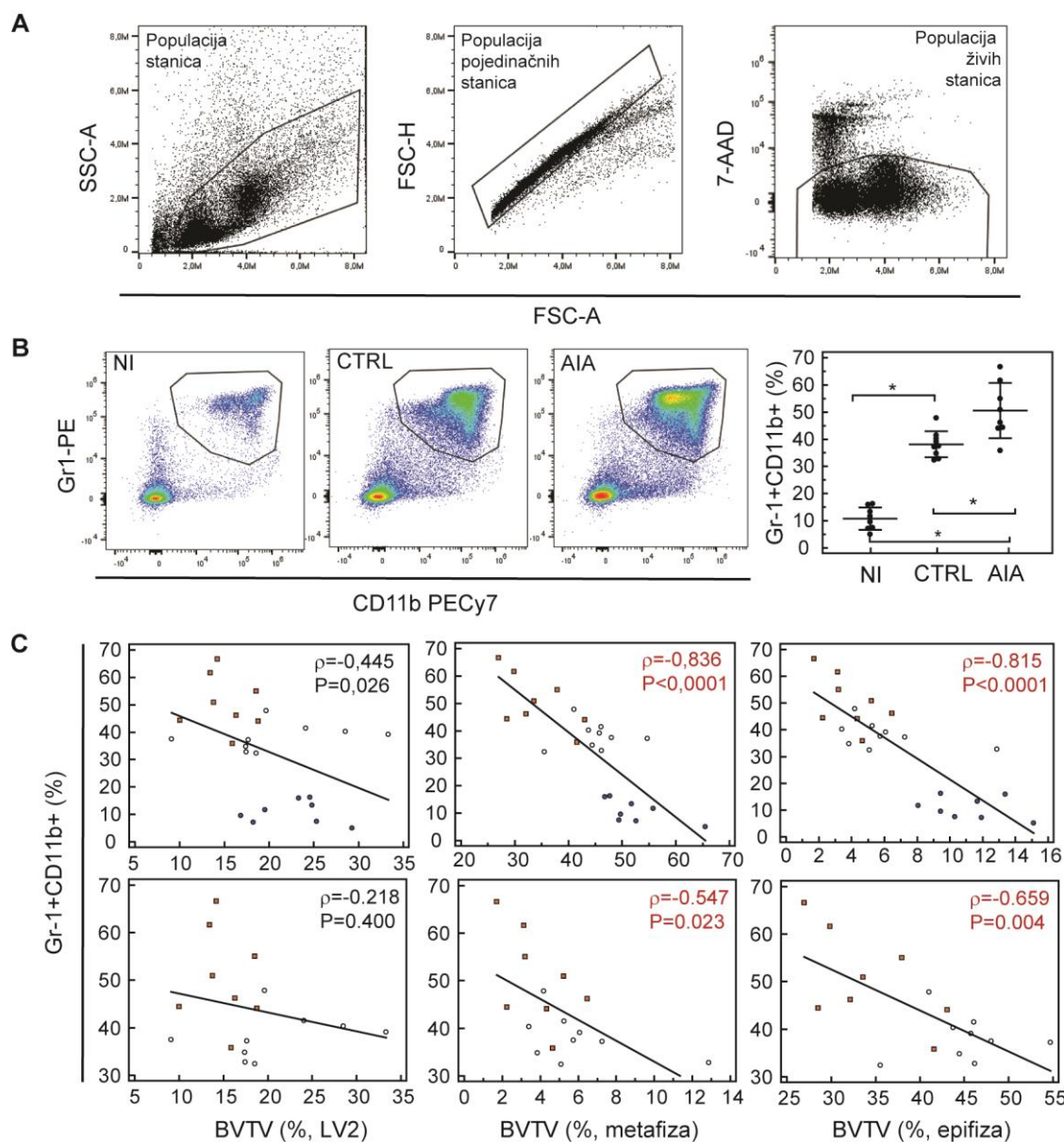
upućuje na zaključak da nakupljanje upalnih stanica u zglobu posreduje zglobnu upalu i oštećenje subkondralne kosti.



