

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Vedrana Drvar

**IMUNOMODULACIJA MAKROFAGA SINOVIJSKE
MEMBRANE 7-KETOKOLESTEROLOM U BOLESNIKA S
OSTEOARTRITISOM**

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Vedrana Drvar

**IMUNOMODULACIJA MAKROFAGA SINOVIJSKE
MEMBRANE 7-KETOKOLESTEROLOM U BOLESNIKA S
OSTEOARTRITISOM**

Doktorski rad

Mentorica: prof. dr. sc. Gordana Laškarin, dr. med.

Komentorica: doc. dr. sc. Božena Ćurko-Cofek, dr. med.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Vedrana Drvar

**IMMUNOMODULATION OF SYNOVIAL MEMBRANE
MACROPHAGES BY 7- KETOCHOLESTEROL IN PATIENTS
WITH OSTEOARTHRITIS**

Doctoral thesis

Mentor: Prof. Gordana Laškarin, MD, PhD

Comentor: Ass. prof. Božena Ćurko-Cofek, MD, PhD

Rijeka, 2025.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Gordana Laškarin, dr. med.

Komentorica rada: doc. dr. sc. Božena Ćurko-Cofek, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta
u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Ovaj rad izrađen je u Specijalnoj bolnici za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma Thallassoherapia Opatija, Opatija i na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u suradnji s Klinikom za ortopediju Lovran, Lovran i Zavodom za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta/financijske potpore Sveučilišta u Rijeci pod naslovom “Aktivacija makrofaga u bolesnika s osteoartritisom”, br. Uniri-biomed-18-110; voditeljice prof. dr. sc. Gordane Laškarin.

ZAHVALE

Ovaj rad rezultat je vodstva, pomoći, savjeta i požrtvornosti mojih mentorica prof. dr. sc. Gordane Laškarin i doc. dr. sc. Božene Ćurko-Cofek. Zahvaljujući vašim nesebičnim radom i prijenosom znanja usmjerile ste me i naučile kako razmišljati i razvijati se u svijetu znanosti.

Posebno ipak moram zahvaliti prof. dr. sc. Gordani Laškarin. Zbog Vaše ustrajnosti u radu sa mnom i povjerenju koje mi svakodnevno dajete moja ljubav prema rutinskom radu u laboratoriju prerasla je i na rad u znanosti. Beskrajno Vam hvala na Vašoj dobroti i podršci na svim područjima mog života.

Velika hvala mojoj kolegici i prijateljici Snježani Hrabrić Vlah. Ti si ta koja mi je uvijek govorila da ja to mogu i moram. Hvala Kristini i Tanji jer se na njih uvijek mogu osloniti i svim drugima u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku koji su me hrabрили i podržavali tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Dalenu Legoviću i doc. dr. sc. Ljerki Karleuši Mujkić na pomoći u izradi ovog doktorskog rada.

Hvala svim mojim dragim prijateljima na njihovoj podršci i strpljenju.

Najveća hvala mojoj sestri Magdaleni i nećakinji Loti, mojim vjernim suputnicama na ovom putu i izvoru moje nepresušne ljubavi. Hvala mojoj baki na velikoj podršci i njenoj snazi.

Ovaj rad posvećujem onima koji su bili izvor moje najveće sreće i tuge. Mojoj sestri Ivani, mami i tati. Učili ste me da uvijek trebam biti pravedna, snažna i uporna. Zbog onoga što ste mi pružili uvijek ću se truditi to i biti.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti svojstva CD68⁺ makrofaga sinovijske membrane zrelog osteoartritisa (OA) koljena u trenutku aloartroplastike, *in vitro* analizirati utjecaj 7-ketokolesterola (7-KC) na njihovu polarizaciju (M1/M2) i istražiti apoptotički potencijal granulizina (GNLY) u limfocitima periferne krvi ranog OA koljena. **Materijali i metode:** Fenotip makrofaga je analiziran u parafinskim rezovima imunohistologijom i imunofluorescencijom ili u suspenziji mononukleara protočnom citometrijom. GNLY je analiziran imunocitokemijom, protočnom citometrijom i konfokalnom mikroskopijom u suspenziji limfocita. Učinjen je 18 satni test citotoksičnosti pročišćenih stanica NK prema ciljevima K-562. **Rezultati:** CD68⁺ makrofagi, rijetko su izražavali Hsp70 (od engl. Heat Shock Protein 70) i Apaf-1 (od engl. Apoptotic protease activating factor 1), a učestalo NF- κ B (od engl. Nuclear Factor kappa B), što označava prevlast aktivacije nad oštećenjem/apoptozom. *In vitro* su se Hsp70 i 7-KC vezali za TLR4 (od engl. Toll- like receptor 4), a makrofagi su izražavali CD14 te CD91, TLR4, CD206 i CD209 za prepoznavanje liganada, internalizirali dekstran i izražavali HLA-DR, CD80 i CD86. M1 iNOS⁺ (od engl. Inducible Nitric Oxide Synthase) CD68⁺ makrofagi nalazili su se u nakupinama CD3⁺ i CD56⁺ limfocita u stromi, a M2 arginaza-1+CD68⁺ makrofagi na površini sinovijskih izdanaka. U suspenziji udio iNOS⁺ i arginaza-1+ CD68⁺ makrofaga je bio podjednak, a makrofagi su izražavali statistički značajno više CC liganda (CCL)2 nego CCL3 i CCL22 nego CCL17. 7-KC (10 μ g/mL) podržavao je program M1, usprkos citotoksičnosti od 40% tijekom 18 sati, jer se povećao izražaj CD86, CC receptora (CCR)7, CCL2 i CCL3, a smanjio izražaj CD91, CD206, CCR5, mamilice D6, IL-17 i CCL17, kao po stimulaciji s lipopolisaharidom (LPS) u usporedbi s kontrolom. 7-KC i LPS su povećavali omjer iNOS⁺/arginaze-1+ u CD68⁺ makrofagima. Makrofagi su izražavali LXR (od engl. Liver X Receptor) i 4-hidroksinonenal. Postotak ukupnih GNLY⁺ limfocita periferne krvi je iznosio 7.5% (2.8-9%) u skupini s ranim OA-om, uključujući stanice NK, limfocite T i NKT i bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolu, ali se raspodjela unutar LAMP-1+ vezikula nije značajno razlikovala, kao ni rana apoptoza NK ciljeva K-562 između skupina. Blokada GNLY i perforina je statistički značajno smanjila ranu apoptozu NK ciljeva K-562 u skupini s ranim OA-om bez učinka u kontroli. **Zaključak:** CD68⁺ makrofagi sinovijske membrane zrelog OA su heterogena skupina stanica M1 i M2, a 7-KC promiče M1 program *in vitro* i podudara se s uključivanjem GNLY i prevlasti upale u patogenezi OA.

Ključne riječi: Granulizin; Limfociti; Makrofagi; Osteoartritis koljena; Polarizacija; Sinovija.

SUMMARY

Objectives: This study aimed to investigate the properties of CD68⁺ macrophages in the synovial membrane of patients with mature knee osteoarthritis (OA) at the time of alloarthroplasty, to analyze the *in vitro* influence of 7-ketocholesterol (7-KC) on their polarization (M1/M2), and to investigate the apoptotic potential of granulysin (GNLY) in the peripheral blood lymphocytes of patients with early knee OA. **Materials and Methods:** Macrophage phenotypes were analyzed in paraffin sections using immunohistochemistry and immunofluorescence or in mononuclear suspensions using flow cytometry. GNLY expression was analyzed by immunocytochemistry, flow cytometry, and confocal microscopy in lymphocyte suspensions. An 18-hour cytotoxicity test of purified NK cells against K-562 targets was performed. **Results:** CD68⁺ macrophages rarely express Hsp70 (Heat Shock Protein 70) and Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), but frequently NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), indicating the predominance of activation over damage/apoptosis. *In vitro*, Hsp70 and 7-KC were bound to TLR4 (Toll-like receptor 4), and macrophages expressed CD14, CD91, TLR4, CD206, and CD209 for ligand recognition, internalization of dextran, and expression of HLA-DR, CD80, and CD86. M1 iNOS⁺ (Inducible Nitric Oxide synthase) CD68⁺ macrophages are located in clusters of CD3⁺ and CD56⁺ lymphocytes in the stroma, and M2 arginase-1⁺CD68⁺ on the surface of the synovial shoots. The proportions of iNOS⁺ and arginase-1⁺ CD68⁺ macrophages in the suspension were equivalent. Macrophages expressed significantly more CC ligand (CCL)2 than CCL3 as well as significantly more CCL22 than CCL17. 7-KC (10 μ g/mL) supported the M1 maturation program, despite 40% cytotoxicity after 18 hours, as it increased the expression of CD86, CC receptor (CCR)7, CCL2, and CCL3, and decreased the expression of CD91, CD206, CCR5, D6, IL-17, and CCL17, as when stimulated with lipopolysaccharide (LPS) compared to control. 7-KC and LPS increase the iNOS⁺/arginase-1⁺ ratio in CD68⁺ macrophages. Macrophages express liver X receptors and 4-hydroxynonenal. The percentage of total peripheral blood GNLY⁺ lymphocytes was 7.5% (2.8–9%) in the group with early OA, including NK cells, T lymphocytes, and NKT, which was statistically significantly higher than that of the control. However, the distribution within LAMP-1⁺ vesicles was not significantly different, nor was the early apoptosis of NK targets K-562 between the groups. Blockade of GNLY and perforin significantly reduced early apoptosis of the NK target K-562 in the group with early OA, and this effect was absent in the control group. **Conclusion:** CD68⁺ macrophages in the synovial membrane of mature OA are a heterogeneous group of M1 and M2 cells, and 7-KC promotes the M1 program *in vitro*. These findings are consistent with the involvement of GNLY and the predominance of inflammation in OA pathogenesis.

Keywords: Granulysin; Lymphocytes; Macrophages; Osteoarthritis, Knee; Polarization; Synovium.

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Osteoartritis	2
1.1.1. Čimbenici rizika	3
1.1.1.1. Traumatska ozljeda.....	3
1.1.1.2. Dob	4
1.1.1.3. Spol.....	4
1.1.1.4. Genetika	4
1.1.1.5. Društveni i ekonomski čimbenici rizika.....	5
1.1.1.6. Metabolički sindrom	5
1.1.1.7. Pretilost.....	6
1.1.1.8. Dislipidemija	6
1.1.1.9. Poremećaj metabolizma glukoze.....	9
1.1.1.10. Hipertenzija	10
1.1.1.11. Pušenje.....	11
1.1.2. Patogeneza OA-a	11
1.1.3. Obilježja imunoloških procesa u OA.....	14
1.1.3.1. Pokretanje imunološke reakcije antigen predočnim stanicama.....	14
1.1.3.2. Signalni putevi u patogenezi OA-a	15
1.1.4. TLR4.....	17
1.2. Obilježja sinovijskih makrofaga	20
1.2.1. Porijeklo sinovijskih makrofaga.....	20
1.2.2. Funkcije makrofaga.....	21
1.2.3. Polarizacija makrofaga	26
1.2.4. M1 makrofagi.....	28
1.2.4.1. iNOS.....	28
1.2.6. M2 makrofagi.....	28
1.2.6.1. M2a makrofagi	29
1.2.6.2. M2b makrofagi.....	29
1.2.6.3. M2c makrofagi	29
1.2.6.4. M2d makrofagi.....	29
1.2.6.5. Arginaza-1	30
1.2.7. Makrofagi u sinovijskoj membrani bolesnika s OA-om	30
1.3. Stvaranje i utjecaj 7-ketokolesterola na stanični metabolizam.....	32
1.3.1. Utjecaj 7-KC-a na polarizaciju makrofaga.....	34
1.4. 4-HNE.....	36

1.4.1. Uloga 4-HNE-a u patogenezi OA-a	37
2. CILJEVI.....	39
2.1. Hipoteza.....	40
2.2. Ciljevi.....	40
3. MATERIJALI I METODE	41
3.1. Bolesnici i etički aspekt istraživanja.....	42
3.2. Određivanje parametara u kliničkom laboratoriju	43
3.2.1. Uzorkovanje venske krvi u bolesnika s ranim OA-om koljena i sinovijskog tkiva u bolesnika sa zrelim OA-om koljena	43
3.2.2. Određivanje rutinskih biokemijskih i hematoloških analiza u bolesnika s ranim OA-om koljena	44
3.2.3. Određivanje koncentracije GNLY-a u serumu bolesnika s ranim OA-om koljena	44
3.3. Metode obilježavanja tkivnih rezova uklopljenih u parafin	44
3.3.1. Postupak uklapanja tkiva sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om u parafin	44
3.3.2. Priprema parafinskih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena za obilježavanje.....	45
3.3.3. Indirektna jednostruka imunohistokemija	46
3.3.4. Dvostruka imunofluorescencija parafinskih rezova	48
3.3.5. Analiza imunohistokemijskih i imunofluorescentnih obilježavanja	51
3.4. Izdvajanje stanica iz tkiva	52
3.4.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena	52
3.4.3. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz sinovijske membrane enzimatskom razgradnjom.....	53
3.4.4. Kultiviranje izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane <i>in vitro</i> uz procjenu vijabilnosti	54
3.5. Imunofenotipizacija uz očitavanje protočnim citometrom.....	54
3.5.1. Istovremeno obilježavanje dvaju površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	55
3.5.2. Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	58
3.5.3. Trostruko obilježavanje imunofluorescencijom limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.....	63
3.6. Imunocitokemijsko obilježavanje	66
3.6.1. Svjetlosna mikroskopija imunocitokemijski obilježenih limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.....	66

3.6.2. Konfokalna mikroskopija imunocitokemijski obilježenih limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.....	66
3.7. Funkcijski testovi.....	67
3.7.1. Test vezanja 7-KC-a i Hsp70 za TLR4 na CD68+ stanicama sinovijske membrane	67
3.7.2. Pinoendocitoza FITC-dekstrana	68
3.7.3. Test citotoksičnosti stanica NK	69
3.8. Uređaji i sitna laboratorijska oprema	69
3.9. Statistička obrada podataka.....	70
4. REZULTATI	71
4.1. Izražaj, raspodjela, fenotip, polarizacija i elementi oksidacijskog stresa u CD68+ stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena	72
4.1.1. Izražaj i raspodjela CD68 ⁺ stanica i limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	72
4.1.2. Kontrole irelevantne specifičnosti korištene kao negativne kontrole kod dokazivanja biljega od interesa u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena metodom dvostruke imunofluorescencije	73
4.1.3. Izražaj i raspodjela CD3 ⁺ i CD56 ⁺ limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	75
4.1.4. Tkivni međudnos CD68 ⁺ stanica s CD3 ⁺ i CD56 ⁺ limfocitima u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	76
4.1.5. Izražaj receptora za prepoznavanje uzoraka, kostimulacijskih receptora, CD14 molekule i Hsp70 na CD68 ⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	77
4.1.6. Izražaj citotoksičnog receptora CD16 i citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina na/ u CD68 ⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	82
4.1.7. Izražaj kemokina u CD68 ⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	83
4.1.8. Izražaj arginaze-1 i iNOS biljega u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena	86
4.1.9. Izražaj APAF-1 i NF-κB biljega u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena	89
4.1.10. Izražaj LXR receptora u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena	91
4.1.11. Izražaj 4-HNE u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	93
4.2. Utjecaj 7-KC-a na smrtnost, fenotip i funkciju CD68+ stanica u suspenziji sinovijskih mononuklearnih stanica zrelog OA-a koljena.....	95
4.2.1. Utjecaj 7-KC-a na smrtnost CD68 ⁺ stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.....	95

4.2.2. Utjecaj 7-KC-a na izražaj TLR4 na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	96
4.2.3. Utjecaj LPS-a na FITC-dekstran pinoendocitozu svježe izdvojenih CD68+ stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	97
4.2.4. Usporedba 7-KC-a i LPS-a na izražaj receptora za prepoznavanje obrazaca na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	98
4.2.5. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora za kemokine na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	99
4.2.6. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora mamilica na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	100
4.2.7. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora HLA-DR i kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	100
4.2.8. Utjecaj 7-KC-a na izražaj arginaze-1 i iNOS biljega u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	101
4.2.9. Utjecaj 7-KC-a na izražaj proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	103
4.2.10. Utjecaj 7-KC-a na izražaj protuupalnih kemokina CCL22 i CCL17 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	104
4.2.11. Utjecaj 7-KC-a na izražaj IFN- γ , IL-17 i IL-15 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	105
4.3. Vezanje Hsp70 za TLR4 na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena	106
4.4. Izražaj GNLY-a i GNLY-om posredovana apoptoza u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena u odnosu na zdravu kontrolu	107
4.4.1. Izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena i zdrave kontrole	107
4.4.2. Citotoksični potencijal GNLY+ izvršnih stanica	111
4.4.3. Raspodjela GNLY-a i unutarstanični izražaj citokina u subpopulacijama limfocita periferne krvi	114
5. RASPRAVA	117
6. ZAKLJUČCI	133
7. LITERATURA	138
ILUSTRACIJE	169
Popis slika	169
Popis tablica	172
Popis pokrata	173
ŽIVOTOPIS	178

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Osteoartritis

Osteoartritis (OA) je skupina bolesti koja započinje oštećenjem hrskavice i okolne kosti i širi se na sinovijску membranu i okolne strukture uz obilježja upale i hiperplazije sinovijske membrane, erozije zgloбne hrskavice i oštećenja zgloбnih tetiva i ligamenata [1] te bol, oticanje i ukočenost zahvaćenog zgloба [2,3]. Patofiziološki proces u OA-u je kronične prirode s postupnim progresivnim razvojem kliničkih i radioloških znakova, najčešće uzrokovan s više čimbenika [4].

Povijesno, razvoj OA-a opisuje se kao posljedica degenerativnih promjena zglobova uzrokovanih procesom starenja i/ili mehaničkog oštećenja [5]. Današnje spoznaje, definiraju OA kao posljedicu interakcije mehaničkog oštećenja zgloбnih struktura (posljedica traumatske ozljede, opterećenje kao posljedica debljine) i metaboličkih čimbenika (metabolički sindrom, dislipidemija, pretilost i s pretilošću povezana upala niskog stupnja, hiperuricemija) koji se isprepliću u svojim patogenetskim putevima [3,6].

Prema uzroku nastanka, OA se dijeli na primarni i sekundarni OA [7,8]. Primarni ili idiopatski OA karakterizira oštećenje zgloбnih struktura nepoznatog uzroka nastajanja koji se obzirom na broj skupina zahvaćenih zglobova dijeli na lokalizirani i generalizirani [4]. Sekundarni OA javlja se kao posljedica intraartikularnih traumatskih prijeloma ili oštećenja zgloбnih struktura koje mogu biti izazvane operativnim zahvatima, kongenitalnim ili razvojnim anomalijama i infekcijama ili slabostima mekog tkiva. Prevalencija i rizik razvoja sekundarnog OA-a veći su u sklopu neinfektivnih upalnih reumatskih bolesti, gihta, Wilsonove bolesti te kod neuropatskih [9], hematoloških i endokrinoloških bolesti (pretilost [10,11], poremećaj metabolizma glukoze [12] i metabolizma masti [13]).

OA je jedan od vodećih uzroka invaliditeta u svijetu [2,6]. Prema podacima epidemiološke studije o globalnom teretu bolesti (GBD, od eng. Global Burden of Disease) u 2020. godini više od 7,6% svjetske populacije bolovalo je od OA-a [14]. U 2020. godini registrirano je blizu 600 milijuna oboljelih od OA-a diljem svijeta [15]. Prevalencija bolesti prema dobnim skupinama pokazala je da u populaciji između 30 i 60 godina ona iznosi oko 18% [15]. U skupini starijih od 60 godina 12%, odnosno više od 240 milijuna ljudi u svijetu, boluje od OA-a [16]. Kod osoba starijih od 70 godina, OA zauzima 7. mjesto na ljestvici najčešćih uzročnika invaliditeta u svijetu, od kojih je najčešći OA koljena [14]. Godišnja incidencija liječničkih konzultacija zbog simptomatskog OA koljena procjenjuje se na 0,5% oboljelih starijih od 55 godina i raste do 1% u bolesnika starijih od 70 godina [17]. Visoka stopa oboljelih predstavlja značajno financijsko opterećenje za bolesnike, nacionalna zdravstvena osiguranja i osiguravajuće tvrtke

uz procjenu da na izravne i neizravne troškove povezane s OA-om godišnje otpada od 0,25 do 0,5% bruto nacionalnog dohotka [18]. Posljednjih desetljeća OA, kao degenerativna bolest zglobova, najčešći je uzrok invaliditeta u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju [19,20].

OA se može pojaviti u bilo kojem zglobu, no češći je u zglobovima prstiju, kuka, koljena, vratne i lumbalne kralježnice te u prvom metatarzofalangealnom zglobu [21]. Najčešći oblik bolesti je OA koljena s 365 milijuna registriranih bolesnika [22]. Kliničke karakteristike OA-a koljena uključuju bol, ukočenost u prvom pokretu nakon odmora i smanjen opseg pokreta zgloba [23–26]. Sukladno lokalizaciji i prirodnom tijeku bolesti, OA kuka, a osobito koljena, pokazuju najnepovoljnije učinke na funkcionalni status [27]. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, ograničenje u kretanju ima oko 80% bolesnika s OA-om koljena, 25% nije u mogućnosti obavljati svakodnevne aktivnosti, a u osobnoj njezi njih 11% treba pomoć [28]. Podaci studija iz Bristola [19] i Nottinghama [20] pokazuju da oko 15% opće populacije u dobi od 55 i više godina ima ograničene dnevne aktivnosti zbog boli u koljenu tijekom jednog mjeseca, odnosno godine dana. Štoviše, postoji korelacija između intenziteta boli i funkcionalnih ograničenja s težinom radiografskih promjena [29], koje dodatno pridonose narušenoj kvaliteti sna, osjećaju umora i promjenama psihičkog stanja bolesnika, koje često vode depresiji [30]. OA se pojavljuje s drugim bolestima i stanjima povezanim s poodmaklom životnom dobi u približno 90% bolesnika [31]. Obično su to kardiovaskularne bolesti, uključujući hipertenziju i ishemijsku bolest srca [31,32]. Bolest narušava kvalitetu života, definiranu kao kompleksan, sintetski doživljaj životnog zadovoljstva koji se javlja u stalnoj evaluaciji i reevaluaciji života i iskustava bolesnika u različitim područjima, kao što su rad, društvene aktivnosti, međuljudski odnosi, emocionalne veze [33].

1.1.1. Čimbenici rizika

U čimbenike rizika OA-a ubrajaju se: traumatska ozljeda, spol, pretilost, genetika i metabolički sindrom [2,3,7,34]. Obzirom na kompleksnost bolesti i nepotpuno razjašnjen patogenetski mehanizam razvoja, važno je napomenuti da međusobni učinci više rizičnih čimbenika doprinose i povećavaju rizik za razvoj OA-a, naročito u starijoj populaciji [2,3].

1.1.1.1. Traumatska ozljeda

Traumatske ozljede i/ili oštećenja zglobnih struktura kao rezultat fraktura ili operacijskih zahvata povećavaju rizik za razvoj OA-a [35]. Najveći rizik povezuje se s rupturom prednjeg križnog ligamenta i ozljedom meniskusa koljena [3,36]. Kao posljedica dolazi do razvoja

poremećaja homeostaze tkiva zglobne hrskavice, odnosno ubrzane nekroze i apoptoze stanica uz gubitak učinkovitog uklanjanja oštećenih stanica [3] i time osnovne funkcije tkiva [36].

1.1.1.2. Dob

Degenerativne promjene zglobova kao i prisutnost većeg broja čimbenika rizika svojstveni su za osobe starije životne dobi [16]. Zbog toga se starija životna dob navodi kao primarni nepovratni čimbenik rizika za razvoj OA-a [37]. Prevalencija broja oboljelih raste s godinama starosti, međutim najveći broj oboljelih (8-23%) čine osobe srednje životne dobi (50-60 godina) u odnosu na mlađu (19-50 godina) i stariju skupinu stanovništva (≥ 60 godina) gdje prevalencija iznosi 3-9% odnosno 9-15% [2]. Važno je naglasiti da se procesom starenja, sve stanice u tijelu pa tako i stanice zglobnih struktura, nalaze pod štetnim utjecajem velikog broja stresora koji dovode do pojačane unutarstanične sinteze reaktivnih vrsta kisika (ROS, od eng. Reactive Oxygen Species). Posljedica djelovanja ROS-a je oštećenje staničnih struktura i organela (deoksiribonukleinske kiseline (DNA, od eng. Deoxyribonucleic Acid), mitohondrija) uz narušavanje stanične homeostaze što povećava rizik za razvoj OA-a [3,37].

1.1.1.3. Spol

Globalna prevalencija OA-a dva puta veća je kod žena u odnosu na muškarce [8,34,38]. Ta razlika najizraženija je u populaciji od 50-80 godina starosti, dok kod mlađih od 50 i starijih od 80 godina podjednaki je broj muškaraca i žena oboljelih od OA-a [2,39]. Razlog zašto žene nakon 50 godina imaju veći rizik i češće razvijaju OA nije u potpunosti razjašnjen. Naglasak i općenito objašnjenje su multifunkcionalni učinci, uključujući uloge žena u obitelji i društvu [40]. Međutim, kao potencijalno visokorizični čimbenici razvoja OA-a kod žena navode se hormonalne promjene (menstrualni ciklus, menopauza) [41] tj. smanjenje koncentracije estrogena (pad njegove zaštitne uloge u razvoju upale) [42], progesterona [43] i veća prevalencija debljine [39,41].

1.1.1.4. Genetika

Mutacije gena, odnosno genetske varijante povezane s predispozicijom kao i samostalnim visoko rizičnim čimbenikom, podupiru definiciju OA-a kao poligenске bolesti. Najveći broj analiziranih genetskih varijanti povezanih s razvojem OA-a kodira sintezu proteina koji sudjeluju u održavanju homeostaze zglobnih struktura (proteini staničnog citoskeleta, izvanstanične i stanične signalne molekule, stanični enzimi) [44] odnosno procesa fiziološkog

razvoja zglobova [45]. Dosadašnja istraživanja nisu potvrdila postojanje mutacija i/ili genetskih varijanti koje bi se povezale s predispozicijom razvoja degenerativnih promjena i razaranjem zglobne hrskavice [45]. Definiranje genetskih varijanti karakterističnih za OA najveće značenje ima u razjašnjenju patogenetskog mehanizma bolesti, utjecaju prirođenih deformiteta zglobova na razvoj OA-a kao i na ranu prevenciju te razvoj ciljane terapije [46].

1.1.1.5. Društveni i ekonomski čimbenici rizika

Prema socioekonomskim studijama, niži stupanj obrazovanja, zanimanja koja uključuju teži fizički napor, niža primanja i niži životni standard, ženski spol i život u domaćinstvima s većim brojem članova, čimbenici su rizika za razvoj OA-a [47]. Teži oblici OA-a koljena, prema longitudinalnom istraživanju provedenoj na populaciji okruga Johnston (Sjeverna Karolina, SAD), zabilježeni su kod osoba nižeg stupnja obrazovanja [48]. Također, rezultati retrospektivne studije koja je provedena u Kataloniji na populaciji većoj od 5 milijuna stanovnika, pokazali su veću incidenciju OA-a koljena među osobama nižeg socijalno imovinskog statusa, nezaposlenima i fizičkim radnicima te kod stanovnika ruralnih područja [49].