Slika 4. Protočno-citometrijska analiza udjela mijeloidnih ($CD11b^{+}Gr1^{+}$) stanica u slezeni kontrolne skupine imuniziranih miševa (CTRL, $n=9$), miševa s artritisom (AIA, $n=7$) i neimuniziranih miševa (NI, $n=8$). Pokusi su ponovljeni dva puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. **(A)** Udio mijeloidnih stanica određen je u unutar živih pojedinačnih stanica, koje su odabrane za analizu na temelju njihove sposobnosti izazivanja ogiba (FSC, prema engl., *forward scatter*) i refleksije (SSC, prema engl., *side scatter*) laserskog snopa svjetlosti te isključenja mrtvih stanica obilježenih 7-amino aktinomomicinom (7-AAD). **(B)** Udio mijeloidnih stanica obilježenih protutijelima na granulocitni biljeg Gr1 (Gr1-PE) i biljeg CD11b (CD11b-PECy7) značajno je veći u CTRL i AIA skupini u odnosu na NI skupinu miševa, $*p<0,05$, Kruskal-Wallis test **(C)** Udio mijeloidnih stanica negativno je povezan s volumenom koštanih gređica (BV/TV; %) u lumbalnim kralješcima te femoralnoj metafizi i epifiziji (gornji panel), a ta povezanost nestaje kad se iz analize isključe neimunizirani miševi (donji panel). ρ , Spearmanov korelacijski koeficijent; P, razina statističke značajnosti; plavi kružić, NI; bijeli kružić, CTRL; crveni kvadratić, AIA.



Slika 5. Protočno-citometrijska analiza udjela mijeloidnih ($CD11b^+Gr1^+$) stanica u metafiznoj koštanoj srži kontrolne skupine imuniziranih miševa (CTRL, $n=9$), miševa s artritisom (AIA, $n=8$) i neimuniziranih miševa (NI, $n=8$). Pokusi su ponovljeni dva puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. **(A)** Udio mijeloidnih stanica određen je u unutar živih pojedinačnih stanica, koje su odabrane za analizu na temelju njihove sposobnosti izazivanja ogiba (FSC, prema engl., *forward scatter*) i refleksije (SSC, prema engl., *side scatter*) laserskog snopa svjetlosti te isključenja mrtvih stanica obilježenih 7-amino aktinomycinom (7-AAD). **(B)** Udio mijeloidnih stanica obilježenih protutijelima na granulocitni biljeg Gr1 (Gr1-PE) i biljeg CD11b (CD11b-PECy7) značajno je veći u CTRL i AIA skupini u odnosu na NI skupinu miševa, $*p < 0,05$, Kruskal-Wallis test **(C)** Udio mijeloidnih stanica negativno je povezan s volumenom koštanih gredica (BV/TV; %) u lumbalnim kralješcima te femoralnoj metafizi i epifizi (gornji panel), a ta povezanost nestaje kad se iz analize isključe neimunizirani miševi (donji panel). ρ , Spearmanov korelacijski koeficijent; P, razina statističke značajnosti; plavi kružić, NI; bijeli kružić, CTRL; crveni kvadratić, AIA.



Slika 6. Protočno-citometrijska analiza udjela mijeloidnih ($CD11b^+Gr1^+$) stanica u sinovijalnom odjeljku kontrolne skupine imuniziranih miševa (CTRL, $n=9$), miševa s artritisom (AIA, $n=8$) i neimuniziranih miševa (NI, $n=8$). Pokusi su ponovljeni dva puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. **(A)** Udio mijeloidnih stanica određen je u unutar živih pojedinačnih stanica, koje su odabrane za analizu na temelju njihove sposobnosti izazivanja ogiba (FSC, prema engl., *forward scatter*) i refleksije (SSC, prema engl., *side scatter*) laserskog snopa svjetlosti te isključenja mrtvih stanica obilježenih 7-amino aktinomicinom (7-AAD). **(B)** Udio mijeloidnih stanica obilježenih protutijelima na granulocitni biljeg Gr1 (Gr1-PE) i biljeg CD11b (CD11b-PECy7) značajno je različit između svih ispitivanih skupina miševa, $*p < 0,05$, Kruskal-Wallis test **(C)** Udio mijeloidnih stanica negativno je povezan s volumenom koštanih gredica (BV/TV; %) u lumbalnim kralješcima te femoralnoj metafizi i epifiziji. ρ , Spearmanov kolerajski koeficijent; P, razina statističke značajnosti; plavi kružić, NI; bijeli kružić, CTRL; crveni kvadratić, AIA.

6. RASPRAVA

Rezultati ovoga istraživanja jasno pokazuju da se u tijeku artritisa potaknutog antigenom (AIA., prema engl., *antigen-induced arthritis*) razvija generalizirana osteopenija koja nije posljedica artritisa, već je rezultat imunizacijskog protokola. Osteopeniju izazvanu imunizacijom karakterizira stanjivanje koštanih gredica aksijalnog kostura i metafiza bedrenih kostiju, a koštani volumen kralježaka smanjuje se tek s nastupom artritisa, što govori u prilog dodatnog djelovanja artritisa na generalizirani gubitak kosti. Lokalni gubitak kosti vezan uz artritis najspecifičnije pogađa epifizne dijelove dugih kostiju uz zahvaćeni zglob.

Generalizirani gubitak kosti čest je nalaz u tijeku autoimunih bolesti (Straub *i sur.* 2015), kroničnih infekcija (Lin *i sur.* 2012) ili je posljedica uporabe određenih lijekova, primjerice kortikosteroida (Soybilgic *i sur.* 2014). Sustavno povećanje razine proupalnih citokina sudjeluje i u razvoju postmenopauzalne osteoporoze (Rosen 2014). Neovisno o etiologiji osteoporoza povećava rizik od prijeloma kostiju što u konačnici dovodi i do povećanog općeg mortaliteta (Bliuc *i sur.* 2015), zbog čega se pacijentima s reumatoidnim artritisom (RA) često daju antiresorptivni lijekovi. S druge strane, RA je autoimuna bolest koja specifično pogađa zahvaćene zglobove izazivajući lokalno razaranje kosti s posljedičnim deformacijama i invalidnošću bolesnika. Ovakva lokalna osteopenija ima različit mehanizam i posljedice od ranije opisane generalizirane osteopenije.

Većina mišjih modela RA u podlozi ima opće povećanje aktivnosti stanica imunskog sustava te je stoga pri procjeni lokalnog učinka artritisa na kost potrebno uzeti u obzir i moguću pojavu generalizirane osteopenije koja može prikriti lokaliziranu osteoresorpciju ili pak dovesti do toga da se koštana resorpcija koja je rezultat generalizirane osteopenije tumači kao razaranje kosti koje je posljedica artritisa. Naše istraživanje jasno pokazuje da se ta dva mehanizma preklapaju i da, ovisno o cilju istraživanja, treba točno definirati područja kostura u kojima se izvode mjerenja.

Za model AIA karakterističan je lokalni monoartritis u zahvaćenom koljenu, a neke ranije studije isključuju sustavne učinke modela (Engdahl *i sur.* 2013). Poticanje artritisa uključuje imunizaciju dvjema potkožnim injekcijama CFA sa svrhom aktivacije mijeloidnih stanica i makrofaga koji lučenjem proupalnih citokina, posebice IL-12 i IFN- γ , potom aktiviraju CD4⁺ limfocite T i potiču njihovo usmjeravanje u limfocite T_{H1} koji dalje pojačavaju upalni odgovor. Opisano je da

CFA tjednima nakon injiciranja može izazvati poremećaj funkcije stanica koštane srži i aktivaciju mijeloidnih prethodničkih stanica, što je potvrđeno na mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom (Matthys *i sur.* 1999). Nadalje, istraživanja provedena na modelu adjuvantnog artritisa i artritisa potaknutog kolagenom u štakora pokazala su promjene u koštanoj srži praćene povišenom aktivnošću IL-1 i IL-6, dominantnih proupalnih citokina koji posreduju sustavni gubitak kosti (Hayashida *i sur.* 1992). Pored navedenog mijeloidna loza sadržava prethodničke stanice osteoklasta čija generalizirana aktivacija i migracija doprinosi gubitku kosti u mišjem modelu CIA (Ikić Matijašević *i sur.* 2016).