1.1.1.6. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom definiran je kao zajednički naziv za skup poremećaja koji uključuju debljinu (indeks tjelesne mase $>30 \text{ kg/m}^2$), opseg struka (muškarci $\geq 94 \text{ cm}$, žene $\geq 80 \text{ cm}$), dislipidemiju (povišena koncentracija triglicerida $>1,7 \text{ mmol/L}$, snižena koncentracija lipoproteina visoke gustoće ili HDL-a (od eng. High-Density Lipoprotein): muškarci $<1,03 \text{ mmol/L}$, žene $<1,29 \text{ mmol/L}$), poremećaj metabolizma glukoze (povećana koncentracija glukoze natašte $>5,6 \text{ mmol/L}$, rezisencija na inzulin ili šećerna bolest tipa 2), i hipertenziju (krvni tlak $\geq 130/85 \text{ mmHg}$) [50]. Primarno se povezuje s visokim rizikom za razvoj srčanog i/ili moždanog udara i šećerne bolesti tipa 2 [51].

Metabolički sindrom je i visokorizični čimbenik za razvoj i progresiju OA-a mehaničkim (povećano opterećenje na zglobove kao posljedica debljine) i metaboličkim utjecajem (upala niskog stupnja, sinteza ROS-a i oksidacijskih produkata kolesterola) [52]. Kod osoba s razvijenim metaboličkim sindromom, neovisno o dobi i spolu, rizik za OA je dva do tri puta veći u odnosu na zdrave osobe [53]. Metabolički OA opisuje se kao zasebni fenotip OA-a na temelju povezanosti metaboličkog sindroma i povećanog rizika za razvoj odnosno direktnog utjecaja na patogenezu i progresiju OA-a [11]. Prema rezultatima Fasa studije kojom je ispitivan

utjecaj svakog pojedinačnog poremećaja u sklopu metaboličkog sindroma na razvoj OA-a, porast u svakom, kao i ukupnom broju pojedinačnih poremećaja kod svake osobe značajno povećava rizik za razvoj OA-a. U osoba kod kojih su zadovoljeni kriteriji za sve poremećaje u sklopu metaboličkog sindroma, 31 puta je veći rizik za razvoj OA-a u odnosu na osobe bez dijagnoze metaboličkog sindroma [54]. Usporedbom prevalencije metaboličkog sindroma između OA-a i reumatoidnog artritisa (RA) koja je provedena presječnom multicentričnom studijom u reumatološkim centrima u Republici Hrvatskoj, dobiveno je da je ona 1,6 puta viša u bolesnika s OA-om u odnosu na bolesnike s RA-om [55]. Također, studija je pokazala veće vrijednosti opsega struka, krvnog tlaka, koncentracije triglicerida i glukoze natašte u bolesnika s OA-om što je u skladu s rezultatima epidemioloških studija o konceptu metaboličkog OA-a kao kliničkog fenotipa OA-a povezanog s pretilošću, dislipidemijom, šećernom bolesti tipa 2 i hipertenzijom.

1.1.1.7. Pretilost

Indeks tjelesne mase (BMI, od eng. Body Mass Index) veći od 30 kg/m² prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji definira se kao pretilost koja zbog mnogobrojnih negativnih učinaka predstavlja visoko rizični čimbenik za OA i predmet je mnogih suvremenih istraživanja [56–58]. Tjelesna masa povećava mehaničko opterećenje koljena više nego kukova i navodi se kao predskazatelj napredovanja OA-a koljena [59]. Odnos između BMI-a i OA-a koljena je proporcionalan, a trajanje povećanog opterećenja zgloba ili dobivanja na težini doprinosi invaliditetu [59]. Prema podacima u studiji Grazio i sur. [59], 69% zamjene koljenskog zgloba protezom može se pripisati pretilosti.

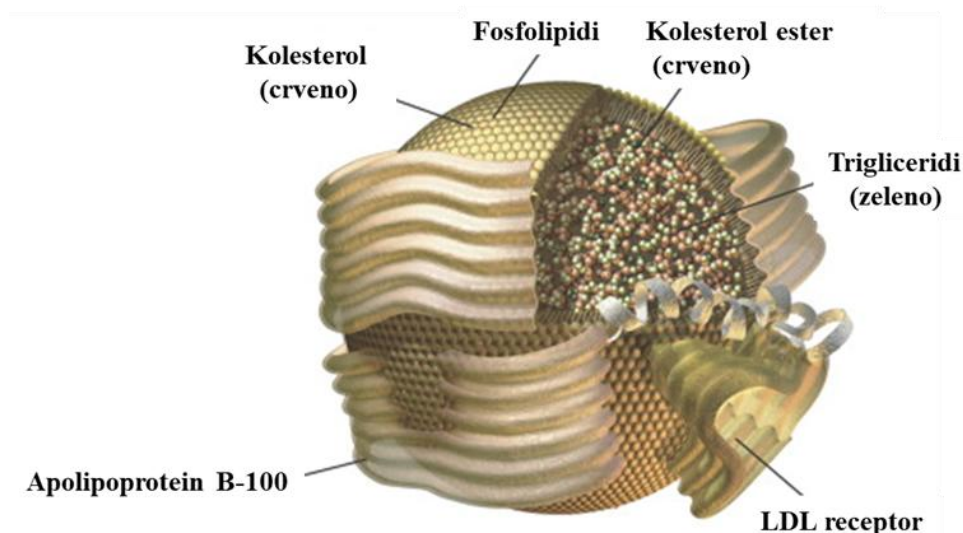
Poput OA-a, pretilost predstavlja upalu niskog stupnja koja dodatno potiče metaboličke i upalne promjene zglobnih struktura [3,8,60,61]. Adipociti, stanice masnog tkiva, sintetiziraju brojne proupalne citokine- adipokine (leptin, visfatin), čimbenik nekroze tumora- alfa (TNF- α , od eng. Tumor Necrosis Factor- alpha), interleukin (IL)-1 i IL-6 [52,62]. Njihovo pojačano lučenje povezuje se s traumom uslijed povećanog mehaničkog opterećenja zglobova uz posljedično produbljivanje upalnih promjena u zglobnim strukturama i povećanje rizika za OA [52,63].

1.1.1.8. Dislipidemija

Povećana koncentracija kolesterola (hiperkolesterolemija), lipoproteina niske gustoće ili LDL-a (od eng. Low-Density Lipoprotein), triglicerida (hipertrigliceridemija) i slobodnih masnih kiselina te snižena koncentracija HDL-a obilježja su dislipidemije [64]. Poremećaj homeostaze

kolesterola u hondrocitima, odnosno njegovo povećano nakupljanje, svojstveni su za OA [65], a javlja se kao rezultat njegovog pojačanog unosa i smanjenog izlučivanja [66]. Smanjeno izlučivanje povezuje se sa sniženim izražajem staničnih receptora koji sudjeluju u prijenosu signala za prijem genova ključnih u održavanju homeostaze metabolizma kolesterola [52]. Istraživanja OA-a na mišjim modelima pokazala su smanjeni izražaj jetrenog X receptora (LXR, od eng. Liver X Receptor), receptora aktiviranog proliferatorom peroksisoma (PPAR, od eng. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) i orphan receptora alfa povezanog s retinoičnom kiselinom (RoR α , od eng. Retinoic Acid-Related Orphan Receptor alpha) koji je u pozitivnom međudodnosu s izražajem gena za nadziranje prijenosa kolesterola (apoA1, abca1) iz stanice [52,64]. Posljedično, u OA-u dolazi do smanjenog izlaska ili otpuštanja kolesterola iz stanica hondrocita zbog čega u njima nastaju negativne metaboličke promjene koje uključuju pojačano stvaranje proupalnih citokina, razgradnju zglobne hrskavice i zadebljanje subhondralne kosti [52]. Od proupalnih citokina najizraženije je pojačano izlučivanje IL-1 β , IL-6 i TNF- α [12]. Oni svoj učinak ostvaruju povećanjem stvaranja proteolitičkih enzima matriks metaloproteinaze (MMP, od eng. Matrix Metalloproteinase)-1 MMP-3 i MMP-13, dezintegrina i metaloproteinaze s motivima trombospondina (ADAMTS, od eng. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs)-4, ADAMTS-5, inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS, od eng. Inducible Nitric Oxide Synthase), oštećenjem DNA i posljedično apoptozom stanica te smanjenim stvaranjem IL-10, tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP (od eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases)-1 i TIMP-3) te kolagena i proteoglikana [67,68].

Posljedica pojačanog taloženja kolesterola u fiziološki avaskularnoj hrskavici i drugim zglobnim tkivima je smanjenje opskrbe kisikom i hranjivim tvarima nužnim za normalan stanični metabolizam, što je dodatan rizik za razvoj, ali i za pogoršanje tijeka OA-a [52]. LDL je glavna čestica za prijenos kolesterola u periferna tkiva [69]. Građena je od proteina (20%), fosfolipida (20%), triglicerida (5%), ne-esterificiranog kolesterola (10%) i esterificiranog kolesterola koji je s 40% udjela najzastupljenija građevna molekula LDL-a [70]. Jedna molekula apolipoproteina B-100 (apoB-100) obavlja molekule masti, čini ih topljivim u vodi (hidrofilnim) i omogućuje vezanje LDL-a na receptore za LDL (LDL-R, od eng. Low-Density Lipoprotein Receptor) izražene na endotelnim stanicama, stanicama glatkih mišića, makrofagima i trombocitima [71] te ulazak u stanice procesom endocitoze [70] kako je prikazano na Slici 1.



Slika 1. Građa LDL molekule. Preuzeto i prilagođeno prema [72].

U uvjetima oksidacijskog stresa, djelovanjem ROS-a dolazi do oksidacije LDL-a [73]. Proizvod oksidacije LDL-a je oksidirani LDL ili oxLDL (od eng. Oxidized LDL) [6], koji se veže na oksidirani LDL receptor-1 sličan lektinu (LOX-1, od eng. Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1) na površini tkivnih makrofaga i potiče njihovu polarizaciju u proupalni M1 tip [74].

M1 makrofagi lučenjem proupanih medijatora potiču razvoj upale niskog stupnja svojstvene za OA [75]. Istraživanja patogeneze OA-a na mišjim modelima pokazala su povećanu koncentraciju oxLDL-a u sinovijskoj tekućini i povećan izražaj LOX-1 na stanicama sinovijske membrane i hondrocitima što uzrokuje pojačano unutarstanično stvaranje ROS-a, MMP-3 i proupalnih citokina (IL-6, IL-8, CC-ligand (CCL, od eng. C-C Motif Chemokine Ligand) 2 te faktora rasta kao što je transformirajući faktora rasta beta (TGF- β , od eng. Transforming Growth Factor- beta) [76]. Njihov učinak pospješuje upalni proces i apoptozu hondrocita [76] te razaranje zglobne hrskavice i rast ektopične kosti [77,78]. U istraživanju koje su proveli Seo i sur. [79], ispitivan je utjecaj 25-hidroksikolesterola, oksisterola koji nastaje enzimatskom razgradnjom kolesterola, na apoptozu hondrocita kod štakora kao mogući patofiziološki posrednik između metaboličkog sindroma i razvoja OA-a. Dobiveni rezultati su pokazali da 25-hidroksikolesterol dovodi do povećanja apoptoze hondrocita i smanjenja njihove vijabilnosti, ali također i do gubitka proteoglikana zglobne hrskavice što ukazuje na blisku povezanost metabolizma kolesterola i metaboličkog sindroma s razvojem i progresijom OA-a [79].

Proces razgradnje triglicerida glavni je izvor energije potrebne za održavanje homeostaze stanica u kojem kao proizvodi nastaju glicerol i slobodne masne kiseline [80]. Zasićene masne kiseline mehanizmom pokretanja proupalnih signalnih puteva, koji su usmjereni ponajprije na poticanje učinkovitosti transkripcijskog čimbenika nuklearnog čimbenika kapa B (NF- κ B, od

eng. Nuclear Factor kappa B) i autofagije hondrocita utječu na oštećenje hrskavice zgloba i napredovanje OA-a [52,81]. Polinezasićene masne kiseline imaju dvojak učinak [82]. Omega-6 i omega-3 masne kiseline imaju međusobno suprotan učinak djelovanja na razvoj i progresiju OA-a [68]. Omega-6 stimuliraju lučenje proupalnih citokina (IL-6) i aktiviraju apoptozu hondrocita što doprinosi oštećenju tkiva i progresiji bolesti, dok omega-3 usporavaju napredovanje bolesti [52,81]. Povišen odnos omega-6 : omega-3 masnih kiselina u serumu bolesnika s OA-om koljena povezan je s izraženijom upalom i smanjenom pokretljivošću zglobova u odnosu na bolesnike kod kojih je taj odnos niži [83].

Kao posljedica upale, sinovijska membrana u upalnim bolestima zglobova postaje propusnija za vodu i makromolekule plazme, čijom se ultrafiltracijom proizvodi sinovijska tekućina, ali i za molekule koje su proizvodi metaboličkih i kataboličkih procesa stanica zglobnih struktura [84]. U OA-u kao posljedica veće poroznosti sinovijske membrane dolazi do povećanja koncentracije lipoproteina i oksisterola u sinovijskoj tekućini [11]. Također, povećana koncentracija oxLDL-a u sinovijskoj tekućini zgloba s OA-om javlja se i zbog njegove povećane koncentracije u serumu [85]. Važno je napomenuti i njegovo stvaranje djelovanjem ROS-a koji se kao proizvodi pojačanog stvaranja u stanicama zglobnog tkiva oslobađaju u sinovijsku tekućinu gdje uzrokuju oksidaciju plazmatskih molekula LDL-a [86]. Snižene koncentracije HDL-a i njegove glavne proteinske molekule apoA1 u sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om u usporedbi sa zdravim osobama povezuju se s većim stupnjem oštećenja zgloba, težim simptomima primarnog OA-a koljena te pokazuju izvrsnu dijagnostičku vrijednost u postavljanju dijagnoze uznapredovale odnosno kasne faze bolesti [87].

1.1.1.9. Poremećaj metabolizma glukoze

Rizik za razvoj OA-a je 1,5 puta veći kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 [64]. Unos glukoze u stanice posredovan je aktivacijom glukoznih transportnih receptora ili GLUT (od eng. Glucose Transporter) čiji je izražaj nadziran izvanstaničnom koncentracijom glukoze [88]. U zglobu s OA-om, hondrociti pokazuju sniženu sposobnost nadziranja izražaja GLUT-1 ovisno o izvanstaničnoj koncentraciji glukoze, tako da je izražaj GLUT-1 trajno povećan [11]. Zbog toga hiperglikemija kod bolesnika s OA-om uzrokuje povećano odlaganje glukoze u hondrocitima, koja posljedično uzrokuje i pojačano stvaranje ROS-a te poticanje proupalnih učinaka NF- κ B [89]. Zbog navedenih svojstava ROS pridonosi razvoju i napredovanju OA-a [64,89]. Također, kao posljedica razvoja inzulinske rezistencije u sklopu šećerne bolesti tipa 2 poništava se pozitivan učinak inzulina na smanjenje sinteze upalnih posrednika u stanicama sinovijske membrane i stanicama hondrocita, odnosno povećava se rizik za razvoj OA-a

[64,81]. Istraživanja povezanosti šećerne bolesti i OA-a pokazuju značajne razlike u obilježjima sinovijske membrane i koncentracije krajnjih proizvoda glikacije (AGE, od eng. Advanced Glycation End-products) u sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om koljena i šećernom bolesti u odnosu na bolesnike s OA-om koljena, ali bez dijagnoze šećerne bolesti. Sinovijska membrana bolesnika s šećernom bolesti ima deblji sloj sinovijskih stanica s obilježjima pojačane angiogeneze i broja upalnih stanica, te izražaja MMP-13, ADAMTS-5 i NF- κ B te proupalnih biljega TNF- α i IL-6 u odnosu na bolesnike koji ne boluju od šećerne bolesti [90]. Veća koncentracija AGE-a u sinovijskoj tekućini bolesnika s šećernom bolesti također je prepoznata kao čimbenik rizika za razvoj i napredovanje OA-a [91] obzirom da AGE molekule uzrokuju razgradnju i oštećenje strukturnih proteina stanica i tkiva zglobnih struktura [92].

1.1.1.10. Hipertenzija

Arterijska hipertenzija negativno utječe na simptome i kvalitetu života bolesnika s OA-om [93], a prema podacima multicentrične studije koju su proveli Morović-Vergles i sur. [94] prevalencija hipertenzije među bolesnicima s OA-om iznosila je 73,3 % (95 % CI, 68,4-77,7%) te je bila viša kod starijih i pretilih u odnosu na bolesnike mlađe od 65 godina.

Hipertenzija potiče napredovanje OA-a putem aktivacije autonomnog živčanog sustava obzirom na njegovu ulogu u nadziranju imunološkog i kardiovaskularnog sustava [95]. Istraživanje povezanosti razvoja OA-a i hipertenzije na štakorima [96] pokazala su da povišen krvni tlak doprinosi preinačavanju struktura zgloba koje dodatno ovise i o spolu. Tako je pokazan izraženiji gubitak zglobne hrskavice i razvoj sinovitisa kod hipertenzivnih ženki štakora, dok je kod muških to bilo oštećenje i preinačavanje subhondralne kosti [96]. Patogenetski mehanizmi koji povezuju hipertenziju s povećanim rizikom za razvoj OA-a vezani su uz vaskularne promjene krvnih žila subhondralne kosti [64,81]. Kao posljedice hipertenzije, sužavanje krvnih žila i stvaranje krvnih mikrougrušaka dovode do smanjene opskrbe tkiva subhondralne kosti kisikom i hranjivim tvarima, pospješujući apoptozu osteocita i proces preinačavanja subhondralne kosti zgloba [64].

Aktivacija sustava renin-angiotenzin, endotelina i signalnog puta Wnt- β -katenina kao posljedica hipertenzije, dovodi do hipertrofije hondrocita, razvoja upale i aktivacije kataboličkih mehanizama zglobnog tkiva te na taj način oni izravno upravljaju bolešću zglobova u OA-u. Bliski odnos između hipertenzije i OA-a ukazuje na to da bi strategije usmjerene na endotel, uključujući prenamijenjene antihipertenzivne lijekove koje je odobrila Američka uprava za hranu i lijekove (FDA, od eng. Food and Drug Administration) mogle biti korisne u liječenju OA-a [93]. Na tom tragu FDA je odobrila prvu kombinaciju fiksni doza

antihipertenziva (amlodipin) i nesteroidnog protuupalnog lijeka (celekoksib) za liječenje komorbidne hipertenzije i OA-a [97]. Blokatori angiotenzinskih receptora imali su najviše nuspojava od svih skupina antihipertenzivnih lijekova u bolesnika s arterijskom hipertenzijom i OA-om što zahtjeva poseban oprez kod njihove primjene u liječenju takve skupine bolesnika [98].

U studiji Wen CY i sur. [99] dokazan je značajan gubitak koštane mase subhondralne ploče i smanjenje gustoće kostiju u medijalnom dijelu tibije kod bolesnika s OA-om koljena te hipertenzijom i šećernom bolesti. Međutim, u studiji japanske grupe autora Yang i sur. [100] nije utvrđena snažna povezanost između OA-a i hipertenzije, već da postoji veći rizik za razvoj hipertenzije samo kod muškaraca s OA-om. To bi se na temelju prijašnjih studija moglo objasniti povećanom aktivnošću androgenih receptora i koncentracije testosterona odnosno njihovog utjecaja na razvoj hipertenzije.

1.1.1.11. Pušenje

Točan mehanizam učinka pušenja na OA još uvijek nije u potpunosti razjašnjen [101], ali poznato je da nikotin utječe na izlučivanje proupalnih citokina iz hondrocita, primarno TNF- α i IL-1 što potiče djelovanje MMP-a te pospješuje razgradnju izvanstaničnog matriksa zglobne hrskavice [102]. Povezanost prevalencije OA-a s pušenjem pokazuje heterogenost rezultata u objavljenim studijama. Zaključci presječnih studija koje su u provedene na populaciji u Južnoj Koreji [103] i Danskoj [104] govore da ne postoji povezanost pušenja s razvojem OA-a, dok studija na populaciji stanovnika Rotterdama naglašava pušenje kao rizični faktor [105]. Također, presječna studija provedena na velikom broju ispitanika u SAD-u pokazala je da pušenje pozitivno korelira s razvojem OA-a te da postoji statistički značajno veći rizik i incidencija OA-a u skupinama bivših i sadašnjih pušača u odnosu na nepušače [106].

1.1.2. Patogeneza OA-a

Patogenetski razvoj i napredovanje OA-a povezan je sa složenim procesima izgradnje (anabolizam) i procesima razgradnje (katabolizam) svih građevnih struktura zglobova: zglobne hrskavice, sinovijske membrane, subhondralne kosti, mišića, tetiva i zglobnih sveza [107,108]. Hondrociti, kao jedine stanice zglobne hrskavice, imaju ulogu u sintezi sastavnica izvanstanične tvari hrskavice (kolegen, proteoglikani, hijaluronska kiselina), proupalnih citokina, proteolitičkih enzima i čimbenika rasta u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima [109]. Mehaničko opterećenje odgovarajuće jačine nužno je za aktivaciju metaboličkih procesa tkiva

hrskavice. Međutim, u slučajevima povećanog i dugotrajnog opterećenja (debljina, intenzivno bavljenje sportom/vježbanje) katabolički mehanizmi nadvladavaju anaboličke mehanizme i dolazi do smanjenja funkcionalnog i zdravog tkiva [107].

Kao posljedica gubitaka izvanstanične tvari, koštani dio zglobne hrskavice dolazi u neposredni dodir sa subhondralnom kosti što pridonosi nastajanju strukturnih promjena nevidljivih prostim okom na mjestima dodira [108]. Razvoj upalnog procesa niskog stupnja u OA-u nastaje kao posljedica metaboličkih promjena koje uključuju povećano stvaranje proteolitičkih enzima MMP-a, prije svega MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-13, koje razaraju sastavnice izvanstanične tvari hrskavice (elastin, kolagen tipa II i IV, proteoglikani) [8,110]. Kao posljedica razaranja sastavnica zglobnog tkiva i apoptoze stanica dolazi do oslobađanja molekulskih obrazaca povezanih s oštećenjem odnosno DAMP (od eng. Damage- Associated Molecular Patterns) [8]. DAMP molekule oslobođene razaranjem zglobnog tkiva (glikoproteini, proteoglikani, glikozaminoglikani) i apoptozom stanica [proteini toplinskog stresa (Hsp, od eng. Heat shock proteins), kalcij vezujući protein S-100, protein visoke pokretljivosti skupine 1 (HMGP1, od eng. High-Mobility Group box Protein 1)] [111] vežu se kao ligandi za receptore za prepoznavanje obrazaca (PRR, od eng. Pattern Recognition Receptors) koji uključuju receptore slične Toll-u (TLR, od eng. Toll-Like Receptors), receptore slične NOD-u (NLR, od eng. NOD-like Receptors) i receptore za vezanje konačnih proizvoda glikacije (RAGE, od eng. Receptor for Advanced Glycation Endproducts) na stanicama hondrocita, osteoblasta, stanicama sinovijske membrane i imunološkim stanicama. Vezanje dovodi do aktivacije transkripcijskih čimbenika, primarno NF- κ B, što uzrokuje otpuštanje proteolitičkih enzima (MMP-1, -3, -9, -13), citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6), kemokina (CCL2, -5, -7, -8), katapsina i molekula sustava komplementa [112].

Preinačavanje subhondralne kosti nastaje po mehaničkom opterećenju, ali i uslijed pojačane metaboličke aktivnosti osteoblasta i osteoklasta, stanica čija je uloga stvaranje odnosno razgradnja koštanog matriksa [8]. Tim procesima stvaraju se koštane lezije, osteofitne izrasline i ciste te se smanjuje mineralna gustoća kostiju [8,113]. Koštane lezije nastale uslijed mehaničkog opterećenja, smatraju se najznačajnijim uzrokom boli u OA-u [114]. Bol se javlja zbog nastanka erozija kosti te nekroze osteocita uz posljedično pojačanu angiogenezu i neurogenezu [107]. U fazi zrelog OA-a, subhondralne ciste nastaju kao posljedica djelovanja osteoklasta i nekroze na mjestima prethodno nastalih koštanih lezija [8,107].

Sinovijska membrana stvara sinovijsku tekućinu, te one zajedno čine sinoviju [107]. Metaboličke promjene, odnosno upala niskog stupnja sinovije (sinovitis), započinje u ranoj fazi OA-a čak i prije kliničkih znakova bolesti [115]. Prisutna je i u kasnoj fazi bolesti i u pozitivnom

je međuodnosu s jačinom boli i stupnjem napredovanja boli [111,113]. Glavna obilježja sinovitisa su hiperplazija fibroblasta, aktivacija makrofaga i posljedične fibrozne promjene unutrašnjeg sloja (intime) sinovijske membrane te infiltracija limfocita T i B, makrofaga i mastocita iz intime i/ili krvnih žila u subintimu sinovijske membrane [107,111]. IL-1, čimbenik nekroze tumora (TNF, od eng. Tumor Necrosis Factor) i IL-15, potiču proupalnu aktivnost makrofaga i limfocita sinovijske membrane [8]. Posljedica kroničnog upalnog procesa je zadebljanje sinovijske membrane u cijelosti, koja se javlja u više od 50% bolesnika sa zrelim OA-om [107]. Pojačano stvaranje i otpuštanje proteolitičkih enzima MMP-a i ADAMTS-a u sklopu sinovitisa oštećuje zglobnu hrskavicu [116].

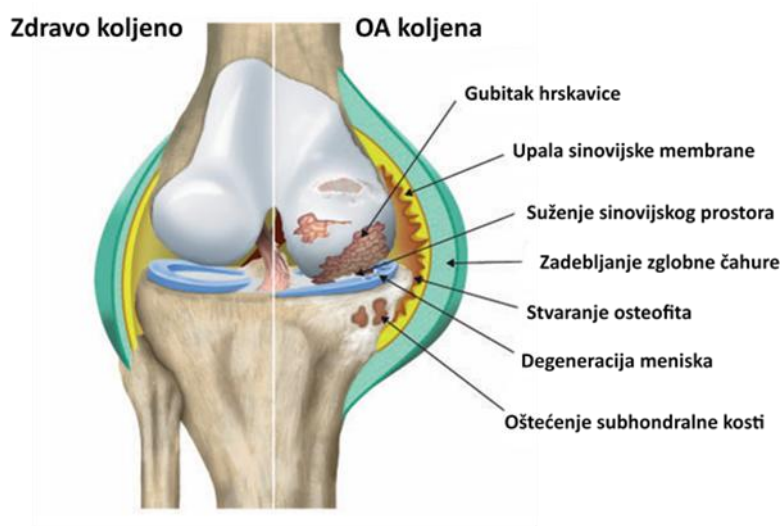
Posljednjih godina prepoznata je važnost strukture i funkcije meniskusa za razvoj OA-a i zbirno prikazana u preglednom radu Ghouri i sur. 2022. godine [117]. Ekstruzija meniska i puknuće/oštećenje meniska povezani su s uzdužnim napredovanjem gubitka hrskavice, veličinom gubitka hrskavice na poprečnom presjeku i zamjenom zgloba, neovisno o dobi, spolu i BMI-u [117]. Medijalne i lateralne pukotine tijela i stražnjeg roga meniska posebno su ubrzavale razvoj OA-a, ali ne i oštećenja prednjih rogova [117]. Međutim, nema dovoljno literaturnih podataka o patologiji meniskusa i boli te nije bilo jasne neovisne povezanosti između puknuća/oštećenja ili ekstruzije meniska s jačinom ili napredovanjem boli u koljenima nakon nezgoda [117].

TGF- β ima važnu ulogu u održavanju homeostaze hrskavice po vezivanju visokim afinitetom za endoglin u prisutnosti TGF- β receptora tipa II izraženog na hondrocitima [118]. Naime, endoglin nadzire ravnotežu između pojačavanja Smad 1/5 fosforilacije i kočenja Smad2 i Smad 3 fosforilacije potrebne za transkripcijsku aktivnost usmjerenu prema proizvodnji izvanstanične tvari u ljudskim hondrocitima [118]. Molekule izvanstaničnog matriksa se odcjepljuju metaloproteinazama te su prisutne u sinovijskoj tekućini i plazmi, a njihove koncentracije nalaze se u pozitivnom međuodnosu s težinom OA-a koljena [119]. Zbog široke rasprostranjenosti endoglina na endotelnim stanicama, TGF- β potiče angiogenezu, protu-apoptotički učinak, migraciju stanica, ali i endotelnu disfunkciju zbog dvojakog učinka u provodnji signala [120]. Time bi se mogla objasniti bar djelomična povezanost endotelne disfunkcije nastale po kardiovaskularnim čimbenicima rizika s primarnim OA-om koljena.

Osteofiti su vrlo česti kod OA-a i povezani su s boli i funkcionalnom nesposobnošću zgloba [121]. Ove patološke izrasline hrskavice i kosti obično nastaju na spoju zglobne hrskavice, periosta i sinovije iz stanica preteča sinovije i periosta [122]. Subhondralna koštana skleroza, koja se pojavljuje s napredovanjem oštećenja hrskavice, je također obilježje OA-a. Unatoč povećanju volumena kostiju, subhondralna kost je slabije mineralizirana zbog abnormalne

pregradnje kosti, pokazuje mikrooštećenja, lezije nalik edemu koštane srži i koštane ciste [123]. Međutim, do danas je relativno malo istraživanja provedeno s ciljem razjašnjavanja međudjelovanja između osteoklasta u subhondralnoj kosti i hondrocita u zglobnoj hrskavici tijekom napredovanja OA-a [124].

Zaključno, razgradnja zglobne hrskavice djelovanjem proteolitičkih enzima doprinosi začaranom krugu razvoja i održavanja upalnog procesa sinovije, meniska, subhondralne kosti, a time i OA-a [107]. Patogenetske promjene u koljenu s OA-om prikazane su na Slici 2.



Slika 2. Patogenetske promjene u koljenu s osteoartritisom (OA). Preuzeto i prilagođeno prema [125].

1.1.3. Obilježja imunoloških procesa u OA

1.1.3.1. Pokretanje imunološke reakcije antigen predočnim stanicama

Antigen predodne stanice u sinovijskom tkivu jesu dendritičke stanice i mnogo zastupljeniji makrofagi. Iako je zastupljenost dendritičkih stanica u sinovijskom tkivu u odnosu na druge stanice mala, odnosno manja od 5% [126], one imaju ključnu ulogu u imunološkim reakcijama urođene i stečene imunosti [127]. Na temelju fenotipskih i funkcionalnih obilježja dijele se na nezrele i zrele [128]. Nezrele dendritičke stanice imaju ulogu u održavanju imunološke tolerancije, dok zrele izlučivanjem proupalnih citokina sudjeluju u pokretanju imunološke reakcije [128]. Obzirom na lozu hematopoetskih stanica iz kojih nastaju sazrijevanjem, dendritičke stanice se dijele na plazmocitoidne dendritičke stanice (pDC, od eng. Plasmacytoid Dendritic Cells) i dva tipa mijeloidnih ili klasičnih dendritičkih stanica (cDC, od eng. Classical Dendritic Cells) koje se dijele na dva podtipa cDC1 i cDC2 [127]. pDC imaju primarnu ulogu u borbi protiv virusnih infekcija izlučivanjem interferona (IFN)-1, dok je glavna uloga cDC

predočavanje antigena i aktivacija stanica limfocita T i stanica prirodnih ubojica (NK, od eng. Natural Killer Cells) [129]. cDC1 potiču aktivaciju pomoćničkih limfocita T tipa 1 (Th1, od eng. T helper type 1) i stanica NK putem IL-12 te aktivaciju CD8⁺ limfocita T putem glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, od eng. Major Histocompatibility Complex) razreda I. cDC2, također pojačanim lučenjem IL-12, potiču Th1, Th2, Th17 i CD8⁺ citotoksične limfocite T [129]. Takvim djelovanjem pridonose razvoju upale u OA-u odnosno sinovitisu [129]. Istraživanje Xiaoqiang i sur. [130] na zečjem modelu, pokazalo je porast broja dendritičkih stanica uz povećan izražaj TNF- α i IL-1 β i jaču upalu sinovijske membrane ranog OA-a što ukazuje na moguću patogenetsku ulogu dendritičkih stanica u razvoju OA-a. Temeljem utjecaja na razvoj imunološkog odgovora u sinovijskom tkivu, dendritičke stanice sudjeluju u razvoju i napredovanju OA-a [129]. Makrofagi su znatno brojnija skupina, odnosno s udjelom od 12-40% najzastupljeniji su tip imunoloških stanica u sinovijskom tkivu [111], a podržavaju imunološku reakciju postavljenu od strane dendritičkih stanica [131]. Obje vrste stanica služe predočavanju antigena limfocitima T [131].

Pokretanje imunološke reakcije započinje vezanje molekulskih obrazaca povezanih s patogenom (PAMP, od eng. Pathogen-associated Molecular Patterns) i/ili DAMP molekula na PRR izraženim na antigen predočnim stanicama [132]. Specifično vezanje PAMP-a odnosno DAMP-a na PRR pokreće proupalne unutarstanične signalne putove i nishodne transkripcijske čimbenike odgovorne za izvršne funkcije stanice u fiziološkim i patofiziološkim okolnostima [1].

1.1.3.2. Signalni putevi u patogenezi OA-a

Smatra se da u ranoj fazi OA-a mehanički čimbenici (povećano opterećenje, trauma ili prijelom zglobnih struktura) dovode do preinačavanja subhondralne kosti i oštećenja tkiva zglobne hrskavice [111], jednako kao i metabolički čimbenici [12]. Tim procesima nastale DAMP molekule pokreću imunološku reakciju različitim signalnim putevima [1]. Wnt (od eng. Wingless-like) signalni put ima ulogu u patogenezi OA-a zbog svog utjecaja na procese razvoja sinovitisa poticanjem lučenja IL-6 i TNF- α , razgradnje zglobne hrskavice poticanjem pojačanog izlučivanja MMP-13 i ADAMTS-5 i preinačavanje kosti [133]. Pojačana aktivacija Wnt signalnog puta i posljedični utjecaj na razvoj i napredovanje OA-a posredovana je povećanjem koncentracije Wnt proteina koje oslobađaju osteociti, hondrociti i makrofagi iz sinovijskog tkiva kao odgovor na mehanički stres ili upalu [134]. Signalni put adenosin monofosfatom aktivirana protein kinaza (AMPK, od eng. Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase) ima važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze stanica [135].

Istraživanja provedena na sinovijskim tkivu OA-a kod ljudi [136] i miševa [137] pokazala su smanjenu aktivnost AMPK signalnog puta. Obzirom na zaštitne mehanizme AMPK-a, snižena aktivnost doprinosi razvoju i progresiji OA-a [136]. Zaštitno djelovanje uključuje protuupalni učinak smanjenjem izlučivanja TNF- α , IL-1 β i IL-6, zaštitu hondrocita smanjenjem njihove apoptoze i regulaciju proizvodnje ROS-a sintezom adenozin trifosfata (ATP) [137]. mTOR (od eng. Mammalian Target of Rapamycin) signalni put važan je u održavanju homeostaze zglobnog tkiva koji se očituje u poticanju stvaranja ključnih proteina za izgradnju zglobne hrskavice (kolagen, proteoglikani) i regulacije autofagije odnosno razgradnje oštećenih stanica [138]. Osim zaštitne uloge, pojačana aktivacija mTOR-a obilježje je OA-a, a očituje se utjecajem na patogenezu [139] koja uključuje preinačavanje subhondralne kosti, poremećaj metabolizma hondrocita i poticanje razvoja upale putem proupalnih citokina [140]. Inducibilni čimbenik hipoksije (HIF, od eng. Hypoxia-Inducible Factor) je signalni put koji ima ključnu ulogu u prilagodbi stanica na smanjenu razinu kisika odnosno hipoksiju, ali i u procesima preinačavanja tkiva, staničnog metabolizma, angiogeneze i imunoloških procesa [141]. U zdravom sinovijskom tkivu zaštitna uloga HIF-a vezana je uz očuvanje funkcije hondrocita, naročito u dubljim slojevima sinovijskog tkiva koje je slabije opskrbljen kisikom [141]. Kod bolesnika s OA-om dokazana je njegova pojačana aktivnost s posljedičnom pojačanom proizvodnjom proteolitičkih enzima (MMP i ADAMTS), proupalnih citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6, te vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, od eng. Vascular Endothelial Growth Factor) koji poticanjem angiogeneze doprinosi migraciji upalnih stanica limfocita i makrofaga iz krvi te tako pridonosi daljnjem razvoju i produbljivanju upale, a time i samog OA-a [142]. TGF- β i koštani morfogenetski protein (BMP, od eng. Bone Morphogenetic Protein) signalni putevi djeluju zajedno u održavanju homeostaze zglobnog tkiva, odnosno njegovom razvoju poticanjem rasta i diferencijacije stanica i građevnih proteina koštanog matriksa te kontroli razvoja upale [143]. U OA-u međutim, dolazi do neravnoteže u njihovom međusobnom djelovanju [143]. Kao rezultat mehaničkog opterećenja dolazi do pojačane aktivacije BMP-a što aktivira osteoklaste te potiče rast ektopične kosti dok s druge strane TGF- β promovira fibrozu i razgradnju koštanog tkiva [143,144]. Održavanje homeostaze zglobnog tkiva, primarno mehaničke veze aktina i izvanstaničnog matriksa te adhezije i migracije stanica, temeljne su uloge FA (od eng. Focal Adhesion) signalnog puta [145]. U OA-u, kao posljedica dugotrajnog mehaničkog stresa, aktivnost FA povezuje se s razvojem degenerativnih promjena koštanog tkiva i povećanja upale koja se razvija zbog pojačane migracija upalnih stanica iz krvi u sinovijsko tkivo [146]. Aktivnost čimbenika rasta fibroblasta (FGF, od eng. Fibroblast Growth Factor) signalnog puta preduvjet je za fiziološki rast i razvoj zglobne hrskavice što se potvrđuje

činjenicom da u uvjetima patološke aktivnosti dolazi do poremećaja u normalnom razvoju zglobnih struktura te razvoja i napredovanja OA-a [147]. Istraživanja učinka FGF-a pokazala su da u OA-u pojačana aktivnost FGF-1, -3 i -8, koji djeluju kao ligandi za aktivaciju FGF signalnog puta, uzrokuje smanjenje sposobnosti hondrocita za sintezu građevnih proteina proteoglikana i kolagena, potiče stvaranje MMP-13 i ADAMTS-5, pojačava stvaranje prostaglandina i stimulira proupalno djelovanje IL-1 i TNF- α [148]. Runx2 (od eng. Runt-related transcription factor 2) signalni put ključan je u procesu razvoja kostiju temeljem njegove uloge u sazrijevanju i diferencijaciji hondrocita i osteoblasta [149]. Temeljem istraživanja koja su provedena kod bolesnika s OA-om, ali i na životinjskim modelima, dokazana je njegova značajna uloga u pokretanju, razvoju i napredovanju OA-a [1]. Povećan izražaj Runx2 pronađen je u stanicama hrskavice zglobova kod ljudi i životinja [150]. Na mišjim modelima ustanovljen je pojačan izražaj Runx2 nakon traumatske ozljede zgloba što je ubrzalo napredovanje OA-a [151] te potaknulo pojačan izražaj i djelovanje MMP-13 i ADAMTS-5 [152]. Važno je naglasiti i njegovu ulogu u poticanju prethodno spomenutih Wnt, TGF β , HIF i FA signalnih puteva, što dovodi do diferencijacije hondrocita i aktivacije procesa razgradnje zglobne hrskavice [150]. NF- κ B je transkripcijski čimbenik koji ima središnju ulogu u poticanju imunološkog odgovora, razvoju upale, procesu sazrijevanja i preživljavanja stanica [153]. Vezanjem proupalnih citokina (TNF- α , IL-1 β), PAMP ili DAMP molekula na PPR, od kojih se u okviru aktivacije NF- κ B signalnog puta ističu receptori slični Toll-u, primarno TLR4, dovodi do poticanja niza procesa koji imaju središnju ulogu u patogenezi OA-a [153]. Oni uključuju lučenje proteolitičkih enzima (MMP i ADAMTS) odgovornih za razgradnju zglobne hrskavice te smanjenje proizvodnje proteoglikana i kolagena [154]. Razvoj upale i apoptoza stanica rezultat su utjecaja NF- κ B na poticanje pojačanog lučenja upalnog medijatora prostanglandina E2, proupalnih citokina (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) i kemokina (MCP-1, MIP-2, CXCL1, CXCL10), djelovanje sintaze dušikovog oksida (NOS, od eng. Nitric Oxide Synthases) i proizvodnje dušikovog oksida (NO) te poticanja aktivnosti ciklooksigenaze (COX, od eng. Cyclooxygenase)-2 i drugih signalnih puteva kao što su HIF i Runx2 [154,155].

1.1.4. TLR4

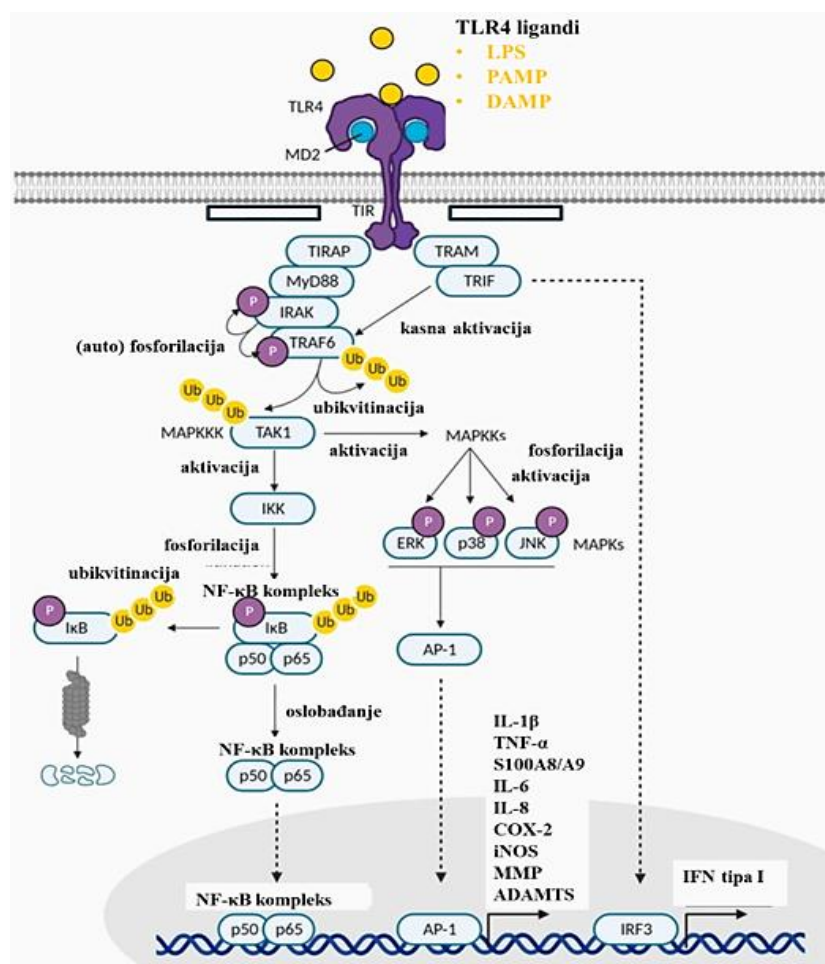
TLR-i su skupina transmembranskih proteina koji spadaju u skupinu PRR-a [156]. Glavna uloga im je prepoznavanje i vezanje PAMP i DAMP molekula [157], a dominantno su izraženi na makrofagima, monocitima, neutrofilima, stanicama NK, dendritičkim i epitelnim stanicama [158]. Vezanjem PAMP i DAMP molekula pokreće se kaskadna reakcija aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva koji dovode do sinteze proupanih molekula (citokina,

kemokina i IFN-a) [159]. Taj korak ključan je u aktivaciji stečene imunosti. Vezanje PAMP i/ili DAMP molekula na TLR-e također ima ulogu i u poticanju apoptoze, odnosno programirane stanične smrti [160] tzv. ektrinzičnim tj. vanjskim putem [161]. Za razliku od ektrinzičnog, intrinzični (unutrašnji) put pokretanja apoptoze pokreće se kao odgovor na unutarstanični oksidativni stres i oštećenje DNA [161]. Ključna molekula intrinzičnog puta pokretanja apoptoze je čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze-1 (APAF-1, od engl. Apoptotic Protease Activating Factor-1) [161]. Vezanjem APAF-1 i citokroma c stvara se kompleks odnosno apoptosom koji poticanjem kaspaze 9 pokreće unutarstaničnu lančanu reakciju koja uvodi stanicu u apoptozu [162].

Od svih članova iz obitelji TLR-a, najviše je istraživani TLR4. TLR4 je građen od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične odnosno citoplazmatske Toll/IL-1R (TIR, od eng. Toll/Interleukin-1 Receptor) domene koja je odgovorna za unutarstanični prijenos signala i aktivaciju transkripcijskih čimbenika [163]. Lipopolisaharid (LPS) je prototip izvanstaničnog ili egzogenog, dok je Hsp70 prototip unutarstaničnog ili endogenog liganda za TLR4 [164]. Temeljna uloga Hsp-a je održavanje strukture bjelančevina odnosno njihov popravak zbog oštećenja nastalih fiziološkim ili okolišnim stres čimbenicima kao što su upala, infekcija ili toplina i time očuvanje homeostaze i funkcije stanica [165]. Ukoliko u tome ne uspiju, stanice postaju manje funkcionalne i stanična membrana propusnija [166]. Tako se stvara preduvjet za izlazak Hsp-a u izvanstanični prostor što predstavlja daljnji signal opasnosti za imunološki sustav [166]. Hsp70 je glavni molekularni šaperon čiji je izražaj značajno povišen u stanicama pod djelovanjem čimbenika stresa, a oslobađanjem iz stanice može djelovati kao DAMP molekula koja vezanjem na TLR4 potiče proupalni odgovor [167]. Poznata je i povezanost Hsp70 kao patogenetskog čimbenika u razvoju i napredovanju niza bolesti kao što su tumori, šećerna bolest, bolesti jetre, neurološke, kardiovaskularne i autoimune bolesti [168].

Vezanje specifičnog liganda uzrokuje aktivaciju odnosno dimerizaciju TLR4 i vezanje za ko-receptore CD (klaster diferencijacije, od eng. Cluster of Differentiation)14 i mijeloidni čimbenik diferencijacije 2 (MD2, od eng. Myeloid Differentiation Factor 2) izražene na staničnoj membrani [169]. Konformacijske promjene TIR domene aktiviraju dva neovisna signalna puta: MyD88 (od eng. Myeloid Differentiation primary response 88) ovisan i MyD88 neovisan put. MyD88 ovisan signalni put potiče NF- κ B i aktivacijski protein-1 (AP-1, od eng. Activating Protein-1) koji djeluju kao transkripcijski čimbenici, dok MyD88 neovisan signalni put potiče djelotvornost čimbenika 3 transkripcije interferona (IRF3, od eng. Interferon Regulatory Transcription Factor 3). Produkti poticanja NF- κ B i AP-1 su proupalni citokini (TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-18), kemokini (CXCL1, CXCL10), enzimi za cijepanje bjelančevina

međustanične tvari (MMP, ADAMTS), vaskularne stanične adhezijske molekule-1 (VCAM-1, od eng. Vascular Cell Adhesion Molecule-1) i unutarstanične adhezijske molekule-1 (ICAM-1, od eng. Intercellular Adhesion Molecule-1) [155,163]. Aktivacija IRF3 puta dovodi do sinteze IFN-a tipa 1 [163] (Slika 3).



Slika 3. *Mehanizam aktivacije TLR4 te posljedična kaskadna aktivacija unutarstaničnih signalnih puteva. Preuzeto i prilagođeno prema [163]. ADAMTS- Dezintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina (od eng. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs); AP-1- Aktivacijski protein-1 (od eng. Activating Potein-1); COX-2- Ciklooksigenaza-2 (od eng. Cyclooxygenase-2); DAMP- Molekulski obrazci povezani s oštećenjem (od eng. Damage- Associated Molecular Patterns); IFN- Interferon; IL- Interleukin; iNOS- Inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. Inducible Nitric Oxide Synthase); IRF3- Čimbenik 3 transkripcije interferona (od eng. Interferon Regulatory Transcription Factor 3); JNK- c-Jun N-terminalna kinaza (od eng. c-Jun N-terminal Kinase); LPS- Lipopolisaharid; MAPK- Protein kinaza aktivirana mitogenom (od eng. Mitogen-Activated Protein Kinase); MMP- Matriks metaloproteinaza (od eng. Matrix Metalloproteinase); MyD88- od eng. Myeloid Differentiation primary response 88; NF-κB- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa B); PAMP- Molekulski obrazci povezani s patogenom (od eng. Pathogen-associated Molecular Patterns); TLR4- Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like receptor 4); TNF- Čimbenik nekroze tumora (od eng. Tumor Necrosis Factor).*

Utjecaj aktivacije TLR4 povezuje se s patogeneom niza kroničnih bolesti, najčešće onih povezanih sa starenjem (Alzheimerova bolest, bolesti srca i krvožilnog sustava, DM tip 2, OA, emfizem pluća) [158]. Istraživanja patogeneze i utjecaja rizičnih čimbenika na razvoj OA-a pokazala su izražaj TLR4 na stanicama sinovijske membrane. DAMP molekule (ROS, dijelovi međustanične tvari, produkti staničnog metabolizma, plazmatske bjelančevine) kao i LPS, vezanjem na TLR4 pretežno aktiviraju NF- κ B transkripcijski čimbenik uz sintezu proupalnih posrednika. Posljedica je razvoj sinovitisa, kronične upale niskog stupnja u zglobov zahvaćenom OA-om, koja predstavlja glavno svojstvo bolesti. Osim povećanog izražaja TLR4, u OA-u povećan je i izražaj staničnog biljega CD14 kao i njegovog slobodnog (topljivog) oblika u sinovijskoj tekućini koji su u pozitivnom međuođnosu sa stupnjem aktivacije sinovijskih makrofaga, upalom zahvaćenog zgloba i težinom bolesti [163]. Novija istraživanja glede terapije OA usmjeravaju se upravo na pronalazak odgovarajućih antagonista za TLR4 i tvari koja koči aktivaciju NF- κ B puta [163,170].

1.2. Obilježja sinovijskih makrofaga

1.2.1. Porijeklo sinovijskih makrofaga

Makrofagi, stanice urođenog imunološkog sustava, predstavljaju „prvu liniju“ obrane od stranih, ali i vlastitih izmijenjenih antigena temeljem njihovih osnovnih izvršnih funkcija prepoznavanja, internalizacije, obrade, i predočavanja antigena limfocitima T [171]. Stoga, osim uloge u zaštiti organizma od infekcija, imaju širu ulogu u postizanju tkivne homeostaze u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima [172,173]. Poznata je uključenost makrofaga u patogenezu autoinflamatornih i autoimunih reumatoloških bolesti [174] (RA, sistemski eritemski lupus, Sjogren sindrom, OA, spondiloartritis, idopatski upalni miozitis) i tumora [175].

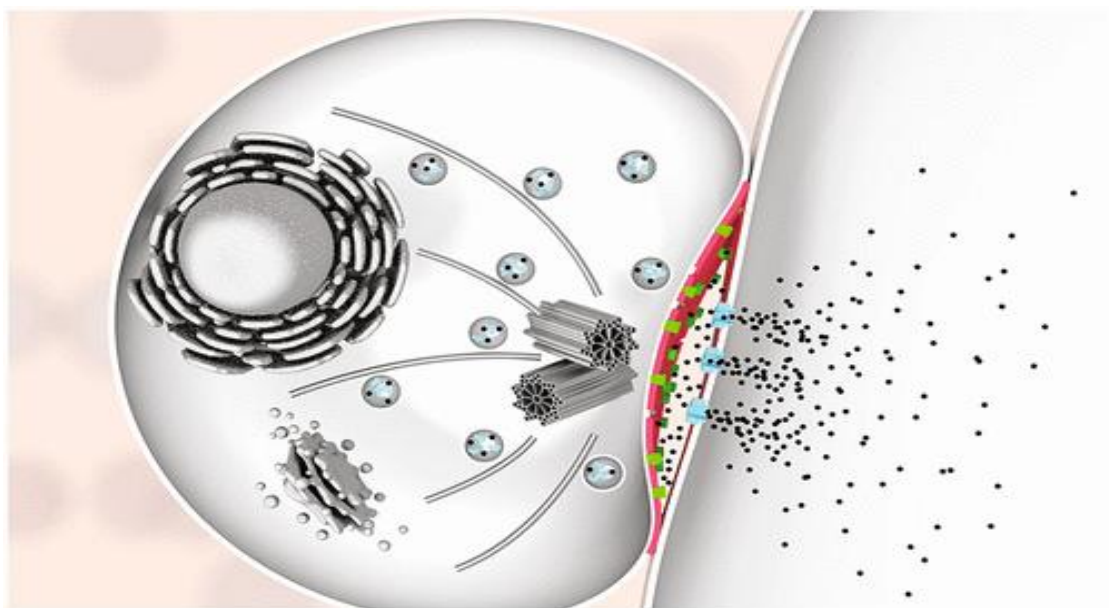
Povijesno se smatralo da makrofagi nastaju kao rezultat diferencijacije stanica monocita, koji iz krvi, kemotaksičnim djelovanjem kemokina, ulaze u tkiva i sazrijevaju u specijalizirane tkivne makrofage [176]. Prema toj teoriji, razvoj mononuklearno-fagocitnog sustava započinje u koštanoj srži iz pluripotentne hematopoetske matične stanice [176]. Međutim, novija istraživanja provedena na mišjim modelima, opisuju tri faze razvoja tkivnih makrofaga čije ishodišne razvojne stanice potječu iz embrionalne žumanjačke vreće [177] i neovisne su o monocitno-makrofagnoj liniji sazrijevanja [178]. U prvoj, primitivnoj fazi razvoja tkivnih makrofaga, stvaraju se ishodišne stanice eritrocitno-mijeloidne loze i makrofaga neovisnih o monocitima u žumanjačkoj vreći [179]. U drugoj fazi nastaju kasne stanice eritrocitno-

monocitne loze iz hematogenih endotelnih stanica i putem krvi ulaze u jetru gdje sazrijevaju u makrofage [180]. U završnoj fazi, kasne stanice eritrocitno- monocitne loze u jetri postaju hematopoetske, ali ujedno migriraju i u druga tkiva [181]. Tim mehanizmom stvaranje specijaliziranih tkivnih makrofaga traje do 16. dana embrionalnog razvoja, nakon kojeg pluripotentna hematopoetska matična stanica u koštanoj srži preuzima trajnu ulogu u stvaranju monocita i njihovu diferenciju u makrofage [180]. Specijalizirani tkivni makrofagi razvijeni iz hematopoetske matične stanice žumanjčane vreće imaju cjeloživotnu sposobnost samoodržavanja i izvršavanja temeljnih funkcija neovisno o monocitno-makrofagnoj liniji sazrijevanja [177].

1.2.2. Funkcije makrofaga

Obje skupine makrofaga (makrofagi porijeklom iz tkiva i iz koštane srži) u tkivima obavljaju izvršne uloge poput stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, od eng. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) [182], stanične fagocitoze ovisne o protutijelima (opsonizacija), nadziranje imunološkog odgovora i tkivna preinačavanja [183].