U našim uvjetima imunizacija je izazvala značajno povećanje udjela mijeloidnih stanica u slezeni, metafiznoj koštanoj srži dugih kostiju i zglobovima imuniziranih miševa, što je u skladu s ranije opisanim promjenama staničnih populacija slezene i koštane srži tijekom imunizacije u modelu CIA (Matthys *i sur.* 1999). Sustavno povećanje udjela mijeloidnih stanica isključiva je posljedica imunizacije jer izostaje njihov daljnji porast u slezeni i koštanoj srži miševa s artritismom u odnosu na skupinu kontrolnih imuniziranih miševa. Nadalje, taj je porast jasno povezan s gubitkom koštane mase te možemo zaključiti da model AIA sustavno aktivira upalne stanice koje posreduju generalizirani gubitak kosti.

S druge strane, značajan dodatan porast udjela mijeloidnih stanica u skupini miševa s artritismom u odnosu na imunizirane životinje bez artritisa vidljiv je u samim zglobovima, a značajna povezanost toga udjela s gubitkom epifiznih i metafiznih koštanih gredica opaža se i unutar skupine imuniziranih životinja, što govori u prilog tvrdnji da je lokalno nakupljanje tih stanica ključno za specifične koštane promjene potaknute nastupom artritisa.

Gubitak koštanog volumena u modelu AIA najizraženiji je u metafizama dugih kostiju uz zahvaćeni zglob, a najveći gubitak može se pripisati imunizaciji jer imunizirani miševi izgube 47% koštanog volumena u odnosu na neimuniziranu skupinu, dok artritis izaziva dodatni gubitak od 19%. Volumen koštanih gredica u lumbalnim kralješcima smanjuje se u manjoj mjeri nego u femoralnim metafizama, i to za 10% u skupini imuniziranih miševa te dodatnih 24% u miševa s artritismom. Sličan veći gubitak koštanih gredica u tibijalnoj metafizi nego u tijelu drugog lumbalnog kralješka opažen je u mišjem soju C57BL/6 i u modelu osteoporoze potaknute ovarijektomijom (Bouxsein ML *i sur.* 2005).

Imunizacija blaže pogađa femoralne epifizne gredice, gdje je smanjenje volumena 10%, a s pojavom artritisa gubi se dodatnih 35% volumena. Pri kvantifikaciji volumena koštanih gredica uglavnom se mjeri područje metafiznih dijelova dugih kostiju.

Naše istraživanje jasno pokazuje da gubitak metafiznih koštanih gredica može biti posljedica sustavne aktivacije upalnih stanica i da je vjerodostojniji pokazatelj generalizirane osteopenije nego lokalnog koštanog razaranja uzrokovanog zglobnom upalom. Stoga mjerenje metafizne kosti nije dovoljno pouzdano za istraživanja koja su usmjerena na lokalne koštane učinke artritisa. Tijekom istraživanja uspostavili smo postupak kojim možemo reproducibilno izmjeriti koštani volumen epifiznih koštanih gredica te utvrdili da za razliku od metafizne epifizna trabekularna kost predstavlja puno bolji pokazatelj lokalnog zglobnog oštećenja u AIA. Na taj način ovaj rad može doprinijeti budućem razvoju spoznaja o imunološki posredovanim mehanizmima nastanka bolesti i novim terapijskim mogućnostima.

7. ZAKLJUČCI

1. Imunizacija antigenom u Freundovom adjuvansu u modelu AIA izaziva sistavne učinke karakterizirane povećanjem udjela mijeloidnih stanica u slezeni i koštanoj srži te generaliziranu osteopeniju.
2. Generalizirana osteopenija zahvaća u najvećoj mjeri metafizne koštane gredice dugih kostiju, a u manjoj mjeri lumbalne kralješke i epifizne koštane gredice dugih kostiju.
3. Artritis je u modelu AIA praćen dodatnim nakupljanjem upalnih stanica mijeloidne loze u zahvaćenim zglobovima, a izaziva najveći gubitak epifiznih koštanih gredica.
4. Mjerenje volumena epifiznih koštanih gredica najpouzdaniji je kvantitativni pokazatelj lokalnog koštanog razaranja specifičnog za artritis.