Važna uloga makrofaga je ADCC, iako se stanice NK opisuju kao primarne izvršne stanice ADCC mehanizma [184]. ADCC predstavlja tip imunološke obrane posredovane stanicama, gdje makrofag ili stanica NK ubija ciljnu stanicu obloženu protutijelima [185]. To se ostvaruje vezanjem receptora za Fc fragment imunoglobulina (Ig) G (FcγR, od eng. Fc-gamma Receptor) tipa III (CD16) izraženih na površini izvršnih stanica imunološkog sustava (stanice NK, makrofagi i neutrofili) [186] za Fc fragment protutijela IgG koje je specifično izraženo na površini ciljne stanice [187]. Ostvarivanje veze FcγR III (CD16) s Fc fragmentom IgG protutijela na ciljanoj stanici označava signal za lučenje citotoksične molekule (perforin) iz stanice NK [188], ali i makrofaga [189]. Perforin stvara pore na ciljnoj stanici i dozvoljava ulaz izvanstanične tvari u njenu citoplazmu što je razlog za njezino bubrenje i smrt nekrozom [190]. Mehanizam lučenja perforina i zaštita citotoksičnog limfocita od njegovog djelovanja prikazani su na Slici 4.



Slika 4. *Mehanizam zaštite citotoksičnih limfocita od djelovanja izlučenog perforina. Slika prikazuje citotoksični limfocit koji formira imunološku sinapsu (prikazano je središte za organiziranje mikrotubula i polarizacija citotoksičnih granula). Granzimi (crne točkice) ulaze u ciljne stanice kroz perforinske pore (svijetloplave) na membrani ciljne stanice. Uređeni lipidni sloj na membrani limfocita (prikazano crvenom bojom) sprječava njeno oštećenje perforinom, a izloženi fosfatidilserin (prikazan zelenom bojom) dodatno štiti limfocit ograničavanjem vezanja perforina na membranu limfocita. Ovaj mehanizam omogućuje citotoksičnim limfocitima da učinkovito izlučuju perforin i granzime kako bi uništili ciljnu stanicu istovremeno štiteći sebe. Preuzeto iz [191].*

Granulizin (GNLY) također ulazi u ciljnu stanicu kroz perforinske pore i potiče apoptozu cijepanjem DNA [191]. Učinak navedenih mehanizama ovisi o izražaju citotoksičnih medijatora u makrofagima, koji su još uvijek predmet istraživanja.

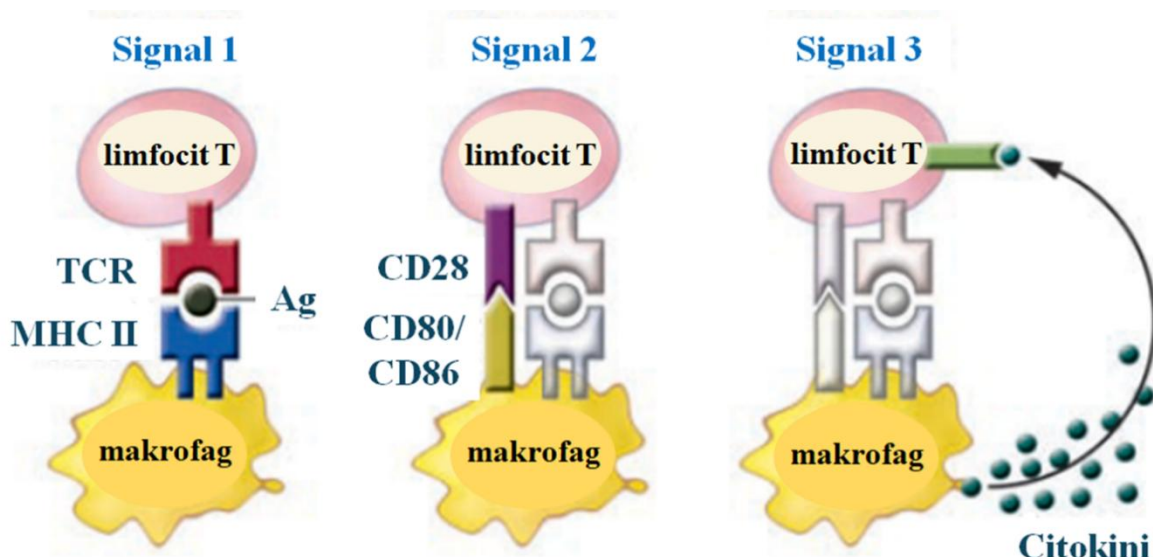
Najranije otkrivena uloga makrofaga jest fagocitoza. Fagocitoza uključuje internalizaciju izvanstaničnog antigena, odnosno patogena, njegovo ubijanje unutarstaničnim mehanizmima i/ili uvođenje inficiranog makrofaga u programiranu staničnu smrt (apoptozu) i posljedično preinačavanje i remodeliranje oštećenog tkiva [192].

Olakšana fagocitoza čestica obloženih protutijelima ili opsonizacija jest mehanizam koji najčešće koriste makrofagi za uklanjanje stranih mikroorganizama [193], međutim ona može biti posredovana i monocitima, neutrofilima i dendritičkim stanicama [194]. Mehanizam opsonizacije temelji se na vezanju Fc regije fragmenta IgG protutijela izraženog na ciljnoj stanici i FcγRIIa, FcγRI i FcγRIIIa receptora na izvršnim stanicama- makrofagima [192]. Glavni signalni put aktivacije fagocitoze predstavlja vezanje FcγRIIa (CD32a) na stanicama makrofaga s Fc fragmentom IgG obložene ciljne stanice [195].

Lokalna i sustavna imunomodulacijska uloga makrofaga definirana je sintezom i lučenjem brojnih citokina i kemokina, kemotaksijom limfocita i stanica NK na mjesto upale, sintezom

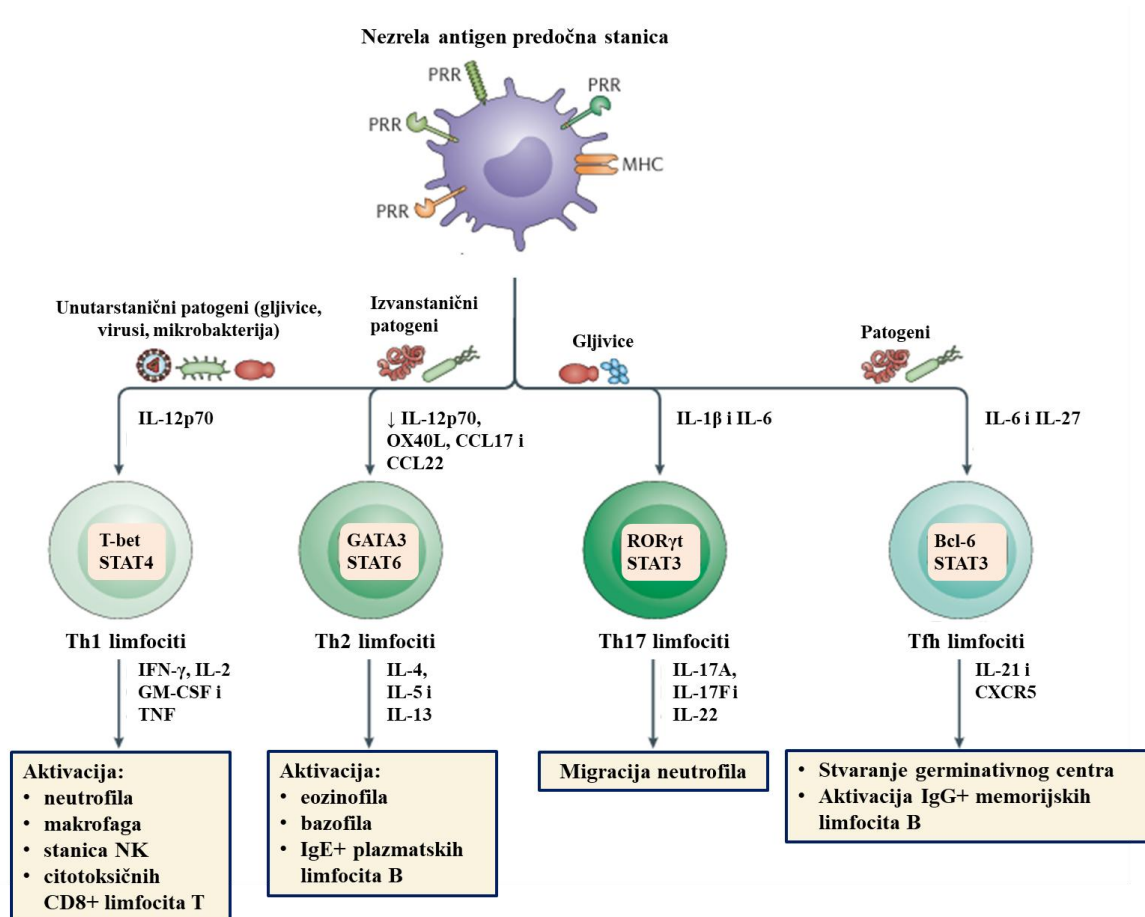
čimbenika rasta kao ključnih molekula u obnavljanju oštećenog tkiva i nadasve predočavanjem antigena limfocitima T. Prepoznavanje stranih i vlastitih izmijenjenih antigena od strane makrofaga posredovano je izražajem brojnih PPR od kojih je TLR4 izražen dominantno na M1 makrofagima [196] i predstavlja glavni receptor za LPS [169] iz stijenke bakterije *Escherichia coli* [197] čijim vezanjem se podržava snažni proupalni imunološki odgovor posredovan pomoćničkim (CD4+) limfocitima T (CD3+) podvrste 1 (CD3+CD4+ Th1) [198] .

Manozni receptor (CD206) je svojstvo membrane svih makrofaga i drugih tjelesnih stanica [199], ali je njegov izražaj u većoj količini obilježje M2 makrofaga [200]. Manozni receptor ima tri vezna mjesta na izvanstaničnom dijelu molekule [199]. Cisteinom bogata domena veže sulfirani glikoprotein, domena s ponavljanjem fibronektina tipa II veže kolagen, a domena za prepoznavanje ugljikohidrata veže glikoproteine, koji sadrže ostatke manoze, fruktoze i N glukozamina porijeklom iz tuđih (PAMP) ili vlastitih (DAMP) antigena [199,201] te potiče njihovo unošenje u stanicu endocitozom [202] i unutarstaničnu razgradnju na peptidne molekule [203]. Tako stvoreni peptidi unutar stanice vežu se za molekulu MHC razreda II. Kompleks antigena i molekule MHC razreda II na površni stanica makrofaga predočuje se antigen specifičnim CD4⁺ limfocitima T [204] što je ujedno i prvi od tri signala nužna za aktivaciju limfocita T [205,206]. Drugi signal uključuje međudjelovanje kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na makrofagima i CD28 na limfocitima T, što uzrokuje njihovo umnažanje, povećava lučenje citokina i potiče citotoksični potencijal [207]. Treći signal je stvaranje i izlučivanje specifičnih citokina od strane makrofaga (Slika 5). Ovisno o tipu citokina koji luče makrofagi, podržava se imunološka orijentacija limfocita T nastala isključivo djelovanjem dendritičkih stanica [208]. Na taj način citokinsko-kemokinsko okruženje u tkivu usmjerava limfocite T prema određenoj podvrsti izvršnih stanica [206].



Slika 5. Tri ključna signala u aktivaciji stanici T limfocita posredstvom antigen predočnim stanicama. Preuzeto i prilagođeno prema [206]. Ag- Antigen; CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); MHC- Glavni kompleks histokompatibilnosti (od eng. Major Histocompatibility Complex); TRC- Receptori limfocita T (od eng. T Cell Receptors).

U tkivnom okruženju bogatom s IL-12p70 aktivira se STAT (od engl. Signal Transducer and Activator of Transcription) 4, koji nadzire transkripcijski čimbenik T-bet (od engl. T-box expressed in T cells) u limfocitima T i na taj način podržava Th1, odnosno stanični imunološki odgovor, kojemu je svojstveno lučenje proupalnih citokina (IFN- γ , TNF- α , IL-2) i čimbenika rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF, od eng. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) potrebnih za obranu od unutarstaničnih patogena kao što su gljivice, virusi i mikobakterije [208]. Smanjena koncentracija IL-12p70 u tkivu koji obiluje s CCL17 i CCL22 uzrokuje Th2 imunološki odgovor kojemu je svojstveno stvaranje veće količine IL-4, IL-5 i IL-13 potaknutog sa STAT6 i izražajem transkripcijskog čimbenika GATA3 (od eng. GATA Binding Protein) [208]. Th17 imunološki odgovor nastaje pod stimulacijom IL-23 uz prisustvo IL-6 u ljudi [209] i po poticanju djelovanja transkripcijskih čimbenika STAT3 i ROR γ t (od eng. Retinoic Acid Related Orphan Receptor- γ t), ključnih u obrani od gljivica putem izlučivanja IL-17A, IL-17F i IL-22 [208]. TGF- β stimulira sazrijevanje naivnih limfocita T u regulacijske limfocite T (Treg, od eng. Regulatory T cells), odnosno uz prisustvo IL-6 u ljudi u Th17 limfocite [210]. Međudjelovanje makrofaga s nezrelim limfocitima Th2 (Th2 prethodnicima), ali uz odsustvo IL-12p70 i IL-18, potiče sintezu IL-4 odgovornog za sazrijevanje limfocita Th2 [208]. Th2 stanice koje proizvode IL-4 potiču djelotvornost limfocita B i humoralni imunološki odgovor [211] (Slika 6).



Slika 6. Interakcija patogena s antigen prezentirajućim stanicama određuje diferencijaciju pomoćničkih limfocita T (Th) odnosno tip imunološkog odgovora. Preuzeto i prilagođeno prema [208]. Bcl-6- od eng. B-cell lymphoma 6; CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CXCR5- CXC kemokinski receptor 5 (od eng. C-X-C chemokine receptor 5); GATA- od eng. GATA Binding Protein; GM-CSF- Čimbenik rasta granulocitno- makrofagnih kolonija (od eng. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor); IFN- γ - Interferon γ ; Ig- Imunoglobulin; IL- Interleukin; MHC- Glavni kompleks histokompatibilnosti (od eng. Major Histocompatibility Complex); Stanice NK- Stanice prirodne ubojice (od eng. Natural Killer Cells); PRR- Receptori za prepoznavanje obrazaca (od eng. Pattern Recognition Receptors); ROR γ t- od eng. Retinoic acid receptor-Related Orphan Receptor- γ t); STAT- od engl. Signal Transducer and Activator of Transcription; T-bet- od engl. T-box expressed in T cells; Th1- Pomoćnički limfociti T tipa 1 (od eng. T helper type 1); Th2- Pomoćnički limfociti T tipa 2 (od eng. T helper type 2); Th17- Pomoćnički limfociti T tipa 17 (od eng. T helper type 17); Tfh- Folikularni pomoćnički limfociti T (od eng. Follicular helper T cells); TNF- Čimbenik nekroze tumora (od eng. Tumor Necrosis Factor).

Iz navedenog postaje razvidno da manozni receptor, kao jedan od PRR ima mnogo širu ulogu u regulaciji tkivne homeostaze [212]. Vezanje liganada za domenu za prepoznavanje ugljikohidrata na manoznom receptoru specifičnim protutijelima ili glikoproteinima može dovesti do pokretanja protuupalnog i tolerogenog programa u dendritičkim stanicama stvorenim *in vitro* iz monocita [213]. *Ex vivo*, međudjelovanje manoznog receptora izraženog

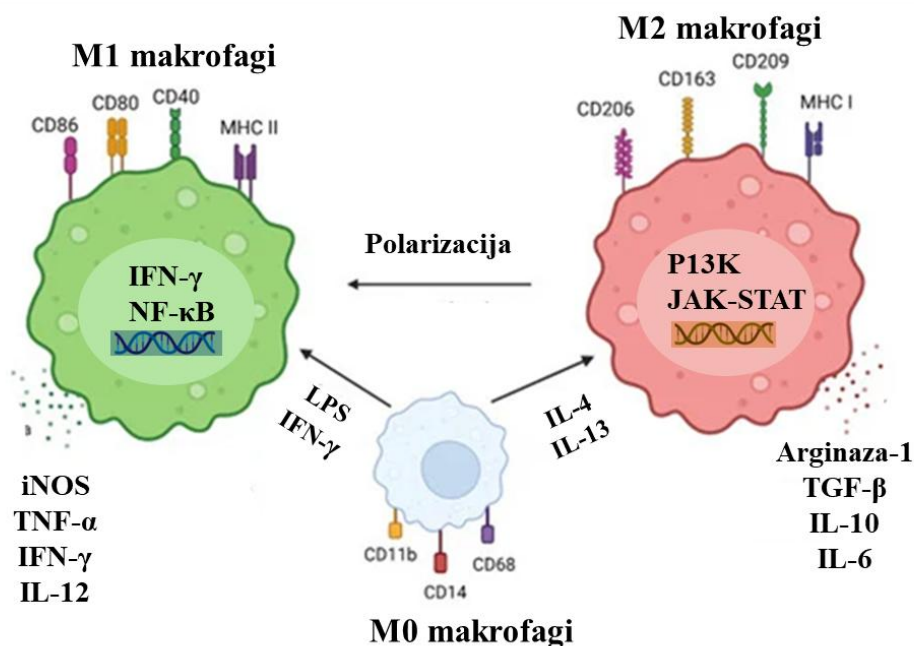
na decidualnim makrofagima s glikoproteinima na majčino-fetalnom sučelju tijekom trudnoće moglo bi unaprijediti Th2 proizvodnju citokina, neophodnu za održavanje trudnoće, u razdoblju nakon implantacije u kojem prevladava proupalni Th1 imunološki odgovor [214–216].

Slično tome, sinovijska membrana u zglobu s OA-om bogata je makrofagima i CD4⁺ limfocitima T od kojih dominiraju Th1 limfociti [108]. Proupalno aktivirani makrofagi putem citokina, prvenstveno TNF- α i IL-1 β , povećavaju vaskularnu permeabilnost i infiltraciju Th1 limfocita u sinovijsku membranu [217]. Th1 limfociti, lučenjem proupanih citokina (IFN- γ , IL-2, TNF- β), podržavaju funkciju proupalnih makrofaga [208]. Aktivirani limfociti B luče proupalni IL-6 i sintetiziraju specifična protutijela usmjerena na strukturne proteine hondrocita (kolagen, osteopontin) [108] čime doprinose održavanju i jačanju upalnog procesa odnosno promoviraju razgradnju zglobne hrskavice.

Makrofagi su najzastupljenija vrsta imunoloških stanica unutar zgloba i nedavno su prepoznati kao bitan čimbenik u razvoju i napredovanju OA-a [218].

1.2.3. Polarizacija makrofaga

Polarizacija makrofaga definira se kao njihova sposobnost da ovisno o tipu signala iz njihove okoline izražavaju funkcionalno različita fenotipska i funkcijska svojstva. Na temelju fenotipskih svojstava makrofagi se dijele u dvije fenotipski različite subpopulacije: M1 makrofage odnosno klasično aktivirane i M2 makrofage odnosno alternativno aktivirane [195] (Slika 7). Važno je napomenuti da makrofagi imaju sposobnost da ovisno o tipu aktivacijskog signala mogu mijenjati fenotip iz M1 u M2 i obrnuto [219]. Takvo imanentno svojstvo makrofaga opisuje se i pojmom „plastičnost makrofaga“ čija se važnost očituje u međusobnoj isprepletenosti uloge M1 makrofaga, koji su proupalnim djelovanjem usmjereni na uklanjanje patogena i M2 makrofaga koji svojim protuupalnim djelovanjem i sintezom komponenti izvanstaničnog matriksa potiču regeneraciju oštećenog tkiva [173]. Stoga u tkivu nalazimo niz prijelaznih oblika makrofaga od M1 do M2d polarizacije, nastalih po trenutnim poticajima iz okoline [195].



Slika 7. Polarizacija makrofaga. M0 (naivni) makrofagi izražavaju površinske biljege CD11b, CD14 i CD68. Stimulacijom sa LPS-om i IFN- γ M0 makrofagi polariziraju u M1 (proupalni) tip makrofaga. M1 karakterizira izražaj CD86, CD80, CD40 i MHC razreda II površinskih biljega i sinteza proupalnih biljega (iNOS, TNF- α , IFN- γ , IL-12). Stimulacijom s IL-4 i IL-13 M0 makrofagi polariziraju u M2 (protuupalni) tip makrofaga. M2 makrofage karakterizira izražaj površinskih receptora CD206, CD163, CD209 i MHC razreda I i sinteza protuupalnih citokina (arginaza-1, TGF- β , IL-10, IL-6). Preuzeto i prilagođeno prema [220]. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); IFN- γ - Interferon γ ; Ig- Imunoglobulin; IL- Interleukin; JAK-STAT- od eng. Janus kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription; LPS- Lipopolisaharid; MHC- Glavni kompleks histokompatibilnosti (od eng. Major Histocompatibility Complex); NF- κ B- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); P13K- Fosfatidilinozitol-3 kinaza (od eng. Phosphatidylinositol 3-kinase); TGF- β - Transformirajući čimbenik rasta β (od eng. Transforming Growth Factor β); TNF- α - Čimbenik nekroze tumora α (od eng. Tumor Necrosis Factor α).

Središnju ulogu u definiranju funkcijskih razlika i klasifikaciji makrofaga u M1 i M2 fenotipske subpopulacije ima metabolički put razgradnje aminokiseline arginina [221]. Razgradnja arginina putem enzima iNOS do dušikovog oksida (NO) i citrulina obilježje je M1 makrofaga dok je razgradnja putem arginaze-1 do ornitina i ureje obilježje M2 makrofaga [222]. Izražaj, odnosno aktivnost enzima koji katalizira razgradnju arginina definira dva oprečna i međusobno neovisna fenotipa makrofaga: M1 (iNOS+) i M2 (arginaza-1+) [221]. Također je važno napomenuti i razliku u metaboličkim putevima koji su izvor energije za održavanje homeostaze M1 i M2 makrofaga. U M1 makrofagima to je proces glikolize, dok je u M2 makrofagima izvor energije oksidacija masnih kiselina i oksidativna fosforilacija [223]. Temeljem razlika u metaboličkim putevima omogućeno je održavanje fiziološke uloge i polarizacijskog statusa M1 makrofaga u anaerobnim odnosno M2 u aerobnim uvjetima.

1.2.4. M1 makrofagi

M1, odnosno klasično aktivirani makrofagi, svojim proupalnim djelovanjem čine prvu liniju obrane kod infekcija uzrokovanih unutarstaničnim patogenima. Proupalno djelovanje karakterizirano je lučenjem proupalnih citokina, stimulacijom Th1 imunološkog odgovora lučenjem IL-12 i antigen predočnom aktivnošću [173]. Glavni aktivatori M1 makrofaga su IFN- γ , TNF- α i LPS. Glavne funkcije IFN- γ su oblikovanje i stimulacija imunološkog odgovora urođene, ali i stečene imunosti. Stanice NK i NKT (od eng. Natural Killer T-lymphocytes) sintetiziraju IFN- γ u sklopu urođenog imunološkog odgovora, dok su za njegovu sintezu u sklopu stečenog imunološkog odgovora odgovorni pomoćnički CD4⁺ i citotoksični CD8⁺ limfociti T. Za stimulacija M1 makrofaga, uz primarni signal koji se ostvaruje vezanjem IFN- γ , nužan je i sekundarni signal odnosno vezanje PAMP molekula uključujući LPS za TLR4 što potiče transkripcijski čimbenik NF- κ B koji je odgovoran za stvaranje proupalnih posrednika, a time i razvoja upale [38,44]. Rezultat je sinteza TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 i IL-23 [173].

1.2.4.1. iNOS

Glavni biljeg klasično aktiviranih makrofaga je iNOS. iNOS izoforma enzima NOS, uz neuronsku (n) NOS i endotelnu (e) NOS, katalizira reakciju razgradnje L-arginina u makrofagima [224]. U reakciji molekularni kisik i reducirani oblik molekule nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH, od eng. Nicotinamide- Adenine- Dinucleotide Phosphate) sudjeluju kao kosupstrati. Konačni produkt razgradnje je molekula NO [221]. Citotoksični učinak NO u stanicama ostvaruje se inhibicijom ključnih enzima u procesima oksidativne fosforilacije u mitohondrijima i replikaciji molekule DNA [225]. Mehanizam inhibicije temelji se na visokom afinitetu vezanja NO za molekulu željeza u strukturi enzima [224]. Također, vezanjem NO za molekulu superoksida ($\bullet$ O₂⁻) nastaje peroksinitrit (ONOO⁻) koji svojim oksidativnim učinkom djeluje na razaranje unutarstaničnog patogena [226]. Glavni stimulatori izražaja iNOS-a u makrofagima su proupalni citokini (IL-1 β , IFN- γ i TNF- α), LPS i hipoksija [221].

1.2.6. M2 makrofagi

M2 su alternativno aktivirani, protuupalni makrofagi [227]. Sudjeluju u nadziranju imunološkog odgovora i obnavljanju oštećenog tkiva [228]. Utječu na strukturu izvanstanične tvari nadziranjem rada proteaza i čimbenika rasta [173]. Na temelju razlika u osnovnim funkcijama odnosno ulogama, aktivacijskim čimbenicima i staničnim biljezima, M2 makrofagi

se dijele u četiri subpopulacije: M2a, M2b, M2c i M2d [229]. Glavni biljeg M2 makrofaga je arginaza-1.

1.2.6.1. M2a makrofagi

IL-4 i IL-13 stimuliraju diferencijaciju M2a makrofaga. Protuupalna aktivnost M2a makrofaga karakterizirana je sintezom antagonista IL-1 receptora koji inhibira proupalno djelovanje IL-1, smanjenom sintezom proupalnih citokina (TNF- α i IL-6) i niskim izražajem CD86 kostimulacijske molekule [173]. Visok izražaj manoznog receptora povezan je s njihovom snažnom fagocitnom odnosno endocitoznom aktivnošću. Sudjeluju u Th2 imunološkom odgovoru lučenjem IL-10 te u procesu zacjeljivanja rana utjecajem na proliferaciju stanica miofibroblasta i stimulacijom sinteze kolagena tipa I i fibronektina. IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18 i CCL22 produkti su aktivacije M2a makrofaga [230].

1.2.6.2. M2b makrofagi

LPS uz prisutnost IgG imunokompleksa stimulira polarizaciju M2b makrofaga. Karakterizirani su sniženim izražajem arginaze-1, mogućnošću sinteze NO i sintezom proupalnih citokina (TNF- α i IL-6) u odnosu na M2a i M2c makrofage [229]. Iako ih ta svojstva čine sličnim M1 subpopulaciji, M2b potiču Th2 imunološki odgovor sintezom IL-10 u odnosu na M1 makrofage koji putem IL-12 potiču Th1 odgovor [173].

1.2.6.3. M2c makrofagi

Stimulacijsko djelovanje IL-10, IL-6, TGF- β i glukokortikoida potiče polarizaciju makrofaga u M2c tip [173]. M2c makrofagi nakon polarizacije sintetiziraju i luče IL-10 i TGF- β te na taj način stimuliraju i sami sebe. Imaju imunosupresijsko i fagocitno djelovanje te sudjeluju u procesu zacjeljivanja rana i regeneraciji oštećenog tkiva modulacijom izvanstaničnog matriksa [229]. M2c makrofagi sintetiziraju i luče IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18 i CXCL13 [230].

1.2.6.4. M2d makrofagi

U procesu karcinogeneze tumorske stanice i stanice tumorskog mikrookoliša luče brojne molekule s kemoatraktivnim svojstvima koje potiču migraciju monocita iz krvi i tkivnih makrofaga u tumorsko tkivo koji se nazivaju M2d ili tumorom povezani makrofagi (TAM, od eng. Tumor-Associated Macrophages) [173]. TAM imaju glavnu ulogu u procesu rasta, metastaziranja i regulaciji imunosupresije tumorskog tkiva [229]. Iako se klasificiraju kao

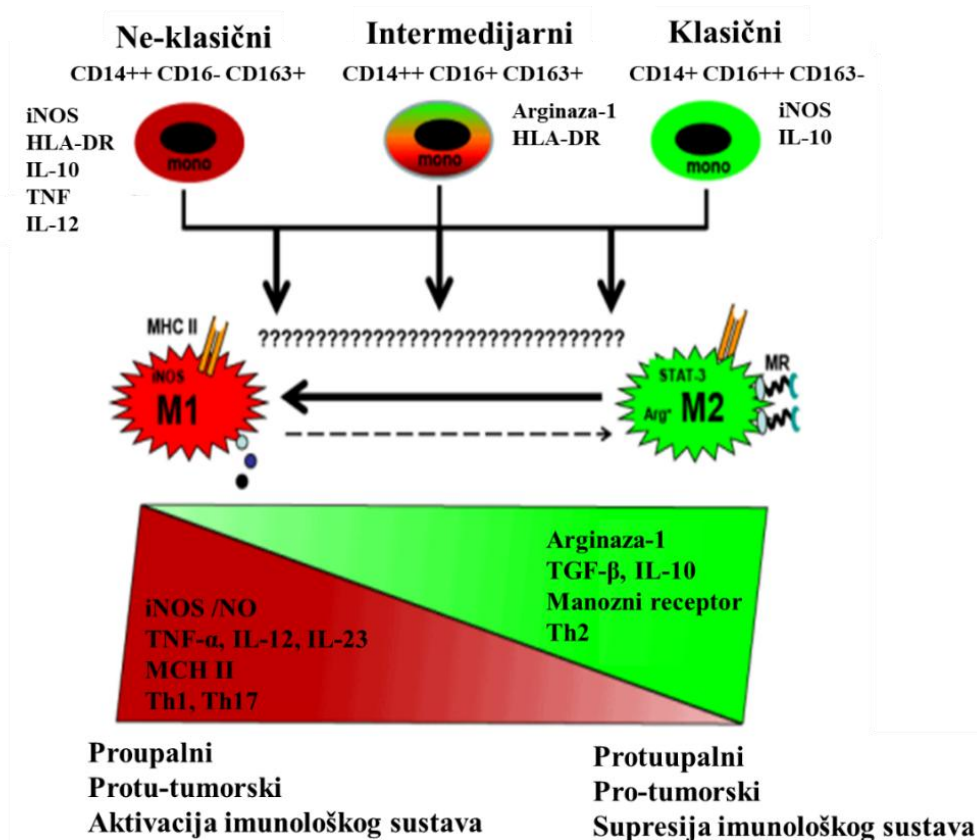
subpopulacija M2 makrofaga, TAM su izrazito heterogena skupina makrofaga povezana s tumorskim mikrookolišem koji izražavaju M1 i M2 fenotipska obilježja. Polarizacija M1 u M2 tip TAM i *vice versa* ovisna je o vrsti stimulacijskih molekula koji se sintetiziraju u tumorskom tkivu [173]. Polarizaciju M1 u TAM stimuliraju IFN- γ , TNF- α i LPS, a njihov proupalni učinak djeluje na supresiju rasta i metastaziranje tumora. Polarizaciju u M2 TAM stimuliraju IL-4, IL-10 i TGF- β , a njihov učinak djelovanja promovira rast, angiogenezu i metastaziranje tumora te razvoj rezistencije na djelovanje anti-tumorske terapije [173].

1.2.6.5. Arginaza-1

Glavna funkcija arginaze-1, temeljnog biljega M2 makrofaga, je hidroliza aminokiseline L-arginina do ornitina i ureje kao konačnih produkata [221]. Fiziološka važnost ornitina je povezana s njegovom ulogom supstrata za enzim ornitin dekarboksilazu u procesu sinteze poliamina, ključnih molekula u procesu stanične diferencijacije, rasta i udvostručenja DNA [221]. Također, ornitin ima ulogu prethodnika u sintezi aminokiseline prolina koji je nužan za sintezu molekule kolagena. Aktivnost arginaze-1 također smanjuje dostupnost L-arginina što smanjuje sintezu NO putem iNOS-a i suprimira aktivaciju limfocita T [221]. Izražaj arginaze-1 definira ulogu M2 makrofaga u procesima regeneracije oštećenog tkiva i zacjeljivanju rana, ali i patogenezi rasta i diferencijacije tumorskog tkiva temeljem njenog izražaja u M2 tipu TAM-a.

1.2.7. Makrofagi u sinovijskoj membrani bolesnika s OA-om

Makrofagi se često opisuju kao oni koji pokazuju fenotip M1 ili M2 [218]. Aktivirani čimbenicima iz okoliša kao što su IFN- γ , TNF- α i LPS, M1 makrofagi izlučuju proupalne citokine i niske razine IL-10, a M2 makrofagi pokazuju protuupalni profil i imaju funkcije popravljjanja tkiva [231]. Međutim, takvi opisi M1/M2 sada se smatraju krajnjim polovima spektra u mnogim tkivima [232]. Fenotip makrofaga uvelike varira ovisno o tkivnom okruženju tako da u tkivima nalazimo velik broj prijelaznih oblika makrofaga u spektru od M1 do M2 [218,233]. Vjeruje se da bi u okruženju upale u zglobnim tkivima bolesnika s OA-om i RA-om obilje različitih podskupina makrofaga moglo produžavati bolest, ali i uvesti bolest u remisiju, ukoliko se poticaj (upala) ukloni [234,235]. Izvršne funkcije makrofaga, temeljem njihovog sazrijevanja iz monocita i polarizacije, u zdravlju i bolesti prikazane su na Slici 8.



Slika 8. Usmjerenje sazrijevanja monocita i polarizacije makrofaga određuje izvršne funkcije tkivnih makrofaga u zdravlju i bolesti. Polarizacija između M1 i M2 makrofaga definira proupalni/protu-tumorski (M1) naspram protuupalnog/pro-tumorskog (M2) imunološkog odgovora. M1 makrofagi proizvode iNOS/NO, proupalne citokine (TNF α , IL-12 i IL-23), potiču Th1 i Th17 imunološki odgovor te se povezuju s razvojem kroničnih upalnih bolesti (Chronova bolest, kronični periodontitis). Arginaza-1 i proizvodnja protuupalnih citokina (TGF- β , IL-10) obilježja su M2 makrofaga koji potiču Th2 i Treg imunološki odgovor koji se povezuju s patogeneom autoimunih bolesti i tumorima. Izvršne funkcije slične M1 makrofagima označene su skalom crvene boje, dok su one slične M2 makrofagima označene skalom zelene boje. Točan mehanizam sazrijevanja tipova monocita u M1 i/ili M2 makrofage još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Prema Ziegler-Heitbrock i sur. [236] monociti se klasificiraju u tri tipa (skupine): klasični (CD14++ CD16- CD163+), intermedijarni (CD14++ CD16+ CD163+) i ne-klasični tip (CD14+ CD16++ CD163-). Ne-klasični i klasični tip u korelaciji su s M1 odnosno M2 makrofagima u pogledu proizvodnje proupalnih odnosno protuupalnih citokina, a oba tipa izražavaju iNOS biljeg. Intermedijarni tip izražava arginazu-1 što ih povezuje s M2 makrofagima. Tipovi monocita nisu u potpunosti u korelaciji s M1 odnosno M2 makrofagima, ali se uklapaju u skalu izvršnih funkcija koja su određene polarizacijom, diferencijacijom i poticajnim signalima te su karakteristični za lokalizirani okoliš tkiva u zdravlju i/ili bolesti. Preuzeto i prilagođeno prema [233]. Arg- Arginaza-1; CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); HLA-DR- Humani leukocitni antigen-DR (od eng. Human Leukocyte Antigen-DR); iNOS- Inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. Inducible Nitric Oxide Synthase); MHC- Glavni kompleks histokompatibilnosti (od eng. Major Histocompatibility Complex); MR- Manozni receptor; NO- Dušikov oksid; STAT-3- od engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3; TGF- β - Transformirajući čimbenik rasta β (od eng. Transforming Growth Factor β); Th1- Pomoćnički limfociti T tipa 1 (od eng. T helper type 1); Th2- Pomoćnički limfociti T tipa 2 (od eng. T helper type 2); Th17- Pomoćnički limfociti T tipa 1 (od eng. T helper type 17); TNF- Čimbenik nekroze tumora (od eng. Tumor Necrosis Factor).

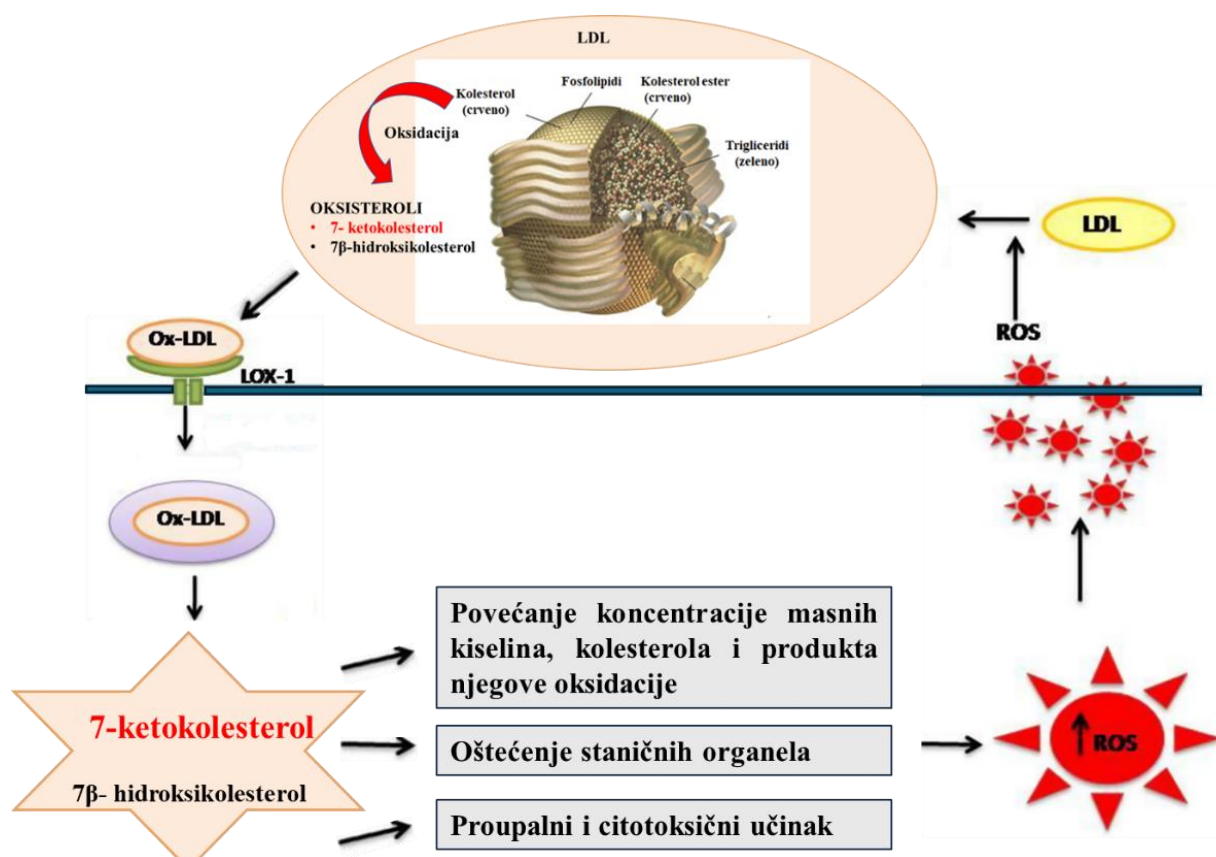
U prilog tome, sinovijska membrana bolesnika s OA-om bogata je makrofagima i CD4⁺ limfocitima T od kojih dominiraju Th1 limfociti [108,125]. U tih bolesnika velik broj aktiviranih makrofaga je u pozitivnom međuodnosu s kliničkim simptomima [125,237]. Proupalno aktivirani makrofagi putem citokina, prvenstveno TNF- α , povećavaju propusnost endotela [238] i infiltraciju sinovijske membrane Th1 limfocitima [235]. Th1 limfociti, lučenjem proupalnih citokina (IFN- γ , IL-2, TNF- β), potiču polarizaciju makrofaga u M1 proupalni tip i potiču aktivnost limfocita B. Aktivirani limfociti B luče proupalni IL-6 i sintetiziraju specifična protutijela usmjerena na strukturne bjelančevine hondrocita (kolagen, osteopontin) [108] čime doprinose održavanju i jačanju upalnog procesa odnosno promoviraju razgradnju zglobne hrskavice.

Nadalje, povećanje molekula povezanih s makrofagima (sCD163 i sCD14) i kemokina CCL2 i CX3CL1 u sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om povezuje se s lošijim kliničkim ishodom [239,240]. Smatra se da sinovijski makrofagi reagiraju na PAMP i DAMP, uključujući fragmente hrskavice i unutarstanične proteine iz nekrotičnih stanica, posljedično pridonoseći oštećenju hrskavice i promjenama kostiju kroz otpuštanje citokina kao što su IL-1 β , TNF- α i TGF- β [129]. Time se pojačava lučenje proupalnih citokina u sinovijskoj membrani koji oštećuju hrskavično tkivo djelovanjem na smanjenje sinteze elemenata izvanstaničnog matriksa [241]. Istovremeno, kemokini kemotaksijskim djelovanjem potiču infiltraciju monocita, limfocita T i stanica NK iz krvi u sinovijsku membranu [5]. S druge strane, *in vitro* studije su istaknule da smanjenje CD14⁺ makrofaga iz kultura sinovijskih stanica rezultira smanjenjem IL-1 β , TNF- α i MMP-a koje mogu razgraditi zglobnu hrskavicu [242].

1.3. Stvaranje i utjecaj 7-ketokolesterola na stanični metabolizam

Kolesterol je esencijalna lipidna molekula čije su mnogobrojne funkcije nužne za normalno održavanje homeostaze organizma [243]. Sastavna je komponenta staničnih membrana i ključan je za održavanje njene strukture i funkcije te je ujedno i ishodišna molekula za sintezu steroidnih hormona, vitamina D i žučnih kiselina [244]. Kolesterol je hidrofobna molekula i u plazmi se prenosi udružen s apolipoproteinima [243], od kojih LDL ima najveći sadržaj kolesterola [245]. Stoga se porast LDL-a u plazmi povezuje s aterogenezom, koja je prototip upale niskog stupnja [246] kao i s OA-om [247]. Proupalno djeluje ox-LDL, odnosno oksidirani lipidi iz LDL-a [248], dok LDL sam po sebi nije aterogen niti potiče OA [249]. Proizvodi oksidacije kolesterola u LDL-u, glavnoj transportnoj molekuli za prijenos kolesterola u tkiva, su oksisteroli [250]. Mehanizam nastajanja oksisterola i njihov učinak prikazani su na Slici 9. Enzimatski sintetizirani oksisteroli imaju pozitivnu fiziološku ulogu kao signalne molekule

[251]. Suprotno njima, ne-enzimatski sintetizirani oksisteroli, koji nastaju oksidacijskim učinkom molekula ROS-a, imaju 10 do 100 puta veću toksičnu aktivnost od molekule kolesterola [252]. Najzastupljeniji oksisterol u oxLDL čestici je 7- ketokolesterol (7-KC, od eng. 7- Ketocholesterol) [252]. On dominantno nastaje ne-enzimatskom oksidacijom kolesterola molekulama ROS-a na poziciji C7 koja pokazuje najizraženiju reaktivnost za vezanje molekule kisika, a to ujedno 7-KC čini molekularno najstabilnijim tipom oksisterola [253]. Razlikujemo dva oblika molekule 7-KC-a: ne-esterificirana forma ili slobodni 7-KC koji je sastavni dio staničnih membrana i zastupljeniji je u odnosu na esterificirani oblik koji je sastavni dio lipoproteinskih molekula [252].



Slika 8. Mehanizam nastajanja i učinak oksisterola. Oksidacijom molekule LDL-a djelovanjem ROS-a nastaje oxLDL. Oksidacijom kolesterola u oxLDL-u stvaraju se oksisteroli od kojih je najzastupljeniji 7-KC. Ulaskom u stanicu procesom endocitoze, oksisteroli uzrokuju oštećenje staničnih organela i povećavaju sintezu ROS-a koji uzrokuju daljnju oksidaciju LDL-a i kolesterola i daljnje povećanje stvaranje oksisterola. Prilagođeno prema [254]. LDL- Lipoprotein niske gustoće (od eng. Low-Density Lipoprotein); LOX-1- Oksidirani LDL receptor-1 sličan lektinu (od eng. Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1); ox-LDL- Oksidirani lipoprotein niske gustoće (od eng. Oxidized Low-Density Lipoprotein); ROS- Reaktivne vrste kisika (od eng. Reactive Oxygen Species).

Mehanizam toksičnog djelovanja na stanice primarno je uzrokovan djelovanjem slobodnog 7-KC-a. On uzrokuje oštećenje stanične membrane mehanizmom oštećenja kalcijevih kanala odnosno djelujući na povećanje ulaska kalcijevih iona (Ca^{2+}) u stanicu [255]. Istim mehanizmom djeluje i na oštećenje membrane unutarstaničnih organela mitohondrija [256], endoplazmatske mrežice [257], peroksisoma i lizosoma [258] te na taj način dovodi do oštećenja i apoptoze stanica. Unutarstanični mehanizam djelovanja 7-KC-a uključuje i aktivaciju NADPH oksidaze koja potiče sintezu ROS-a koji imaju toksični učinak na metabolizam stanice [259]. 7-KC neposrednim utjecajem na sustav staničnih signalnih puteva negativno utječe i na proces stvaranja unutarstaničnih bjelančevina [252]. Temeljem navedenih utjecaja na stanični metabolizam i razvoj oksidativnog stresa, poznata je uloga 7-KC-a u patogenezi kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroza), bolesti jetre, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, vaskularna demencija), bolesti oka (makularna degeneracija, glaukom, katarakta), bolesti pluća (idiopatska plućna fibroza) i nasljednih genetskih bolesti povezanih s poremećajem metabolizma lipida (Niemann Pickova bolest, nasljedna hiperkolesterolemija) [252].

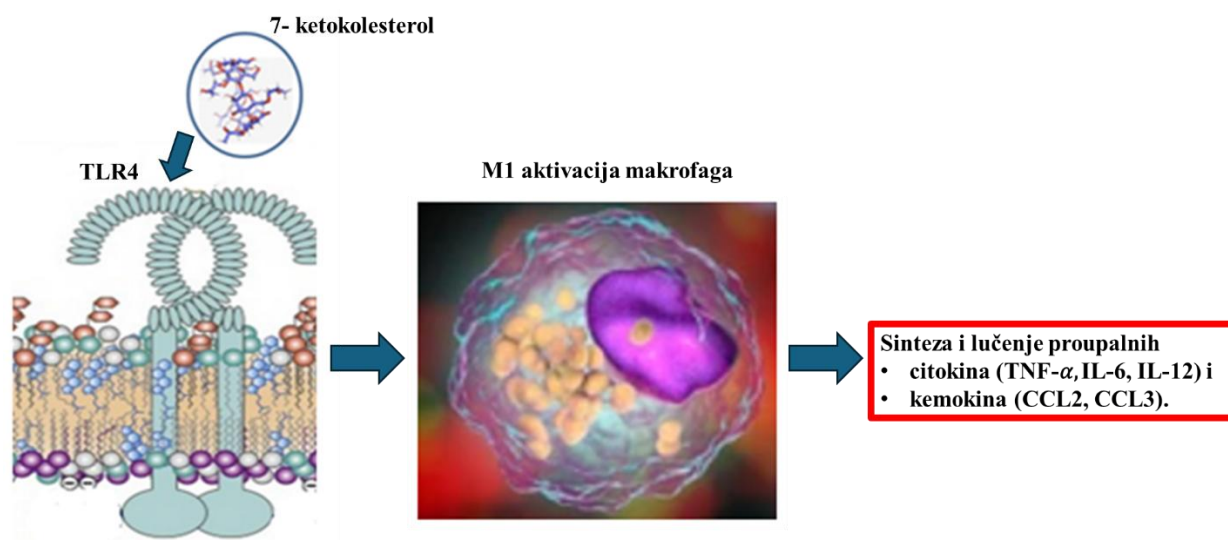
1.3.1. Utjecaj 7-KC-a na polarizaciju makrofaga

Istraživanja mehanizma i utjecaja oksisterola na razvoj ateroskleroze, dokazala su njihovo poticajno djelovanje na lučenje IL-1 β od strane endotelnih stanica krvnih žila, kao i izražaj adhezijskih molekula (VCAM-1, ICAM-1, E-selektin) [260] i IL-8 [261] koji novače monocite i limfocite T na mjesto razvoja aterosklerotskog plaka [262–265]. *In vitro* oksisteroli povećavaju stvaranje i/ili lučenje proupalnih citokina (IL-1 β , IL-8, TNF- α) kao i monocitnog kemoatraktantnog proteina-1 (MCP-1, od eng. Monocyte Chemoattractant Protein-1) iz stanične linije humanih monocita U937 čije su koncentracije u svojoj studiji Prunet i sur. određivali multipleks imunokemijskom metodom temeljenoj na protočnoj citometriji [266]. TLR4 veže 7-KC te posreduje u njegovom utjecaju na stanice poticanjem transkripcijskih čimbenika neovisno o stvaranju ROS-a [267].

Stimulacija M1 makrofaga 7-KC-om povećava izražaj humanog leukocitnog antigena-DR (HLA-DR, od eng. Human Leukocyte Antigen-DR) odnosno njihovu ulogu u prezentaciji antigena i poticanju stečene imunosti, dok sniženje izražaja CD16 ukazuje na smanjenje sposobnosti fagocitoze [268]. 7-KC povećava izražaj CD14 na M2 makrofagima te stvaranje proupalnih citokina TNF- α , IL-6, IL-12 [268] i kemokina CCL2 i CCL3 [269].

To je svojstveno za putove provodnje signala koji konvergiraju na NF- κ B i potiču stanično međudjelovanje i rast [270]. Navedeni put, samo u slučaju nedostatka drugih poticajnih čimbenika može uvesti stanicu u smrt apoptozom [270].

Stoga se smatra da 7-KC potiče klasični put aktivacije makrofaga, kako je ilustrirano na Slici 10.



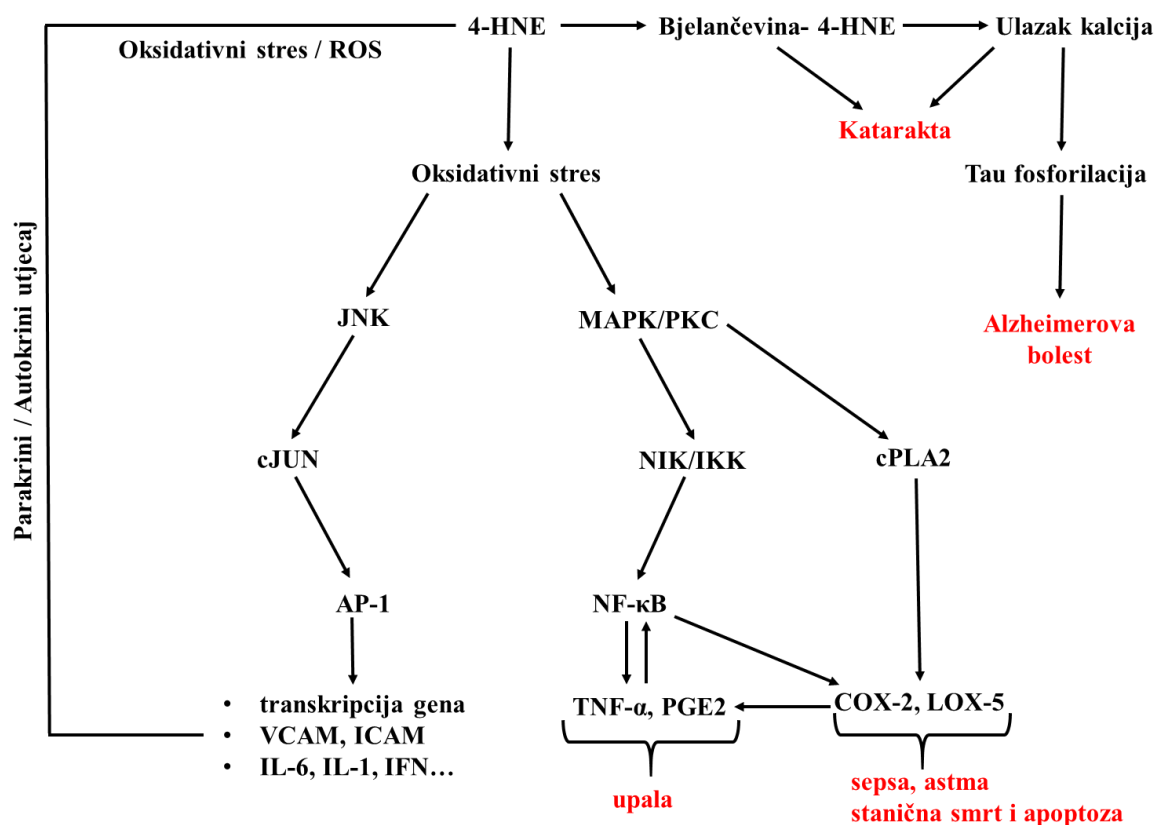
Slika 9. Klasični put aktivacije makrofaga (M1) vezanjem 7-KC-a na TLR4. CCL- CC ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); IL- Interleukin; TLR4- Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like receptor 4); TNF- α - Čimbenik nekroze tumora alfa (od eng. Tumor Necrosis Factor alpha).

Međutim, još nema znanstvenih spoznaja o utjecaju 7-KC-a na makrofage sinovijske membrane u ljudi. Određivanje 7-KC-a u biološkim materijalima je vrlo zahtjevno zbog nestabilnosti molekule u reakciji s kisikom iz zraka i zbog općenito niske koncentracije oksisterola u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima [248]. Stoga se kao mjera oštećenja tkiva oksidiranim lipidima do sada pribjegavalo analizi oxLDL-a [6] ili analizi stabilnijeg proizvoda oksidacije masnih kiselina 4-hidroksinonenala (4-HNE) u tkivima na animalnim modelima [271] i u ljudi [272,273]. U sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om, dokazan je oxLDL, a koncentracija njegovog topljivog receptora LOX-1 u pozitivnom je međuodnosu s radiološkim stupnjem OA-a [6]. U miševa kojima nedostaje lox-1 gen, značajno je smanjena sinovijska hiperplazija i infiltracija limfocitima, te degeneracija hrskavice po izazivanju OA-a na umjetan način [6]. Stoga bi imalo smisla istraživati *in vitro* vezanje i učinak proizvoda lipidne oksidacije (7-KC) na fenotip i funkciju sinovijskih makrofaga izdvojenih iz zgloba s OA-om i njihovo međudjelovanje s lokalnim limfocitima T i stanicama NK te istraživati moguće odražavanje lokalnih imunoloških zbivanja iz zgloba s OA-om na sustavni imunološki odgovor.

1.4. 4-HNE

Oksidativni stres i sinteza ROS-a u stanicama uzrokuje ne-enzimatsku oksidaciju masnih kiselina u sastavu esterificiranog kolesterola u jezgri LDL čestica [274] i staničnih membrana među kojima su najosjetljivije višestruko nezasićene omega-6 masne kiseline zbog dvostrukih veza u njihovoj strukturi [248].