8. ZAHVALE

Zahvaljujemo svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataši Kovačić na susretljivosti i pruženoj prilici za neposredno upoznavanje sa svim stadijima znanstvenog istraživanja, ukazanom povjerenju tijekom našeg samostalnog rada te na stručnoj podršci, neprestanom usmjeravanju i savjetima.

Hvala prof. dr. sc. Vedranu Kataviću i Nini Lukač, dr. med. na brojnim savjetima i usmjeravanju našeg znanstvenog razmišljanja.

Također zahvaljujemo Katerini Zrinski-Petrović, med. lab. teh. na pomoći pri izvođenju pokusa i na strpljenju prilikom usvajanja vještina rada u laboratoriju.

Na kraju hvala prijateljici Zrinki na pravopisnom usavršavanju našeg rada.

9. POPIS LITERATURE

- Araki Y, Mimura T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape. *J Immunol Res* 2016;1-10
- van den Berg WB, Joosten LAB, van Lent PLEM. Murine antigen-induced arthritis. *Methods Mol Med* 2007;136:243–53.
- Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70(6):849–60.
- Bliuc D, Alarkawi D, Nguyen T V., Eisman JA, Center JR. Risk of subsequent fractures and mortality in elderly women and men with fragility fractures with and without osteoporotic bone density: The dubbo osteoporosis epidemiology study. *J Bone Miner Res* 2015;30(4):637–46.
- Bouxsein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Miner Res* 2005;20(7):1085-92
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977;20(3):841–50.
- Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med* 2005;55(2):114–22.
- Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007;2(5):1269–75.
- Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008;10(5):223.
- Conover WJ. Practical nonparametric statistics, 3rd edition. John Wiley & Sons 1999.
- Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: Systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14(3):231–7.
- Engdahl C, Lindholm C, Stubelius A, Ohlsson C, Carlsten H, Lagerquist MK. Periarticular bone loss in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2857–65.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 2002;46(2):298–308.
- Hayashida K, Ochi T, Fujimoto M, Owaki H, Shimaoka Y, Ono K, *i sur*. Bone marrow changes in adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. Interleukin-1 and interleukin-6 activity and abnormal myelopoiesis. *Arthritis Rheum* 1992;35(2):241–5.

- Ikić Matijašević M, Flegar D, Kovačić N, Katavić V, Kelava T, Šućur A, *i sur.* Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 2016;186(3):321–35.
- Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2009;60(12):3613–22.
- Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19th edition. New York: McGraw-Hill 2015; str. 2136-49
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, *i sur.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10(13):4025–31.
- Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87(5):811–22.
- Lin J-C, Hsieh T-Y, Wu C-C, Chen P-J, Chueh T-H, Chang W-K, *i sur.* Association between chronic hepatitis C virus infection and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2012;91(6):423–9.
- Matsumoto I. Arthritis Provoked by Linked T and B Cell Recognition of a Glycolytic Enzyme. *Science* 1999;286(5445):1732–5.
- Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Schols D, *i sur.* Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells. *J Immunol* 1999;163(6):3503–10.
- McHugh KP, Shen Z, Crotti TN, Flannery MR, O'Sullivan RP, Purdue PE, *i sur.* The role of cell-substrate interaction in regulating osteoclast activation: potential implications in targeting bone loss in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69 Suppl 1:i83–5.
- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007;9(6):223.
- Pan M, Kang I, Craft J, Yin Z. Resistance to Development of Collagen-Induced Arthritis in C57BL/6 Mice Is Due to a Defect in Secondary, but Not in Primary, Immune Response. *J Clin Immunol* 2004;24(5):481–91.
- Rosen CJ. *N Engl J Med* 2005;353:595-603
- Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and

treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(11):656–64.

Scott DL, Pugner K, Kaarela K, Doyle D V, Woolf a, Holmes J, *i sur*. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(2):122–32.

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376(9746):1094–108.

Soybilgic A, Teshler M, Wagner-Weiner L, Onel KB. A survey of steroid-related osteoporosis diagnosis, prevention and treatment practices of pediatric rheumatologists in North America. *Pediatr Rheumatol Online J* 2014;12(1):24.