4-HNE je α,β -nezasićeni hidroksialkenal koji nastaje kao proizvod oksidacije višestruko nezasićenih omega-6 masnih kiselina, od kojih se linoleinska i arahidonska kiselina nalaze u sastavu esterificiranog kolesterola, djelovanjem ROS-a [270]. U fiziološkim koncentracijama ($< 2 \mu\text{M}$) 4-HNE ima ulogu u prijenosu unutarstaničnih signala koji uključuju signalne putove: p38 protein kinaza aktivirana mitogenom (p38 MAPK, od eng. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase), kinaza 1 i 2 nadzirane izvanstaničnim signalom (ERK1/2, od eng. Extracellular Signal-Related Kinases 1 and 2), c-Jun N-terminalna kinaza 1 i 2 (JNK1/2, od eng. c-Jun N-terminal Kinase 1 and 2) i NF- κ B [275]. Metabolička razgradnja 4-HNE unutar stanice, odnosno mehanizmi zaštite stanice od prekomjernog nakupljanja i toksičnog djelovanja 4-HNE, uključuju enzimatsku aktivnost alkohol dehidrogenaze, aldehid dehidrogenaze i glutation S-transferaze uz NAD^+/NADH kao kofaktore [276,277]. U slučajevima zasićenja enzimatskih kapaciteta za razgradnju i/ili nedostatak kofaktora, povećana koncentracija 4-HNE reaktivnim djelovanjem uzrokuje oštećenje staničnih bjelančevina što dovodi do poremećaja biokemijskih procesa u stanici [275]. Slobodan oblik 4-HNE-a utjecajem na stanične signalne putove, promiče stvaranje kataboličkih i proupalnih posrednika [270]. Ti patogenetski mehanizmi definiraju utjecaj 4-HNE-a u razvoju niza bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, tumori, makularna degeneracija, ateroskleroza, upalna bolesti crijeva [275] i OA [277] (Slika 11.).

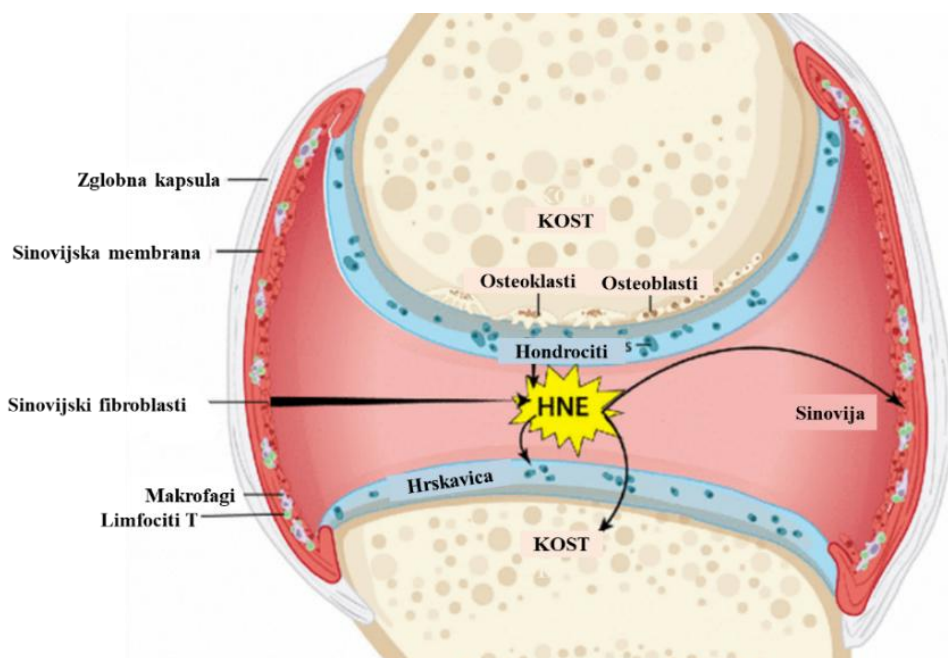


Slika 11. Mehanizam djelovanja 4- hidroksinonenala (4-HNE) na unutarstanični prijenos signala i uloga u razvoju bolesti. Visoke unutarstanične koncentracije 4-HNE (10-60 μM) uzrokuju genetska oštećenja odnosno fragmentaciju mitohondrijske i stanične DNA. Izrazito visoke koncentracije (>100 μM) inhibiraju proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, aktivnost glikolitičkih enzima i sintezu staničnih proteina. Preuzeto i prilagođeno prema [270]. COX-2- Ciklooksigenaza-2 (od eng. Cyclooxygenase-2); ICAM- Unutarstanična adhezijska molekula (od eng. Intercellular Adhesion Molecule); IFN- Interferon; IL- Interleukin; LOX-5- Oksidirani LDL receptor-5 sličan lektinu (od eng. Lectin-like Oxidized LDL Receptor- 5); NF-κB- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); PGE2- Prostaglandin E2; ROS- Reaktivne vrste kisika (od eng. Reactive Oxygen Species); TNF-α- Čimbenik nekroze tumora alfa (od eng. Tumor Necrosis Factor alpha); VCAM- Vaskularna stanična adhezijska molekula (od eng. Vascular Cell Adhesion Molecule).

1.4.1. Uloga 4-HNE-a u patogenezi OA-a

Glavni mehanizmi utjecaja 4-HNE-a na patogenezu OA-a su poticanje kataboličkih i upalnih procesa, inhibicija anaboličkih signalnih puteva i smanjenje mineralizacije koštanog tkiva [275] (Slika 12). Katabolički utjecaj 4-HNE-a na tkivo hrskavice zgloba očituje se smanjenjem stvaranja kolagena tipa II i povećanjem izražaja i aktivnosti MMP-2, MMP-9 i MMP-13. 4-HNE također potiče aktivnost enzima COX-2 te posljedično povećava stvaranje proupalne molekule prostaglandina E2. Osim u slobodnom obliku, 4-HNE se udružuje s kolagenom tipa II i pojačava upalni proces te katalitičku aktivnost MMP-13 što dovodi do napredovanja OA-a [278]. Pojačana aktivnost osteoblasta djelovanjem 4-HNE-a u OA-u dokazana je povećanim

izražajem osteokalcina i kolagena tipa I te smanjenim izražajem koštane alkalne fosfataze kao biljega njihove metaboličke aktivnosti [279]. 4-HNE povećava izražaj COX-2 i potiče p38 MAPK signalni put važan u nadzoru sinteze proupalnih citokina [279]. COX-2 i poticanje proupalnih signalnih puteva (NF- κ B i p38 MAPK) utjecajem 4-HNE-a u sinovijskoj membrani pojačava stvaranje citokina IL-1, IL-6 i TNF- α [279]. Hondrociti su vrlo osjetljivi na učinak 4-HNE-a i lako ulaze u apoptozu posredovanu njegovim djelovanjem [280]. Apoptoza hondrocita 4-HNE-om temelji se na smanjenju izražaja anti-apoptotičkog proteina Bcl-2 (od eng. B-cell lymphoma 2) odnosno povećanju pro-apoptotičkog proteina Bax (od eng. BCL2 associated X protein) i inhibiciji unosa glukoze u stanicu čime je onemogućena njena glavna funkcija metaboličkog izvora energije za normalno održavanje funkcije stanice [280]. Također, 4-HNE uzrokuje oštećenje mitohondrija hondrocita što dovodi do smanjenja njihove funkciju kao posljedice razvoja oksidativnog stresa odnosno povećanja proizvodnje ROS-a, razvoja upale i smanjenja proizvodnje kolagena i proteoglikana čime se narušava struktura i funkcija zglobne hrskavice [281].



Slika 12. Učinak 4-hidroksinonenala (4-HNE) na zglobne strukture u patogenezi osteoartritisa. Preuzeto i prilagođeno prema [277].

2. CILJEVI

2.1. Hipoteza

OA je bolest kronično progresivnog tijeka potaknuta mehaničkim oštećenjima i metaboličkim čimbenicima, koji se isprepliću u svojim patogenetskim putevima [6]. Hondrociti u zglobu s OA-om imaju izmijenjen metabolizam koji ovisi o glikolizi i obilno izražavaju laktat dehidrogenazu A, koja potiče stvaranje ROS-a [282]. ROS vrlo učinkovito oksidira LDL molekule, koje izražavaju najveći sadržaj kolesterola među lipoproteinima [283]. Oksidacijom kolesterola nastaje skupina toksičnih i raznovrsnih oksisterola [249], od kojih se 7-KC smatra najtoksičnijim biljegom oksidacije kolesterola i biljegom daljnjeg oksidativnog stresa *in vivo*, zbog brzog poticanja stvaranja ROS-a u stanici [284].

Hipoteza ovog doktorskog rada je da 7-KC ostvaruje svoje učinke u sinovijском tkivu kao ligand koji se veže za TLR4 na sinovijским CD68⁺ makrofagima, uzrokuje razvoj M1 polarizacije i potiče blagu lokalnu proupalnu reakciju u međudjelovanju s limfocitima T i stanicama NK, koja se odražava na lokalnoj i sustavnoj razini.

2.2. Ciljevi

Kako bi provjerili hipotezu osmislili smo okosnicu istraživanja u vidu sljedećih ciljeva:

1. Odrediti raspodjelu, fenotip, polarizaciju CD68⁺ makrofaga sinovijske membrane zrelog OA *ex vivo* te istražiti postojanje elemenata oksidacijskog stresa u sinovijskoj membrani i CD68⁺ makrofagima bolesnika s kasnim OA koljena.
2. Analizirati utjecaj 7-KC-a na fenotip, polarizaciju i funkciju CD68⁺ makrofaga u suspenziji sinovijskih mononuklearnih stanica zrelog OA koljena *in vitro*.
3. Procijeniti apoptotički potencijal posredovan GNLY-om u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA koljena *in vitro* u odnosu na kontrolu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bolesnici i etički aspekt istraživanja

U ovo istraživanje bili su uključeni bolesnici s ranim i kasnim OA-om koljena kojima je bolest dijagnosticirana prema kriterijima Američkog udruženja za reumatologiju iz 1986. godine [285]. U skupinu ranog OA-a koljena bilo je uključeno 40 žena (medijan godina 64; raspon 43-75) koje nisu bile ni na kakvoj terapiji i 40 kontrolnih, zdravih ispitanica odgovarajuće dobi (medijan godina 62; raspon 43-73). Ispitanice uključene u ovo prospektivno istraživanje obavile su internistički preventivni pregled, uključujući i laboratorijsko testiranje, u Specijalnoj bolnici za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma Thallassotherapia Opatija, Opatija, Hrvatska u periodu od 1. 4. 2018. do 15. 12. 2020. Sve ispitanice donirale su uzorke periferne venske krvi u svrhu istraživanja i dozvolile da se njihovi medicinski podaci koriste u istraživačke svrhe i objave u znanstvenim časopisima potpisivanjem Suglasnosti za sudjelovanjem u znanstvenom istraživanju.

U skupinu kasnog OA-a koljena bilo je uključeno 50 bolesnika na terapiji analgeticima (paracetamol/tramadol) kojima je uzorkovana sinovijska membrana tijekom rutinske operacije totalne endoproteze koljena (aloartroplastika koljena) u Klinici za ortopediju Lovran, Lovran, Hrvatska. Svi bolesnici uključeni u istraživanje su prije izvođenja operacije dali svoj pristanak za uzrokovanje sinovijske membrane, njeno korištenje u istraživačke svrhe i objave u znanstvenim časopisima potpisivanjem Suglasnosti za sudjelovanjem u znanstvenom istraživanju.

Kriteriji za isključenje bolesnika s OA-om i kontrolne skupine zdravih iz istraživanja bili su: terapija glukokortikoidima i nesteroidnim antireumatskim lijekovima, sistemske imunološke bolesti, imunodeficijencije, srčano zatajivanje III i IV stupnja prema razradbi New York Heart Association [286], zatajenje bubrega IV i V stupnja [287], zatajenje jetre [288], poremećaji funkcije koštane srži i/ili limfnog sustava, žene reproduktivne dobi, neregulirana arterijska hipertenzija (krvni tlak $>160/100$ mmHg), neregulirana šećerna bolest (glukoza u plazmi >11 mmol/l natašte) i zloćudna bolest u trajanju kraćem od 5 godina.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta/financijske potpore Sveučilišta u Rijeci pod naslovom “Aktivacija makrofaga u bolesnika s osteoartritisom”, br. Uniri-biomed-18-110; voditeljice prof. dr. sc. Gordane Laškarin u trajanju od 7. 3. 2019. do 31. 1. 2024. uz odobrenje Etičkih povjerenstva “Thalassotherapija-Opatija” (br: 01-000-00-115/2-2021) sa Sjednice održane 10. 2. 2021. godine i Klinike za ortopediju Lovran (br: 02-67/2021) sa Sjednice održane 12. veljače 2021. godine. Svi eksperimentalni postupci provedeni su u skladu s „Etičkim načelima za medicinska istraživanja koja uključuju ljude“ navedenima u Helsinškoj deklaraciji

[289]. Također, istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 100/18, 125/19), Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04, 37/08) i sukladno Općoj uredbi 2016/679 Europskog Parlamenta i Vijeća Europe od 27. travnja 2016. o zaštiti podataka (GDPR, od eng. General data protection regulation).

3.2. Određivanje parametara u kliničkom laboratoriju

3.2.1. Uzorkovanje venske krvi u bolesnika s ranim OA-om koljena i sinovijskog tkiva u bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Uzorkovanje venske krvi bolesnika s ranim OA-om koljena i kontrolnim, zdravim ispitanicima, učinjen je standardnim postupkom prema nacionalnim preporukama [290]. Uzorci pune venske krvi za dobivanje seruma uzrokovani su u epruvete bez antikoagulansa (Grainer Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija), ostavljeni na sobnoj temperaturi 22-25 °C kroz 30 minuta kako bi došlo do spontane koagulacije i zatim centrifugirani 10 minuta na 1000 x g na +4 °C. Uzorci seruma korišteni su za analizu rutinskih biokemijskih pretraga (učinjeni istog dana unutar 4 sata od uzorkovanja) i za određivanje koncentracije GNLY-a . Uzorci pune venske krvi uzeti u epruvete s antikoagulansom etilediamintetraoctenom kiselinom (EDTA, od eng. Ethylenediaminetetraacetic Acid) korišteni su za analizu rutinskih hematoloških parametara odnosno određivanja krvne slike (učinjeni unutar 2 sata od uzorkovanja) i za izdvajanje mononuklearnih stanica periferne krvi. Izdvojene mononuklearne stanice korištene su za analizu fenotipa subpopulacija limfocita periferne krvi, izražaj GNLY-a i GNLY-om posredovanu citotoksičnost stanica NK periferne krvi prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji i unutarstanični izražaj IFN- γ i IL-4 metodom protočne citometrije.

Sinovijska membrana u bolesnika s kasnim OA-om koljena uzorkovana je tijekom operacije ugradnje endoproteze koljena. Komadići sinovijske membrane veličine do 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 5 mm odmah su uronjeni u 4% otopinu paraformaldehida (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD) i dostavljeni istog dana u laboratorij Zavoda za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci gdje je učinjeno uklapanje tkiva u parafin.

3.2.2. Određivanje rutinskih biokemijskih i hematoloških analiza u bolesnika s ranim OA-om koljena

Uzorci seruma bolesnika s ranim OA koljena i zdravim ispitanicima korišteni za određivanje rutinskih biokemijskih analiza: visoko osjetljivog C- reaktivnog proteina (hs-CRP, od eng. high-sensitivity C-reactive protein), alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), gama-glutamil transferaze (GGT), urata, kreatinina, glukoze i LDL-a. Analize su učinjene na automatiziranom biokemijskom analizatoru Dimension Xpand (Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, SAD). Analiza hematoloških pretraga: eritrocita, hemoglobina, leukocita i trombocita, učinjena je na automatiziranom hematološkom brojaču Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

3.2.3. Određivanje koncentracije GNLY-a u serumu bolesnika s ranim OA-om koljena

Koncentracija GNLY-a u serumu analizirana je LEGEND MAX™ Human Granulysin (BioLegend, San Diego, CA, Sjedinjene Američke Države) enzimatskom imunokemijskom metodom (ELISA, od eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Alikvoti seruma (1 ml) bolesnika s ranim OA-om koljena i zdravih ispitanika pohranjeni su u plastične mikroepruvete Cryo.S (2 ml) (Grainer Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija) na -80 °C do izvođenja analize. Određivanje GNLY-a učinjeno je prema uputama proizvođača uz očitavanje apsorbancije i izračun koncentracije na čitaču mikrotitarskih pločica MRX Revelation (DYNEX® Technologies, Pewaukee, SAD).

3.3. Metode obilježavanja tkivnih rezova uklopljenih u parafin

3.3.1. Postupak uklapanja tkiva sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om u parafin

Uzorci sinovijske membrane koljenog zgloba bolesnika sa zrelim OA-om koljena uronjeni su u 4% otopinu paraformaldehida (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD) za fiksaciju i očuvanje staničnih struktura i molekula tkiva te istoga dana dostavljeni na Zavod za opću patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Nakon 24 satne inkubacije u 4% otopini paraformaldehida na temperaturi 20-25 °C uzorci tkiva stavljeni su u plastične kasete (Tissue-Tek Uni-Cassette, Sakura, Nizozemska) i zatim u automatizirani tkivni procesor (Tissue-Tek VIP 5, Sakura, Nizozemska) za obradu tkiva odnosno za dehidraciju, bistrenje i prožimanje tkiva parafinom. Dehidracija, odnosno uklanjanje vode iz tkiva provodila

se postupnim izlaganjem tkiva 70%, 96% i 100%-om etanolu (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Postupak bistrenja, odnosno zamjena alkohola sredstvom u kojem je parafin topljiv, provodila se primjenom zamjenskog sredstva za ksilen (Xylene Substitute Shandon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Tako obrađeno tkivo bilo je pripremljeno za prožimanje parafinom tališta 55-58 °C, a izvodilo se na temperaturi od 60 °C. Uklapanje tkiva u parafinsku kocku je izvedeno na tkivnom procesoru/uklapaču (Tissue-Tek VIP 5, Sakura, Nizozemska). Na toploj ploči uklapača uzorak sinovijskog tkiva se izvadio iz kazete i stavio na dno metalnog kalupa napunjenog otopljenim parafinom, a na vrh se postavila plastična kazeta (Tissue-Tek Uni-Cassette, Sakura, Nizozemska) s oznakom tkiva. Pripremljene parafinske kocke su hladene na hladnoj ploči uklapača, a zatim na -20 °C. Po uklanjanju metalnog kalupa, kocke su se učvrstile na držač kliznog mikrotoma Kriomikrotom Leica CM 1850 (Leica Biosystems, Nussloch, Njemačka) kojim su narezani tkivni rezovi debljine 3 µm. Rezovi su pažljivo bili prebačeni kistom s noža mikrotoma u vodenu kupelj zagrijanu na 45-50 °C kako bi se izravnali nabori nastali rezanjem. Iz kupelji su se rezovi kistom postavljali na predmetna stakalca (DakoREALTM, Glostrup, Danska). Tkivni rezovi na stakalcima su se sušili na toploj ploči (60-70 °C, 15-20 minuta) te su se zatim pohranili na +4 °C do obilježavanja.

3.3.2. Priprema parafinskih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena za obilježavanje

Priprema parafinskih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena za obilježavanje vršila se postupkom deparafinizacije i rehidracije te otkrivanja antigena od interesa.

Tkivni rezovi sinovijske membrane na predmetnim staklima su se postavili na plastične nosače i uranjali u staklene kivete ispunjene otopinom ksilena (Tissue Clear, Sakura Fintek Europe, Zoeterwoude, Nizozemska) tri puta po 5 minuta kako bi se uklonio parafin. Zatim su tkivni rezovi uranjani dva puta u 100%-tni etanol kako bi se uklonio ksilen, a zatim postepeno rehidrirali uranjanjem u etanol koncentracije 96% i 70% (svaki po 5 minuta). Tkivni rezovi su isprani u tris puferiziranoj fiziološkoj otopini (TBS, od eng. Tris buffer saline) tri puta po 5 minuta, a zatim su se uronili u plastičnu kivetu s citratnim puferom pH 6.0 i stavili u mikrovalnu pećnicu uz parametre 70 W tijekom 7 minuta kako bi se postiglo vrenje. Termička obrada tkiva nastavljena je u mikrovalnoj pećnici tri puta po 5 minuta na 70W uz dolijevanje isparene redestilirane vode između pojedinih ciklusa. Nakon sva tri ciklusa tkivni rezovi su se hladili spontano 60-90 minuta do postizanja sobne temperature. Tako pripremljeni tkivni rezovi korišteni su za jednostruko obilježavanje antigena imunohistokemijskom metodom ili

dvostruko obilježavanje antigena imunofluorescencijom uz očitavanje svjetlosnim odnosno fluorescentnim mikroskopom.

3.3.3. Indirektna jednostruka imunohistokemija

Indirektnom jednostrukom imunohistokemijom obilježeni su antigeni CD68, CD3, CD56, Hsp70, CCL2, CCL3, iNOS, arginaza-1, APAF-1, NF- κ B, LXR i 4-HNE metodom imunoperoksidaze, uz vizualizaciju specifičnog veznog mjesta protutijela promjenom boje kromogena 3,3-diaminobenzidina (DAB). To je učinjeno korištenjem kita „EnVision G/2 Doublestain System Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) (Dako, Glostrup, Danska) po priloženim uputama proizvođača i prema principima ranije opisane metode [291]. Obilježavanje je započelo inkubacijom pripremljenih parafinskih rezova s otopinom „Dual endogenous block“ iz navedenog kita tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi s ciljem uklanjanja nespecifičnog vezanja i uklanjanja aktivnosti endogene vodikove peroksidaze. Preparati su zatim isprani u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS, od eng. Phosphate Buffered Saline) Tween20 tri puta tijekom 5 minuta te inkubirani preko noći na +4 °C s protutijelima mišjeg, zečjeg ili kozjeg porijekla usmjerenima prema CD68, CD3, CD56, Hsp70, CCL2, CCL3, iNOS, arginaza-1, APAF-1, NF- κ B, LXR i 4-HNE te kontrolnim protutijelima istog razreda/podrazreda irelevantne specifičnosti. Opisi i radne koncentracije protutijela navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Protutijela korištena za imunohistokemijsko obilježavanje tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Specifičnost	Kataloški broj [Klon]	Proizvođač	Razrjeđenje
Primarna protutijela			
CD68	199000 [KP1+C68/684]; mišja IgG1	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CD3	21703 [SP7]; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	pripremljeno
CD56	20446; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Hsp70	2787 [5A5]; mišja IgG1	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CCL-2	MAB2791 [23002]; mišja IgG2b	R&D Systems, Minneapolis, SAD	1:20
CCL-3	PA5-32496; zečja IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:50
iNOS	115819 [SP126]; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100

Arginaza-1	212522 [ARG1/1125]; mišja IgG3	Abcam, Cambridge, UK	1:25
APAF-1	HPA031373; zečja IgG	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka	1:100
NF- κ B p65	16502; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
LXR α +b	24362; kozja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:50
4-HNE	46545; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Kontrole istog razreda/podrazreda			
mišja IgG1	554121 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1:100
mišja IgG2b	557351 [MPC-11]	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:100
mišja IgG3	14-4742-82 [B10]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:100
zečja IgG	37415 [IgG]	Abcam, Cambridge, UK	1:200
kozja IgG	37388 [IgG]	Abcam, Cambridge, UK	1:100

APAF-1- Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1 (od engl. *Apoptotic Protease Activating Factor - 1*); *CD*- Klaster diferencijacije (od engl. *Cluster of Differentiation*); *CCL*- CC kemokinski ligand (od eng. *C-C Motif Chemokine Ligand*); *Hsp70*- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. *Heat Shock Protein 70*); *Ig*- Imunoglobulin; *iNOS*- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od engl. *inducible Nitric Oxide Synthase*); *LXR*- Jetreni X receptor (od eng. *Liver X Receptor*); *NF- κ B*- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. *Nuclear Factor kappa B*); *4-HNE*- 4-hidroksinonenal.

Nakon inkubacije, primarna protutijela su isprana uranjanjem stalka sa stakalcima tkivnih rezova u plastičnu kivetu s otopinom PBS Tween20 tri puta tijekom 5 minuta. Tkivni rezovi su zatim na sobnoj temperaturi izloženi 10 minuta djelovanju sekundarnog protutijela odnosno polimernim molekulama koje su obilježene peroksidazom [Polymer-horse redish peroxidase (HRP)] i konjugirani s kozjim protu-mišjim i kozjim protu-zečjim protutijelima iz navedenog kita i magarećim protu-kozjim protutijelima. Istekom inkubacije tkivni rezovi su dobro isprani otopinom PBS Tween20 tri puta tijekom 5 minuta. Nakon ispiranja na svaki tkivni rez na stakalcu nanoseno je 100 μ l razrijeđenog DAB kromogena (20 μ l DAB + 1000 μ l Substrate buffer otopine iz kita) te se reakcija kontrolirala pod kontrolom oka i svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japan) najdulje 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na mjestu specifičnog vezanja primarnog protutijela na antigen, kao rezultat enzimatske razgradnje DAB kromogrena peroksidazom, došlo je do razvoja smeđe boje. Preparati su zatim isprani u redestiliranoj vodi tri puta tijekom 5 minuta. Za obojenje jezgra korištena je profiltrirana otopina hematoksilina (Solution Gill No.3, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD) u koju su uronjeni nosači sa stakalcima tkivnih rezova tijekom 2 minute na sobnoj temperaturi. Preparati

su zatim isprani u redestiliranoj vodi s dodatkom dvije kapi 2% sumporovodične kiseline zbog uklanjanja mogućih precipitata hematoksilina tijekom 5 minuta, a isti postupak bez dodatka sumporovodične kiseline ponovljen je još jednom. Daljnje ispiranje učinjeno je u tekućoj vodi tijekom 30 minuta. Po završetku postupka preparati su uklopljeni u Aquatex medij za uklapanje (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka).

3.3.4. Dvostruka imunofluorescencija parafinskih rezova

Dvostruka imunofluorescencija je učinjena na parafinskim rezovima uzoraka sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena nakon postupka pripreme za obilježavanje, kako je gore opisano i prema principu ranije opisane metode [292]. Kako bi se smanjilo nespecifično vezanje, tkivni preparati su inkubirani s 1% goveđim serumskim albuminom (BSA, od eng. Bovine Serum bumin) (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD) u PBS-u tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi nakon kojeg su dodane kombinacije primarnih protutijela koji su inkubirani preko noći na +4° C. Odgovarajući podrazredi imunoglobulina mišjeg IgG1, IgG2a, IgG2b ili IgG3 u kombinaciji sa zečjim IgG, kombinacija zečjeg IgG i mišjeg IgG1 i kombinacija zečjeg IgG1 i kozjeg IgG irelevantnih specifičnosti su korišteni kao negativne kontrole. Opis korištenih protutijela za obilježavanje imunofluorescencijom prikazana su u Tablici 2., a sve kombinacije primarnih protutijela navedene su u Tablici 3.

Tablica 2. Protutijela korištena za imunofluorescenciju tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Specifičnost	Kataloški broj [Klon]	Proizvođač	Razrjeđenje
Primarna protutijela			
CD68	199000 [KP1+C68/684]; mišja IgG1	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CD68	192847 [SP251]; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CD3	21703 [SP7]; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	pripremljeno
CD56	204446; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CD91-PE	550497 [A2MR- α 2]; mišja IgG1	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:5
TLR4	22048 [76B357.1]; mišja IgG2b	Abcam, Cambridge, UK	1:200
CD14	550376 [M5E2]; mišja IgG2a	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:50
GNLY	D-185-3 [RC8]; mišja IgG1	MBL International, Woburn, SAD	1:100

iNOS	115819 [SP126]; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Arginaza-1	212522 [ARG1/1125]; mišja IgG3	Abcam, Cambridge, UK	1:25
APAF-1	HPA031373; zečja IgG	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka	1:100
NF-κB p65	16502; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
LXRα+β	24362; kozja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:50
4-HNE	46545; zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Perforin	556434 [dG9]; mišja IgG2b	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:100
Kontrole istog razreda/podrazreda			
mišja IgG1	554121 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1:100
mišja IgG2a	14-4724-82 [eBM2a]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:200
mišja IgG2b	557351 [MPC-11]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1:100
mišja IgG3	14-4742-82 [B10]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:100
zečja IgG	37415 [IgG]	Abcam, Cambridge, UK	1:200
kozja IgG	37388 [IgG]	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Sekundarna protutijela			
protu-mišja IgG AF 488	A-11001 [kozja IgG]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:300
protu-zečja IgG AF 594	A-11037 [kozja IgG]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:500
protu-mišja IgG AF 594	A 21203 [magareća IgG]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:500
protu-zečja IgG AF488	A-21206 [magareća IgG]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:500
protu-kozja IgG AF488	A-32814 [magareća IgG]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:300

AF- od eng. Alexa Fluor; APAF-1- Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1 (od eng. Apoptotic Protease Activating Factor-1); CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); Ig- Imunoglobulin; GNLY- Granulizin; iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od engl. inducible Nitric Oxide Synthase); LXR- Jetreni X receptor (od eng. Liver X Receptor); NF-κB- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa B); PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); TLR4- Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4); 4-HNE- 4-hidroksinonenal.

Tablica 3. Kombinacija protutijela korištenih za imunofluorescenciju tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Specifičnost	Crvena fluorescencija	Zelena fluorescencija
Primarna protutijela		
Kombinacija 1	protu-CD68, mišja IgG1	protu-CD3, zečja IgG
Kombinacija 2	protu-CD91-PE, mišja IgG1	protu-CD68, zečja IgG
Kombinacija 3	protu-TLR4, mišja IgG2b	protu-CD68, zečja IgG
Kombinacija 4	protu-CD14, mišja IgG2a	protu-CD68, zečja IgG
Kombinacija 5	protu-GNLY, mišja IgG1	protu-CD68, zečja IgG
Kombinacija 6	protu-arginaza-1, mišja IgG3	protu-CD68, zečja
Kombinacija 7	protu-CD68, mišja IgG1	protu-4-HNE, zečja
Kombinacija 8	protu-GNLY, mišja IgG1	protu-CD56, zečja
Kombinacija 9	protu-perforin, mišja IgG2b	protu-CD56, zečja
Kombinacija 10	mišja IgG1	zečja IgG
Kombinacija 11	mišja IgG2a	zečja IgG
Kombinacija 12	mišja IgG2b	zečja IgG
Kombinacija 13	mišja IgG3	zečja IgG
Vizualizacija sekundarnim protutijelima		
Kombinacija 1-13	magareća protu-mišja IgG, AF 594	magareća protu-zečja IgG, AF 488
Primarna protutijela		
Kombinacija 14	protu-CD56, zečja IgG	protu-CD68, mišja IgG1
Kombinacija 15	protu-iNOS, zečja IgG	protu-CD68, mišja IgG1
Kombinacija 16	protu-APAF-1, zečja IgG	protu-CD68, mišja IgG1
Kombinacija 17	protu-NF-κB, zečja IgG	protu-CD68, mišja IgG1
Kombinacija 18	zečja IgG	mišja IgG1
Vizualizacija sekundarnim protutijelima		
Kombinacija 14-18	kozja protu-zečja IgG, AF 594	kozja protu-mišja IgG, AF 488

Primarna protutijela		
Kombinacija 19	protu-CD68, zečja IgG1	protu-LXR IgG, kozja IgG
Kombinacija 20	zečja IgG1	kozja IgG
Vizualizacija sekundarnim protutijelima		
Kombinacija 19-20	kozja protu-zečja IgG, AF 594	magareća protu-kozja IgG, AF 488

AF- od eng. *Alexa Fluor*; *APAF-1*- Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1 (od eng. *Apoptotic Protease Activating Factor -1*); *CD* - Klaster diferencijacije (od engl. *Cluster of Differentiation*); *CCL* – CC kemokinski ligand (od eng. *C-C Motif Chemokine Ligand*); *Ig*- Imunoglobulin; *GNLY*- Granulizin (od eng. *Granulysin*); *iNOS*- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. *inducible Nitric Oxide Synthase*); *LXR*- Jetreni X receptor (od eng. *Liver X Receptor*); *NF-κB* - Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. *Nuclear Factor kappa B*); *PE*- Fikoeritrin (od eng. *Phycoerythrin*); *TLR4*- Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. *Toll-like Receptor 4*); *4-HNE*- 4-hidroksinonenal.

Nakon završetka inkubacije s primarnim protutijelima, tkivni rezovi su isprani u TBS-u i dodana su sekundarna protutijela na stakalca u kombinacijama koje su navedene u Tablici 3. Za vizualizaciju jezgri korištena je fluorescentna boja 4,6-diamidin-2-fenilindol (DAPI, od eng. 4,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka) koja je razrijeđena 1:1000 u PBS-u kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca tkivnih rezova isprana su tri puta s PBS-om i uklopljena u Mowiol medij za uklapanje (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD).

3.3.5. Analiza imunohistokemijskih i imunofluorescentnih obilježavanja

Broj CD68⁺ stanica u tkivu sinovijske membrane zrelog OA-a koljena nakon imunohistokemijskog obilježavanja CD68 antigena određen je Olympus BX51 svjetlosnim mikroskopom i Olympus DP71 kamerom (Olympus, Tokio, Japan) od tri neovisna istraživača bez statistički značajne razlike u broju izbrojanih stanica ($P = 1,0$). Povećanje slika učinjeno je Olympus UPlan FI objektivima (svi Olympus, Tokio, Japan) 409/0.75, ∞ /0.17, $\times 400$ (srednje povećanje). CD68⁺ stanice izbrojane su pod srednjem povećanju mikroskopa i zabilježen je njihov broj. U jednom uzorku CD68⁺ stanice su izbrojene na 5 lokacija s najvećim brojem pozitivnih stanica tzv. „vruće točke“ (od eng. “hot spots”). Za daljnju analizu korištena je aritmetička sredina. Obrada snimljenih mikrofotografija učinjena je programom za obradu slika Cell[^]A version 3.0 (Olympus, Tokio, Japan).

Mikrofotografije imunofluorescentnih obilježavanja snimljene su Olympus DP71 kamerom Olympus UPlan Apo objektivima 10 $\times$ /0.30 ($\times 100$), 40 $\times$ /0.75 ($\times 400$) i/ili 100 $\times$ /1.35 korištenjem

imerzijskog ulja ($\times 1000$) na imunofluorecentnom mikroskopu Olympus BX51 (svi Olympus, Tokio, Japan). Obrada snimljenih mikrofotografija i preklapanje slika crvene i zelene fluorescencije u dvostruko obilježenim tkivnim preparatima učinjeno je u programom za obradu slika Cell^A version 3.0 (Olympus, Tokio, Japan).

3.4. Izdvajanje stanica iz tkiva

3.4.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena

Mononuklearne stanice periferne krvi su izolirane iz uzorka pune krvi bolesnika s ranim OA-om koljena centrifugiranjem ($600 \times g$, 20 minuta bez kočnice na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) na gradijentu gustoće (Lymphoprep; Axis Shield, Oslo, Norveška) u plastičnoj kušalici s koničnim dnom (50 ml, Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska). Prsten mononuklearnih stanica periferne krvi pokupljen je pomoću plastične sterilne Pasteurove pipete (Copan Innovations, Brescia, Italija). Stanice su isprane ($400 \times g$, 10 minuta s kočnicom, na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) u RPMI-1640 mediju (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), a zatim resuspendirane u RPMI mediju za kulturu tkiva [RPMI 1640, L-glutamin (2 mM), penicilin (1×10^5 U/l), streptomycin sulfat (0,05 g/l) i 10% goveđi fetalni serum (FBS, od eng. Fetal Bovine Serum) (Gibco FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) i izbrojene u Neubauerovoj komorici (Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Njemačka) svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japan). Vijabilnost izdvojenih mononuklearnih stanica periferne krvi iznosila je više od 98%, a određivana je rutinski s tripanskim modrilom (Serva, Heiderberg, Njemačka) pod svjetlosnim mikroskopom u Neubauerovoj komorici i provjerena bojenjem s propidijevim jodidom (PI) (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ / 1×10^6 stanica; 5 minuta na $22\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$; na FACSCalibur protočnom citometru i analizirana programom WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, San Diego, SAD).

3.4.2. Izdvajanje pročišćenih stanica NK iz periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena

Populacija limfocita periferne krvi dobivena je iz neadherentne frakcije mononuklearnih stanica nakon 45 minuta inkubacije u sterilnim Petrijevim zdjelicama ($60 \times 15\text{ mm}$; Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska). Stanice NK su pročišćene negativnom magnetskom separacijom stanica korištenjem NK Cell Isolation Kit-a (kat. br. 130-092-657; Miltenyi Biotec

GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka). NK Cell Biotin-Antibody Coctail (10 μ l) iz navedenog kita i 40 μ l hladnog i filtriranog FACS pufera dodani su u 1×10^7 neadherentnih stanica periferne krvi uz temeljito i pažljivo miješanje 100 puta kako ne bi došlo do stvaranja mjehurića zraka i nakon toga su inkubirane 10 minuta na +4 °C. Zatim je dodana mješavina 30 μ l FACS pufera i 20 μ l NK Cell MicroBead Coctail na 1×10^7 stanica i uzorak je inkubiran 15 minuta na +4 °C. Suspenzija stanica je isprana (300 $\times$ g, 10 minuta na +4 °C), a nadtalog je uklonjen korištenjem sterilne Pasteurove pipete (Kartell, Naviglio, Milano, Italija) nakon čega je dodano 500 μ l FACS pufera. Stanična suspenzija je nanescena na prethodno ispranu kolonu srednje veličine i postavljena u magnetsko polje VarioMACS separatora (oba Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka). Neobilježene stanice koje su prošle kroz kolonu sakupljene su kao stanice NK. Čistoća stanica NK bila je >95%, dok je vijabilnost stanica premašila 98%. Vijabilnost stanica određena je bojenjem PI-om (0,5 μ g/ml / 1×10^6 stanica; 5 minuta na 22-25 °C; Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) uz očitavanje na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD) i analizirana u programu WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, San Diego, SAD).

3.4.3. Izdvajanje mononuklearnih stanica iz sinovijske membrane enzimatskom razgradnjom

Izdvajanje mononuklearnih stanica iz sinovijske membrane (SmMNs) učinjeno je enzimskom razgradnjom iz uzorka sinovijske membrane dobivene tijekom operacija zamjene koljenog zgloba endoprotezom, prateći principe metode za izdvajanje stanice iz tkiva, koja je uvedena i primjenjuje se u laboratoriju Zavoda za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci čitav niz godina kako je ranije opisano [293]. Uzorci sinovijske membrane izrezani su škarama na komadiće 2 $\times$ 2 mm i izloženi razgradnji 0,1% kolagenazi tipa IV (Sigma, München, Njemačka) 60 minuta na 37 °C (Hera Cell, Langenselbold, Njemačka) uz lagano miješanje na magnetskoj miješalici (Neolab, Heildeberg, Njemačka). Suspenzija stanica dva puta je propuštena kroz 100 μ m najlonsku mrežicu (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, SAD) kako bi se uklonili ostaci nerazgrađenog tkiva, odnosno stanični debris i zatim centrifugirana (600 $\times$ g, 10 minuta). Stanice su resuspendirane u RPMI-1640 mediju (Invitrogen, Auckland, Novi Zeland) i centrifugirane pri 800 $\times$ g na gradijentu gustoće Lymphoprep™ (Nycomed Pharma Axis-Shield, Oslo, Norveška) kroz 20 minuta bez opcije uključivanja kočnice. Na granici sredstava pokupljene su SmMNs, isprane dva puta u RPMI-1640 mediju i resuspendirane u RPMI mediju za kulturu tkiva [RPMI-1640, L-glutamin (2

mM), penicilin (1×10^5 U/l), streptomycin sulfat (0,05 g/l) i 10% FBS (Gibco FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)]. Izolirane stanice isprane su dva puta u RPMI-1640 mediju te su odmah korištene u postupku istraživanja ili kultivirane za daljnja istraživanja.

3.4.4. Kultiviranje izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane *in vitro* uz procjenu vijabilnosti

Svježe izdvojene SmMNs su kultivirane u koncentraciji 10^6 /ml RPMI medija za kulturu u Petrijevim zdjelicama (100 mm $\times$ 20 mm; Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska) u inkubatoru (Heracell 150, Heraeus, Langenselbold, Njemačka) u sterilnim uvjetima na 37 °C s ovlaženim zrakom koji sadrži 5% CO₂ tijekom 18 sati. Postotak mrtvih CD68⁺ stanica obilježenih s PI-om (1,75 μ g/ml) analiziran je u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica te nakon 18 sati kulture u RPMI-1640 mediju za kulturu, odnosno u kulturama sa 7-KC-om (Sigma Aldrich Chemie, St Louis, SAD) u rastućih koncentracijama (1,25; 2,5; 5 i 10 μ g/ml) i očitao na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD). Nakon procjene vijabilnosti u kulturama sa 7-KC-om, a usporedivo s ranije objavljenim podacima [294], pojedinim kulturama se dodao 7-KC (10 μ g/ml), 7-KC (10 μ g/ml) i LPS (10 ng/ml) ili samo LPS (10 ng/ml) (svi Sigma Aldrich Chemie, St Louis, SAD). Po isteku inkubacije analiziran je utjecaj gore navedenih stimulacija na sazrijevanje CD68⁺ stanica u smislu izražaja receptora za prepoznavanje obrazaca (TLR4, CD206, CD91), antigen predočne molekule HLA-DR, kostimulacijskih molekula (CD80 i CD86), unutarstaničnih citokina (IL-15, IFN- γ , TNF- α) i CC kemokina (CCL2, CCL3, CCL22, CCL17), polarizacije makrofaga (izražaj iNOS i arginaze-1), IL-1 receptora tip II i D6 mamilica te CC kemokinskih receptora CCR5 (CD195) i CCR7 (CD197) metodom imunofluorescencije uz očitavanje na protočnom citometru.

3.5. Imunofenotipizacija uz očitavanje protočnim citometrom

Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega (imunofenotipizacija) provedena je u svježe izdvojenim ili 18 sati kultiviranim SmMNs bolesnika sa zrelim OA-om koljena te u svježe izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena prema ranije opisanim protokolima [295,296].

3.5.1. Istovremeno obilježavanje dvaju površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Za površinsko obilježavanje biljega (antigena) korišten je uzorak ($2,5 \times 10^5$) SmMNs koji je najprije raspršen (resuspendiran) u FACS mediju [NaCl (8,12 g/l), KH_2PO_4 (0,26 g/l), Na_2HPO_4 (2,35 g/l), KCl (0,28 g/l) (svi Kemika, Zagreb, Hrvatska); $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (0,36 g/l) (Fluka, Buchs, Švicarska); NaN_3 (0,1 g/l) (Difco, San Diego, SAD)] i ispran. Sva ispiranja tijekom obilježavanja površinskih antigena su se vršila centrifugiranjem ($400 \times g$, 10 minuta na $+4^\circ\text{C}$) u kušalici s okruglim dnom (4 ml, Falcon, BD Biosciences, St Jose, SAD) u FACS mediju. Dobiveni nadtalog je odliven, a talog stanica koji je ostao u kušalici je promiješan na vrtložnom mikseru (VWR® vrtložni mikser fiksne brzine, Avantor, Bruchsal, Njemačka). Nadalje, talog stanica iz uzorka je inkubiran (20 minuta na $22\text{-}25^\circ\text{C}$) s FACS medijem koji je sadržavao 10% FBS-a (Gibco FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) inaktiviranog toplinom, kako bi se spriječila nespecifična vezanja Fc fragmenta protutijela za receptore za Fc fragmente imunoglobulina na makrofagima. Po isteku inkubacije uzorci stanica su isprani, a na talog su dodana primarna protutijela od interesa ili kontrolna protutijela istog razreda ili podrazreda (30 min na $+4^\circ\text{C}$) irelevantne specifičnosti. Ukoliko su protutijela bila neposredno obilježena s fluorokromom, dodavana su na talog istovremeno da se postigne ukupan volumen od 200 μl /uzorku. Ukoliko je jedno od primarnih protutijela bilo neobilježeno fluorokromom, najprije je uzorak stanica inkubiran s neobilježenim protutijelom (30 minuta na $+4^\circ\text{C}$), a nakon ispiranja (dva puta) je dodano sekundarno protutijelo obilježeno fluorokromom i inkubirano ponovno 30 min na $+4^\circ\text{C}$. Zatim je sekundarno protutijelo isprano dva puta i dodana su neposredno obilježena protutijela za drugi antigen od interesa (30 minuta na $+4^\circ\text{C}$). Time je završeno obilježavanje, stanice su isprane dva puta, a talog je resuspendiran u 250 μl 2% paraformaldehida za očitavanje na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD). Rezultati su analizirani računalnim programom WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, San Diego, SAD).

Specifikacije i koncentracije tj. razrjeđenja protutijela za površinske biljege od interesa, kontrolna protutijela istog razreda/podrazreda irelevantne specifičnosti i sekundarno protutijelo, popisani su u Tablici 4. Kombinacije protutijela su popisane u Tablici 5.

Tablica 4. Protutijela korištena za simultano obilježavanje površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Specifičnost	Kataloški broj [Klon]	Proizvođač	Razrjeđenje
Primarna protutijela za površinke biljega SmMNs			
CD68	14-0688-82, [KP1], mišja IgG1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:100
CD68-FITC	562117, [Y1/82A] mišja IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	5 μ L/10 ⁶
CD68-PE	556078 [Y1/82A] mišja IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD14-FITC	561712, [M5E2] mišja IgG2a	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD16	C370 [UCHM], mišja IgG2a	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1 μ g/10 ⁶
CD206-PE	555954 [B19.9], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD209-PE	561765 [DCN46], mišja IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD91-PE	550497 [A2MR- α 2]; mišja IgG1	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:5
TLR4-FITC	8378 [HTA125]; mišja IgG2a	Abcam, Cambridge, UK	1 μ g/10 ⁶
CD80-PE	340294 [L307.4], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD86-PE	560957 [FUN-1], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
HLA-DR-PE	347367 [L243], mišja IgG2a	BD Biosciences San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD195 (CCR5)-PE	555993 [2D7], mišja IgG2a	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD197 (CCR7)-PE	561008 [3D12], štakorska IgG2a	BD Biosciences San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
D6-PE	MAB1364 [196124], štakorska IgG2a	R&D Sytems, Minneapolis, SAD	1 μ g/10 ⁶
IL-1R tip II	MAB263 [G46-6], mišja IgG2a	R&D Sytems, Minneapolis, SAD	1 μ g/10 ⁶
Kontrole istog razreda/podrazreda			
mišja IgG1	554121 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG1-PE	555749 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG2a	553457 [G155-178]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG2a-FITC	553456 [G155-178]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG2a-PE	340756 [G155-178]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG2b-FITC	555057 [27-35]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1 μ g/10 ⁶

mišja IgG2b-PE	555058 [27-35]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1 µg/10 ⁶
Sekundarno protutijelo			
protu-mišja: IgG1-FITC IgG2a-FITC IgG2b-FITC IgG3-FITC	554001 [kozja IgG]	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	1 µg/10 ⁶

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); CCR- CC kemokinski receptor (od eng. CC chemokine Receptor); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein Isothiocyanate); HLA-DR- Humani leukocitni antigen-DR (od eng. Human Leukocyte Antigen-DR); IL-1R- Interleukin-1 receptor; Ig- Imunoglobulin; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); TLR4 - Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

Tablica 5. *Kombinacije protutijela korištene za simultano obilježavanje površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.*

Izdvojene SmMNs		
	FITC	PE
Kombinacija 1	mišja IgG2b FITC	-
Kombinacija 2	CD68-FITC	-
Kombinacija 3	CD68-FITC	mišja IgG1-PE
Kombinacija 4	CD68-FITC	CD91-PE
Kombinacija 5	CD68-FITC	CD206-PE
Kombinacija 6	CD68-FITC	CD80-PE
Kombinacija 7	CD68-FITC	CD86-PE
Kombinacija 8	CD68-FITC	mišja IgG2a-PE
Kombinacija 9	CD68-FITC	HLA-DR-PE
Kombinacija 10	CD68-FITC	CCR5-PE
Kombinacija 11	CD68-FITC	mišja IgG2b-PE
Kombinacija 12	CD68-FITC	CD209-PE
Kombinacija 13	CD68-FITC	štakorska IgG2a-PE
Kombinacija 14	CD68-FITC	CD195-PE

Kombinacija 15	CD68-FITC	CD197-PE
Kombinacija 16	-	mišja IgG2b-PE
Kombinacija 17	-	CD68-PE
Kombinacija 18	mišja IgG2a-FITC	CD68-PE
Kombinacija 19	TLR4-FITC	CD68-PE
Kombinacija 20	CD14-FITC	CD68-PE
Kombinacija 21	mišja IgG2a + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 22	CD16 + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 23	IL-1R tip II + GAM-FITC	CD68 PE

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein Isothiocyanate); GAM-FITC- Kozji protu-mišji Ig obilježen s FITC-om (od eng. Goat anti-Mouse conjugated with Fluorescein Isothiocyanate); HLA-DR- Humani leukocitni antigen-DR (od eng. Human Leukocyte Antigen-DR); IL-1R- Interleukin-1 receptor; Ig- Imunoglobulin; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); SmMNs- mononuklearne stanice sinovijske membrane; TLR4- Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

3.5.2. Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega (antigena) učinjeno je u uzorku ($2,5 \times 10^5$) SmMNs koji je ispran u FACS mediju ($400 \times g$, 10 minuta na $+4^\circ C$) kako bi se odstranio RPMI medij za kulturu tkiva. Način obilježavanja antigena posrednom ili neposrednom imunofluorescencijom je određivao daljnji postupak. Uvijek su posredna obilježavanja (neobilježeno primarno protutijelo i sekundarno protutijelo konjugirano s fluorokromom) učinjena prije neposrednih obilježavanja, bez obzira da li se radilo o unutarstaničnom ili površinskom antigenu. Specifikacija i koncentracije protutijela korištenih u obilježavanju površinskih i unutarstaničnih antigena su prikazane u Tablici 6., a kombinacije protutijela u Tablici 7.

Tablica 6. Specifikacija protutijela korištenih u obilježavanju površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Specifičnost	Kataloški broj [Klon]	Proizvođač	Razrjeđenje
Primarna protutijela za površinke biljege SmMNs			
CD68	14-0688-82, [KP1], mišja IgG1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:100
CD68-FITC	562117, [Y1/82A] mišja IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	5 μ L/10 ⁶
CD68-PE	556078 [Y1/82A] mišja IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
Primarna protutijela za unutarstanično obilježavanje			
Hsp70	ab2787 [5A5], mišja IgG1	Abcam, Cambridge, UK	1:100
GNLY	D-185-3 [RC8], mišja IgG1	MBL International, Woburn, SAD	1:100
Perforin-PE	556437 [δ G9], mišja IgG2b	BD Biosciences, San Diego, SAD	1:100
iNOS	115819 [SP126], zečja IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Arginaza-1	212522 [ARG1/1125], mišja IgG3	Abcam, Cambridge, UK	1:25
CCL2 PE	FAB151P [48607], mišja IgG2b	R&D Systems, Minneapolis, SAD	20 μ L/10 ⁶
CCL3	MAB670 [14215], mišja IgG2a	R&D Systems, Minneapolis, SAD	20 μ L/10 ⁶
CCL17-PE	IC364IP [54015], mišja IgG1	Novus Biologicals, Centennial, SAD	10 μ L/10 ⁶
CCL22-PE	565950 [T51-719], mišja IgG1	BD Biosciences, San Diego, SAD	1 μ g/10 ⁶
IFN- γ -PE	554701 [B27], mišja IgG1	BD Biosciences, San Diego, SAD	0,25 μ g/10 ⁶
IL-4-PE	554516 [8D4-8], mišja IgG1	BD Biosciences, San Diego, SAD	0,15 μ g/10 ⁶
IL-15-PE	IC24715P [34559], mišja IgG1	R&D Systems, Minneapolis, SAD	20 μ L/10 ⁶
IL-17-PE	IC3171P [41802], mišja IgG1	R&D Systems, Minneapolis, SAD	20 μ L/10 ⁶
Kontrole istog razreda/podrazreda			
mišja IgG1	554121 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG1-PE	555749 [MOPC-21]	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG2a	14-4724-82 [eBM2a]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:200
mišja IgG2b-FITC	555057 [27-35]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1 μ g/10 ⁶
mišja IgG2b-PE	556437 [27-35]	BD Bioscience, San Diego, SAD	1 μ g/10 ⁶

mišja IgG	10400C [pPt]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD	1:100
zečja IgG	37415 [pPt]	Abcam, Cambridge, UK	1:200
Sekundarno protutijelo			
protu-mišja: IgG1-FITC IgG2a-FITC IgG2b-FITC IgG3-FITC	554001 [kozja IgG]	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	1 µg/10 ⁶
protu-zečja IgG	554020 [kozja IgG]	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	1 µg/10 ⁶

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein isothiocyanate); GNLy- Granulizin; Hsp70- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. Heat Shock Protein 70); Ig- imunoglobulin; IL- Interleukin; iNOS- Inducibilna sintaza dušikovog oksida (od engl. inducible Nitric Oxide Synthase); IFN-γ- Interferon gama; PE- fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); pPt- Poliklonsko protutijelo; SmMNs- Mononuklearne stanice sinovijske membrane.

Tablica 7. Kombinacije protutijela korištene za simultano obilježavanje unutarstaničnih i površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA koljena.

Izdvojene SmMNs		
	FITC	PE
Kombinacija 1	mišji IgG1 + GAM-FITC	-
Kombinacija 2	CD68+GAM-FITC	-
Kombinacija 3	CD68+GAM-FITC	IgG2b-PE
Kombinacija 4	CD68+GAM-FITC	perforin-PE
Kombinacija 5	CD68+ GAM-FITC	CCL2-PE
Kombinacija 6	mišji IgG2b-FITC	-
Kombinacija 7	CD68-FITC	-
Kombinacija 8	CD68-FITC	mišji IgG1-PE
Kombinacija 9	CD68-FITC	CCL17-PE
Kombinacija 10	CD68-FITC	CCL22-PE
Kombinacija 11	CD68-FITC	IFN-γ-PE

Kombinacija 12	CD68-FITC	TNF- α -PE
Kombinacija 13	CD68-FITC	IL-15-PE
Kombinacija 14	-	mišji IgG2b-PE
Kombinacija 15	-	CD68-PE
Kombinacija 16	IgG + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 17	arginaza-1 + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 18	IgG1 + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 19	Hsp70 + GAM-FITC	CD68- PE
Kombinacija 20	GNLY + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 21	mišji IgG2a + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 22	CCL3 + GAM-FITC	CD68-PE
Kombinacija 23	zečji IgG + GAR-FITC	CD68-PE
Kombinacija 24	iNOS + GAR-FITC	CD68-PE

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein Isothiocyanate); GAM-FITC- Kozji protu-mišji Ig obilježen s FITC-om (od eng. Goat anti-Mouse conjugated with Fluorescein Isothiocyanate); GAR-FITC- Kozji protu-zečji Ig obilježen s FITC-om (od eng. Goat anti-Rabbit conjugated with Fluorescein Isothiocyanate); Ig - Imunoglobulin; IL- Interleukin; GNLY- Granulizin; Hsp70- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. Heat Shock Protein 70) iNOS - inducibilna sintaza dušikovog oksida (od engl. inducible Nitric Oxide Synthase); IFN- γ - Interferon gama; PE- fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); SmMNs- Mononuklearne stanice sinovijske membrane; TNF- α - Čimbenik nekroze tumora alfa (od eng. Tumor Necrosis Factor alpha).