Stolina M, Schett G, Dwyer D, Vonderfecht S, Middleton S, Duryea D, *i sur*. RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNF alpha or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Res Ther* 2009;11(6):R187.

Straub RH, Cutolo M, Pacifici R. Evolutionary medicine and bone loss in chronic inflammatory diseases - A theory of inflammation-related osteopenia. *Semin Arthritis Rheum* 2015;45(2):220–8.

Trentham BYDE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146(3): 857–868.

Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(8):472-85

10. SAŽETAK

Procjena učinka imunizacije na generalizirani i subkondralni gubitak kosti u tijeku artritisa potaknutog antigenom

Martina Fadljević, Igor Radanović

Reumatoidni artritis (RA) je kronična sustavna autoimunosna bolest karakterizirana osteodestruktivnom upalom malih zglobova šake i stopala i posljedičnom invalidnošću bolesnika. Artritis potaknut antigenom (AIA) smatra se zglobno ograničenim mišjim modelom RA, bez sustavnih učinaka. Budući da model uključuje imunizaciju uz korištenje Freundovog adjuvansa, za koji je opisano postojanje sustavnih učinaka na stanice imunskog sustava, primarni cilj našeg istraživanja bio je utvrditi jakost tih učinaka u modelu AIA te razvija li se u okviru tog modela generalizirana osteopenija.

Miševi su podijeljeni u tri skupine: neimuniziranu skupinu, kontrolnu imuniziranu skupinu te skupinu miševa s artritismom. Volumen koštanih gredica procijenjen je mikro-kompjutoriziranom tomografijom u lumbalnim kralješcima te u femoralnim metafizama i epifizama. Pokazatelj učinka na stanice imunskog sustava bio je udio mijeloidnih (CD11b⁺Gr1⁺) stanica u slezeni, femoralnoj koštanoj srži te koljenom zglobu, određen protočnom citometrijom.

Rezultati su potvrdili da imunizacija u okviru AIA izaziva sustavni upalni odgovor koji se očituje povećanjem udjela mijeloidnih stanica u slezeni i koštanoj srži te generaliziranu osteopeniju, koja najjače pogađa koštane grede femoralnih metafiza. Lokalno nakupljanje mijeloidnih stanica i gubitak epifiznih koštanih gredica najjače su potaknuti artritismom. Budući da je učinak imunizacije na epifizne koštane grede minimalan, mjerenje u tom području je najpouzdaniji pokazatelj lokalnih koštanih učinaka artritisa.

Ključne riječi: reumatoidni artritis, artritis potaknut antigenom, imunizacija, Freundov adjuvans, kost

11. SUMMARY

Effects of immunization on the systemic and subchondral bone loss in antigen-induced arthritis

Martina Fadljević, Igor Radanović

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease marked by osteodestructive inflammation of joints of hands and feet and progressive disability. Antigen-induced arthritis (AIA) is considered as a localized murine model of RA, lacking systemic effects. Immunization protocol in AIA applies Freund's adjuvant, with well documented systemic effects on the cells of the immune system. Therefore, primary goal of our study was to determine intensity of systemic effects, especially the development of generalized osteopenia.

Mice were divided in three groups: non-immunized, immunized control, and a group with arthritis. Trabecular bone was measured using micro-computed tomography, in the second lumbar vertebrae, femoral metaphyses and epiphyses. To determine systemic, immune-related effect, proportion of myeloid (CD11b⁺Gr1⁺) cells was assessed by flow cytometry in the spleen, femoral bone marrow and knees.

Results indicate that immunization protocol in AIA induces systemic increase in proportion of myeloid cells accompanied by generalized bone loss, most prominent in femoral metaphyseal trabeculae. Significant accumulation of myeloid cells in knees affected by arthritis is accompanied by a loss of epiphyseal trabeculae. As immunization has a minimal effect on the epiphyseal trabecular bone, femoral epiphyses are the most reliable region for the quantitative assessment of the local osteodestructive effect of arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis, antigen-induced arthritis, immunization, Freund's adjuvant, bone