Uzorke stanica u kojima su posredno obilježavani unutarstanični antigeni (arginaza-1, iNOS, Hsp70, GNLY ili CCL3) najprije su fiksirani s 4% paraformaldehidom (10 minuta na 22-25 °C), isprani u FACS mediju dva puta i permeabilizirani Saponinskim puferom [(0,1% saponin; Sigma, Poole, Dorset, SAD), 2% FCS u PBS-u sastava NaHPO₄×12H₂O 33,9 mM, NaCl 136,8 mM, KH₂PO₄ 3 mM destilirane vode; (sve od Kemika, zagreb, Hrvatska), 0,05% BSA (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka)] tijekom 20 minuta na 22-24 °C u ukupnom volumenu od 200 μ l. Po isteku inkubacije, u suspenziju stanica bez ispiranja dodano je 20 l topline inaktiviranog FCS-a (10% FCS u Saponinskom puferu, 10 minuta na 22-25 °C) zbog smanjivanja nespecifičnog vezanja Fc fragmenta protutijela za Fc receptore. Po ispiranju stanica u Saponinskom puferu na talog stanica su dodana neobilježena primarna protutijela

usmjerena prema arginazi-1, iNOS-u, Hsp70, GNLY-u ili CCL3, odnosno kontrolna protutijela istog podrazreda, ali irelevantne specifičnosti te je provedena inkubacija 30 minuta na +4 °C. Nakon toga su stanice isprane u Saponinskom puferu dva puta i na talog je dodano sekundarno protutijelo obilježeno s fluorokromom, kozja protu-mišja obilježena s fluorescein izotiocijanatom (FITC, od eng. Fluorescein Isothiocyanate) (GAM-FITC, od engl. Goat anti-Mouse conjugated with Fluorescein Isothiocyanate), odnosno kozja protu-zečja obilježena s FITC-om (GAR-FITC, od engl. Goat anti-Rabbit conjugated with Fluorescein Isothiocyanate) koji su inkubirani daljnjih 30 minuta na +4 °C. FITC isijava zelenu svjetlost po obasjavanju laserom protočnog citometra i na taj način oslikava stanice koje su vezale protutijelo. Po inkubaciji, stanice su isprane u Saponinskom puferu dva puta i na talog je dodan 1 ml FACS medija kako bi se ponovno postigla cjelovitost stanične membrane tijekom 5 minuta. Po centrifugiranju je na talog stanica dodano protu-CD68 protutijelo obilježeno s fikoeritriinom (PE, od engl. Phycoerythrin), koje isijava narančasto-crvenu svjetlost po obasjavanju laserom protočnog citometra, i inkubirano 30 minuta na +4 °C. Zatim su stanice isprane dva puta u FACS mediju i resuspendirane u 250 µl 2% paraformaldehida u FACS mediju te očitane na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD).

Protokol za posredno obilježavanje površinskog CD68 biljega razlikuje se utoliko što se uzorak stanica najprije inkubira s 10% FCS-om u FACS mediju (10 minuta na 22-24 °C), zatim ispire u istom mediju te se na talog dodaju neobilježena protu-CD68 protutijela ili mišji IgG1 irelevantne specifičnosti (30 minuta na +4 °C). Nakon inkubacije uzorci su isprani dva puta u FACS mediju, talog stanica inkubiran je s kozjim protu-mišjim poliklonskim protutijelima obilježenim s FITC-om (GAM-FITC, 30 minuta na +4 °C) i ponovno ispran dva puta u FACS mediju. Zatim je na talog dodan 4% paraformaldehid (100 µl), provedena je inkubacija 10 minuta na 22-24 °C zbog fiksacije vezanih protutijela za površinske biljege, kako se ne bi odvojili tijekom permeabilizacije stanične membrane, u 200 µl Saponinskog pufera (20 minuta na 22-24 °C). Nakon isteka inkubacije uzorku su dodana protutijela konjugirana s PE i usmjerena prema perforinu, CCL2 ili je dodano kontrolno mišje IgG2b protutijelo te je ponovno provedena inkubacija 30 minuta na +4 °C. Po isteku inkubacije uzorci stanica su isprani u Saponinskom puferu dva puta i cjelovitost stanične membrane je ponovno uspostavljena inkubacijom s 1 ml FACS medija. Zatim su stanice isprane od FACS medija, a na talog je dodan 2% paraformaldehid u FACS mediju zbog očitavanja na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD).

Neposredno obilježavanje unutarstaničnih biljega CCL17, CCL22, IFN- γ , TNF- α i IL-15 učinilo se protutijelima konjugiranim s PE u stanicama prethodno obilježenim s protu-CD68

protutijelom konjugiranim s FITC-om po protokolu kojim se najprije obilježava površinski biljeg, a zatim unutarstanični biljeg (Tablica 7.). Svi uzorci u kojima su se obilježavali kemokini, citokini i njihove kontrole su prije obilježavanja stimulirani s forbol-12-miristate-13-acetate (6 μ M), ionomicinom (1 μ M) i monenzimom (3 μ M) (svi Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) kroz 5 sati na 37 °C u vlažnoj komori (Heracell 150, Heraeus, Langensfeld, Njemačka) s ciljem nagomilavanja citokina i kemokina u citoplazmi stanica zbog boljeg prikazivanja biljega protočnom citometrijom.

3.5.3. Trostruko obilježavanje imunofluorescencijom limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena

Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega provedeno je u svježe izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena, prema ranije opisanom protokolu [297]. Sva korištena primarna protutijela za biljege od interesa, protutijela istog razreda/podrazreda irelevantne specifičnosti (kontrola protutijela) i sekundarna protutijela konjugirana s fluorescentnim bojama, popisana su u Tablici 8. Kombinacije protutijela prikazane su u Tablici 9.

Tablica 8. *Specifikacija protutijela korištenih u obilježavanju površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.*

Specifičnost	Kataloški broj [Klon]	Proizvođač	Razrjeđenje
Primarna protutijela			
CD3-PE	555332 [UCHT-1], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD3- FITC	561808 [UCHT-1], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
CD56- PE-Cy5	569104, [B159], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
GNLY	D-185-3 [RC8]; mišja IgG1	MBL International, Woburn, SAD	1:100
IL-4-PE	551774; [8D4-8] mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
IFN- γ -PE	554701 [B27], mišja IgG1	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	20 μ L/10 ⁶
Kontrole istog razreda/podrazreda			
mišja IgG1	554121 [MOPC-21], mišja IgG1	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG-FITC	555748 [MOPC-21], mišja IgG1	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
mišja IgG1-PE	555749 [MOPC-21], mišji IgG1	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶

mišja IgG- PE-Cy5	555750 [MOPC-21], mišja IgG1	BD Bioscience, San Diego, SAD	20 μ L/10 ⁶
Sekundarno protutijelo			
protu-mišja: IgG1-FITC IgG2a-FITC IgG2b-FITC IgG3-FITC	554001 [kozja IgG]	BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD	1 μ g/10 ⁶

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein isothiocyanate); GNLY- Granulizin (od eng. Granulysin); Ig- Imunoglobulin; IL- Interleukin; IFN- γ - Interferon gama; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); PE-Cy5- Fikoeritrin-cianin5 (od eng. Phycoerythrin-Cyanin5).

Tablica 9. Trostruko obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.

Izdvojene mononuklearne stanice periferne krvi			
	FITC	PE	PE-Cy5
Kombinacija 1	-	IgG1-PE	-
Kombinacija 2	-	CD3-PE	-
Kombinacija 3	-	-	IgG1-PE-Cy5
Kombinacija 4	-	-	CD56- PE-Cy5
Kombinacija 5	-	IgG1-PE	IgG1-PE-Cy5
Kombinacija 6	-	CD3-PE	CD56- PE-Cy5
Kombinacija 7	mišja IgG1 + GAM-FITC	CD3-PE	CD56- PE-Cy5
Kombinacija 8	GNLY + GAM-FITC	CD3-PE	CD56-PE-Cy5
Kombinacija 9	IgG1-FITC	-	-
Kombinacija 10	CD3-FITC	-	-
Kombinacija 11	IgG1-FITC	-	IgG1-PE-Cy5
Kombinacija 12	CD3-FITC	-	CD56-PE-Cy5
Kombinacija 13	CD3-FITC	IgG1-PE	CD56-PE-Cy5

Kombinacija 14	CD3-FITC	IFN- γ -PE	CD56-PE-Cy5
Kombinacija 15	CD3-FITC	IL-4-PE	CD56-PE-Cy5

CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); FITC- Fluorescein izotiocijanat (od eng. Fluorescein Isothiocyanate); GAM-FITC- Kozji protu-mišji Ig obilježen s FITC-om (od eng. Goat anti-Mouse conjugated with Fluorescein Isothiocyanate); GNLy- Granulizin; Ig- Imunoglobulin; IL- Interleukin; IFN- γ - Interferon gama; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); PE-Cy5- Fikoeritrin-cianin5 (od eng. Phycoerythrin-Cyanin5).

Za obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega, uzorak mononuklearnih stanica periferne krvi ili sinovijske membrane ($2,5 \times 10^5$ stanica) ispran je u FACS puferu, fiksiran (4% paraformaldehid, 10 minuta na 22-25 °C), ponovno ispran i na talog je dodano 100 μ L Saponinskog pufera te je provedena inkubacija 20 minuta na 22-25 °C zbog permeabilizacije stanične membrane. Zatim je na talog stanica dodan 10% toplinski inaktiviran FBS u Saponinskom puferu i provedena je inkubacija 20 minuta na 22-25 °C. Uzorci su tada isprani u Saponinskom puferu centrifugiranjem ($400 \times g$, 10 minuta na +4 °C). Na talog su dodana primarna protutijela usmjerena prema GNLy-u, ili protutijela istog podrazreda irelevantne specifičnosti (mišji IgG1) tijekom 30 minuta na +4 °C. Po isteku inkubacije, stanice su isprane dva puta u Saponinskom puferu ($400 \times g$, 10 minuta na +4 °C) te su dodana sekundarna protutijela GAM-FITC tijekom 30 minuta na +4 °C. Nakon dva ispiranja u Saponinskom puferu, stanične membrane su učinjene ponovno cjelovitima upotrebom 1 ml FACS medija (5 minuta na 22-25 °C). Obilježavanje stanične površine provedeno je protutijelima usmjerenim prema CD3 i CD56 te inkubirano 30 minuta na +4 °C. Uzorci stanica, prethodno inkubirani s forbol-12-miristate-13-acetate (6 μ M), ionomicinom (1 μ M) i monensinom (3 μ M) (svi Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) kroz 5 sati na 37 °C u ovlaženom 5%-om CO₂ inkubatoru, korišteni su za unutarstanično obilježavanje citokina specifičnim protutijelima konjugiranim s PE i usmjerenim prema IFN- γ ili IL-4 u subpopulacijama limfocita obilježenih korištenjem protu-CD56-PE-Cy5 i protu-CD3-FITC. Protutijela istog podrazreda irelevantne specifičnosti korištena su kao kontrole.

Sam postupak obilježavanja je istovjetan gore opisanom za istovremeno obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega. Na kraju obilježavanja uzorci su resuspendirani u 2% paraformaldehidu te očitani na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD).

3.6. Imunocitokemijsko obilježavanje

3.6.1. Svjetlosna mikroskopija imunocitokemijski obilježenih limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena

Cytospin preparati su pripremljeni iz svježe izoliranih mononuklearnih stanica periferne krvi suspendiranih u PBS/0,05% BSA za postizanje konačne koncentracije od 8×10^5 stanica/ml. Zatim je 100 μ l stanične suspenzije centrifugirano (Cytospin 3 centrifuge; Shandon GMI, Ramsey, SAD; $210 \times g$, 5 minuta na $+4^\circ\text{C}$) na mikroskopskom stakalcu (Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Njemačka). Cytospin preparati osušeni su na zraku tijekom 60 minuta i zatim fiksirani u čistom acetonu (5 minuta, $22-25^\circ\text{C}$; Kemika, Zagreb, Hrvatska). Obilježavanje GNLY-a učinjeno je imunoperoksidaznom metodom bojenja s LSABTM-HRP kitom (Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, SAD). Ukratko, preparati su prvo inkubirani tijekom 20 minuta s otopinom za blokiranje iz LSABTM-HRP kita, a zatim s protu-humanim monoklonskim protutijelom (mPt) GNLY-a (klon RC8) ili mišjim IgG1 (klon R312; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka) razrijeđenim u omjeru 1:100 u PBS/0,05% BSA tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije s biotinom obilježenim protu-mišjim sekundarnim protutijelima tijekom 10 minuta učinjena je inkubacija sa streptavidinom tijekom 10 minuta (oba iz LSABTM-HRP kit; Dako; Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, SAD). Do razvoja reakcije došlo je primjenom aminoetil karbazola (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka), a jezgre su obojene hematoksilinom (Gill III; Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Sve inkubacije su izvedene na $22-25^\circ\text{C}$, a uzorci su isprani dva puta u PBS-u tijekom 5 minuta između svakog postupka obilježavanja. Nakon završenog postupka obilježavanja stakalca su uklopljena u Entellan medij za uklapanje (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Mikrofotografije su snimljene Olympus BX51 mikroskopom s Olympus DP71 kamerom (povećanje $\times 1000$) i obrađene u programu Cell[^]A version 3.0 (svi Olympus, Tokio, Japan).

3.6.2. Konfokalna mikroskopija imunocitokemijski obilježenih limfocita periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena

Konfokalna mikroskopija izvedena je prema protokolu kojeg je opisao Donaldson [295]. Uzorci su fiksirani s 4% paraformaldehidom u PBS-u (10 minuta na $22-25^\circ\text{C}$), permeabilizirani s Triton X-100 (Rohm and Haas Corporate Headquarter, Philadelphia, USA) kroz 7 minuta i zatim inkubirani u 20% humanom AB serumu (izvor „in house“) u PBS-u (45 minuta na $22-25^\circ\text{C}$). Uzorci su zatim inkubirani s kombinacijom protu-humanog GNLY mPt (klon RC8;

razrjeđenje 1:100) i štakorskog IgG2a protu-membranskog proteina povezanog s lizosomom (LAMP, od eng. Lysosomal membrane protein)-1 mPt (klon 1D4B; BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA; razrjeđenje 1:100;) u PBS/ 1% BSA preko noći na +4 °C. Nakon ispiranja, stanice su obilježene sekundarnim protutijelima, magarećim protu-mišjim IgG H+L pPt (kat. br. A32744; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD; razrjeđenje 1:500) obilježeni s Alexa Fluor 594 i kozjim-protu štakorskim IgG H+L pPt (kat. br. A11006; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD; razrjeđenje 1:300) obilježenih s Alexa Fluor 488 u PBS-u tijekom 60 minuta na 22-25 °C, isprane i uklopljene u Mowiol medij za uklapanje (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Sva ispiranja učinjena su u PBS-u (tri ispiranja kroz 3 minute). Mikrofotografije su snimljene korištenjem konfokalnog mikroskopa Olympus Fluoview FV3000 (Olympus Optical Company, Tokio, Japan; povećanje $\times 600$) i softverskog programa Cell^A version 3.0 (Olympus, Tokio, Japan). Stanice su odabrane nasumično i pokazale su dobro razlučen uzorak.

3.7. Funkcijski testovi

3.7.1. Test vezanja 7-KC-a i Hsp70 za TLR4 na CD68+ stanicama sinovijske membrane

Vezanje 7-KC-a i Hsp70 za TLR4 analizirano je na svježe izoliranim SmMNs zrelog OA-a koljena. Svi uzorci SmMNs ($2,5 \times 10^5$ stanica/uzorak) su najprije inkubirani u FACS mediju, koji je sadržavao 10% FCS, tijekom 20 minuta na temperaturi 22-25 °C s ciljem smanjivanja nespecifičnog vezanja tijekom daljnjeg postupka, a zatim su uzorci isprani jednom u FACS mediju ($400 \times g$, 10 minuta na +4 °C). Na talog stanica je dodan 7-KC (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka) u rastućim koncentracijama (1,25 $\mu g/ml$, 2,5 $\mu g/ml$, 5 $\mu g/ml$ i 10 $\mu g/ml$) odnosno Hsp70 (mješavina Hsp70 i Hsc70; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka) u rastućim koncentracijama (0,5 $\mu g/ml$, 1 $\mu g/ml$ i 2 $\mu g/ml$) u FACS mediju ili samo FACS medij u ukupnom volumenu 200 μL uz inkubaciju 30 minuta na ledu. Zatim je bez ispiranja uzorcima dodano mišje IgG2b nekonjugirano protu-TLR4 protutijelo 1 $\mu M/10^6$ stanica (kat. br. 22048, klon 76B357.1, Abcam, Cambridge, UK) ili mišje IgG2b (kat.br. BD557351, klon MPC-11, BD Biosciences) kao kontrola istog podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti da se postigne razrjeđenje 1:100. Uzorci su zatim isprani dva puta u FACS mediju te je dodano kozje protu-mišje IgG sekundarno protutijelo konjugirano s FITC-om tijekom 30 minuta na +4 °C. Uzorci su ponovno isprani dva puta u FACS mediju te su dodana mišja IgG2b protu-CD68 protutijela konjugirana s PE u koncentraciji 20 $\mu L/10^6$ stanica (kat. br. 556078, klon Y1/82A; BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD) ili mišji IgG2b obilježen s PE (cat. br. 555058, klon 27-35,

BD Bioscience, San Diego, SAD) u koncentraciji $1 \mu\text{g}/10^6$ stanica kao kontrola istog podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti. Po isteku inkubacije stanice su isprane u FACS mediju dva puta i talog je resuspendiran u $250 \mu\text{l}$ FACS medija s 2% paraformaldehida za očitavanje na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD).

3.7.2. Pinoendocitoza FITC-dekstrana

Pinoendocitoza FITC-dekstrana je testirana u uzorcima SmMNs (5×10^5 stanica/uzorak) koji su 18 sati inkubirani u sterilnim uvjetima samo u $500 \mu\text{l}$ RPMI mediju za kulturu na $+4^\circ\text{C}$, te na 37°C u vlažnom okruženju uz 5% CO_2 samo u RPMI mediju za kulturu, uz dodatak LPS-a (10 ng/ml) u ukupnom volumenu od $500 \mu\text{l}$ RPMI medija za kulturu. Po isteku 18 satne kultivacije uzorcima je dodan FCS u finalnoj koncentraciji od 10% ($50 \mu\text{l}$) i uzorci su inkubirani tijekom 20 minuta na $22\text{--}25^\circ\text{C}$ (smanjivanje nespecifičnog vezanja protutijela tijekom završnog obilježavanja CD68 antigena). Zatim su stanice isprane ($400 \times \text{g}$, 10 minuta na $+4^\circ\text{C}$) u mediju za endocitozu prethodno rashlađenom na ledu, kako bi se smanjila pinoendocitoza tijekom ispiranja. Medij za endocitozu se sastojao od otopine A ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ $0,5 \text{ mM}$, CaCl_2 $1,17 \text{ mM}$) i otopine B (NaCl $136,8 \text{ mM}$, Na_2HPO_4 $7,95 \text{ mM}$, KH_2PO_4 $1,46 \text{ mM}$) u omjeru 1:1, pH 7,4. Nakon ispiranja na talog je dodano $200 \mu\text{l}$ hladnog medija za endocitozu, stanice su se pažljivo ponovno suspendirale pipetom od $100 \mu\text{l}$ i preseljeno je $100 \mu\text{l}$ uzorka u novu kušalicu (4 ml ; Falcon, BD Biosciences, St Jose, SAD). Time su iz uzoraka SmMNs (5×10^5 stanica) stimuliranih na isti način dobivena dva uzorka, svaki s $2,5 \times 10^5$ stanica od kojih je jednom uzorku dodano $100 \mu\text{l}$ FITC-dekstrana rashlađenog na ledu, a drugom $100 \mu\text{l}$ FITC-dekstrana zagrijanog na 37°C , oba u početnoj koncentraciji FITC-dekstrana $500 \mu\text{g/ml}$ medija za endocitozu. Uzorci SmMNs s rashlađenim FITC-dekstranom su se inkubirali okruženi ledom, a uzorci SmMNs sa zagrijanim FITC dekstranom su se inkubirali na 37°C tijekom 30 minuta kako bi se ostvarili minimalni, odnosno maksimalni uvjeti za pinoendocitozu FITC dekstrana. Po isteku inkubacije stanice su isprane u 3 ml rashlađenog FACS medija na ledu, a zatim je bez fiksiranja paraformeldehidom, obilježen površinski biljeg CD68 uz pomoć mišjeg IgG2b protu-CD68 protutijela konjugiranog s PE (kat. br. 556078, klon Y1/82A, BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD) u koncentraciji $20 \mu\text{l}/10^6$ stanica i kontrolnog mišjeg IgG2b protutijela irelevantne specifičnosti konjugiranog s PE (kat. br. 555058, klon 27-35, BD Bioscience, San Diego, SAD) u koncentraciji $1 \mu\text{g}/10^6$ stanica. Po obilježavanju stanice su resuspendirane u rashlađenom FACS mediju i odmah očitane na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD). Razlika između srednjeg intenziteta fluorescencije ili MFI

(od engl. Mean Fluorescence Intensity) za FITC-dekstran između stanica inkubiranih na ledu i na 37 °C jest izražaj pinoendocitoze u svakom uzorku stimuliranom na istovjetan način. Izražaj pinoendocitoze u uzorku kultiviranom 18 sati na +4 °C uzet je kao referentna vrijednost i izražena je u postocima kao 100%, a ostali izražaji pinoendocitoze su prikazani kao postoci referentne vrijednosti zbog relativno malog broja uzoraka i disperzije rezultata u ovom funkcijskom testu.

3.7.3. Test citotoksičnosti stanica NK

Citotoksičnost stanica NK procijenjena je na temelju rane apoptoze NK osjetljive K-562 stanične linije [298]. Stanice humane eritroleukemije K-562 (Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska) obilježene su crvenom lipofilnom bojom PKH26 (5 minuta na 22-25 °C) (PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit; Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Uzorci izvršnih NK i ciljnih K-562 stanica, u različitim omjerima te ukupnom volumenu od 200 µl, inkubirani su u RPMI mediju za kulturu 18 sati na 37 °C s 5% CO₂ i obilježeni s FITC obilježenim Annexin V (BD Pharmingen, Franklin Lakes, SAD) (5 µg/10⁵ stanica, 15 minuta na 22-25 °C u tamnom). PI, u konačnoj koncentraciji od 5 µg/ml, dodan je uzorcima 15-20 minuta prije analize na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Franklin Lakes, SAD). Analizirani su netretirani uzorci stanica NK, te stanice NK tretirane s mišjim IgG2b protu-humanim perforin mPt (kat. br. NBP1 45774; klon: δG9 klon; Novus Biologicals, Centennial, USA; 1 µg/1×10⁵ stanica NK), mišjim IgG1 protu-humanim GNLY mPt (kat. br. D-185-3; klon: RC8; MBL International, Woburn, USA; 1 µg/1×10⁵ NK stanica) ili kombinacijom protu-perforin i protu-GNLY mPt tijekom 30 minuta na +4 °C. K-562 stanice obilježene s PKH26 (crveno obojenje) koje su bile PI negativne i FITC-Annexin V pozitivne, smatrane su ranim apoptotičkim stanicama [298]. Dobiveni rezultati su izraženi kao razlika postotka ranih apoptotičkih K-562 stanica u prethodno tretiranim uzorcima (određen omjerom izvršnih i ciljanih stanica) i postotka apoptotičkih K-562 stanica kultiviranih samo u RPMI mediju za kulturu.

3.8. Uređaji i sitna laboratorijska oprema

Centrifuga, stolna 5425 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); DAKO Pen (DAKO, Glostrup, Njemačka); Erlenmayerova tikvica, 100 ml (Boral, Pula, Hrvatska); filter za vakuum filtraciju Filter Max PES 0,22 µm (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska); hladnjak +4 °C (Gorenje, Ljubljana, Slovenija); hladnjak -20 °C (Bosch, Stuttgart, Njemačka); komora za rad

u sterilnim uvjetima (Klima oprema, Samobor, Hrvatska); kušalice 1,5 ml s koničnim dnom i pričvršćenim poklopcem, sterilne (Greiner, Frickenhausen, Njemačka); kušalice 2 ml za zamrzavanje (Greiner, Frickenhausen, Njemačka); magnet obložen teflonom (Kartell, Noviglio, Milano, Italija); magnetska miješalica (Neolab, Heildeberg, Njemačka); mikrovalna pećnica (Gorenje, Ljubljana, Slovenija); mjerač vremena (Scientific, Oregon Oregon, SAD); nastavci za pipete s filterima 1 ml, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l, 1 μ l (Greiner, Frickenhausen, Njemačka); papir za filtriranje (Whatman, Maidstone, Kent ME, UK); pinceta (Neolab, Heildeberg, Njemačka); pH metar FiveEasy™ pH F20 (Laboratory Logistic Group, Seoul, Južna Korea); pipete plastične sterilne (Kartell, Noviglio, Milano, Italija); pipete, automatske 0,1-2,5 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); staničevina (Copan, Zagreb, Hrvatska); strugač stanica s podloge (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska); škariće (Neolab, Heildeberg, Njemačka); vodena kupelj (INKO, Vrapče, Hrvatska); vaga (Mettler Toledo Inc, Columbus, OH, SAD).

3.9. Statistička obrada podataka

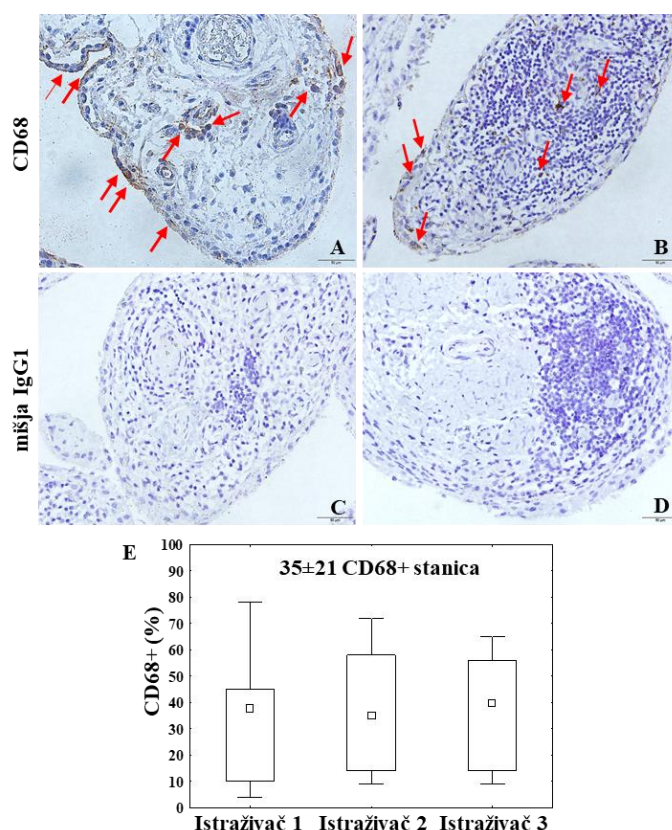
Statistički dobiveni rezultati prikazani su kao medijan (25-75 percentil). Razlika između dvije ispitivane skupine izračunata je primjenom neparametarijskog Mann Whitney U testa (TIBCO Statistica, verzija 13.4.0.14; StatSoft GmbH, Hamburg, Njemačka). Razlike između više ispitivanih skupina izračunate su primjenom neparametarijskih testova Kruskal-Wallis i post-hoc Dunn (MedCalc Statistical verzija 20.011; MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgija). Statistički značajna razlika definirana je kao $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Izražaj, raspodjela, fenotip, polarizacija i elementi oksidacijskog stresa u CD68+ stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena

4.1.1. Izražaj i raspodjela CD68⁺ stanica i limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Imunohistokemijskim obilježavanjem dokazana je prisutnost CD68⁺ stanica u tkivu sinovijske membrane zrelog OA-a koljena (Slika 13).



Slika 13. Izražaj CD68 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje metodom imunoperoksidaze s mišjim IgG1 protu-CD68 monoklonskim protutijelima (A i B) prikazano je smeđom bojom 3'3-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja protutijela za antigen (označeno crvenim strelicama). Kontrola jesu mišja IgG1 protutijela irelevantne specifičnosti (C i D). Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Izvorno povećanje je $\times 400$. Grafikon (E) prikazuje broj CD68⁺ stanica po srednjem povećanju mikroskopa ($\times 400$) izbrojen od tri neovisna istraživača. Analizirano je dvadeset osam uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); Ig- Imunoglobulin.

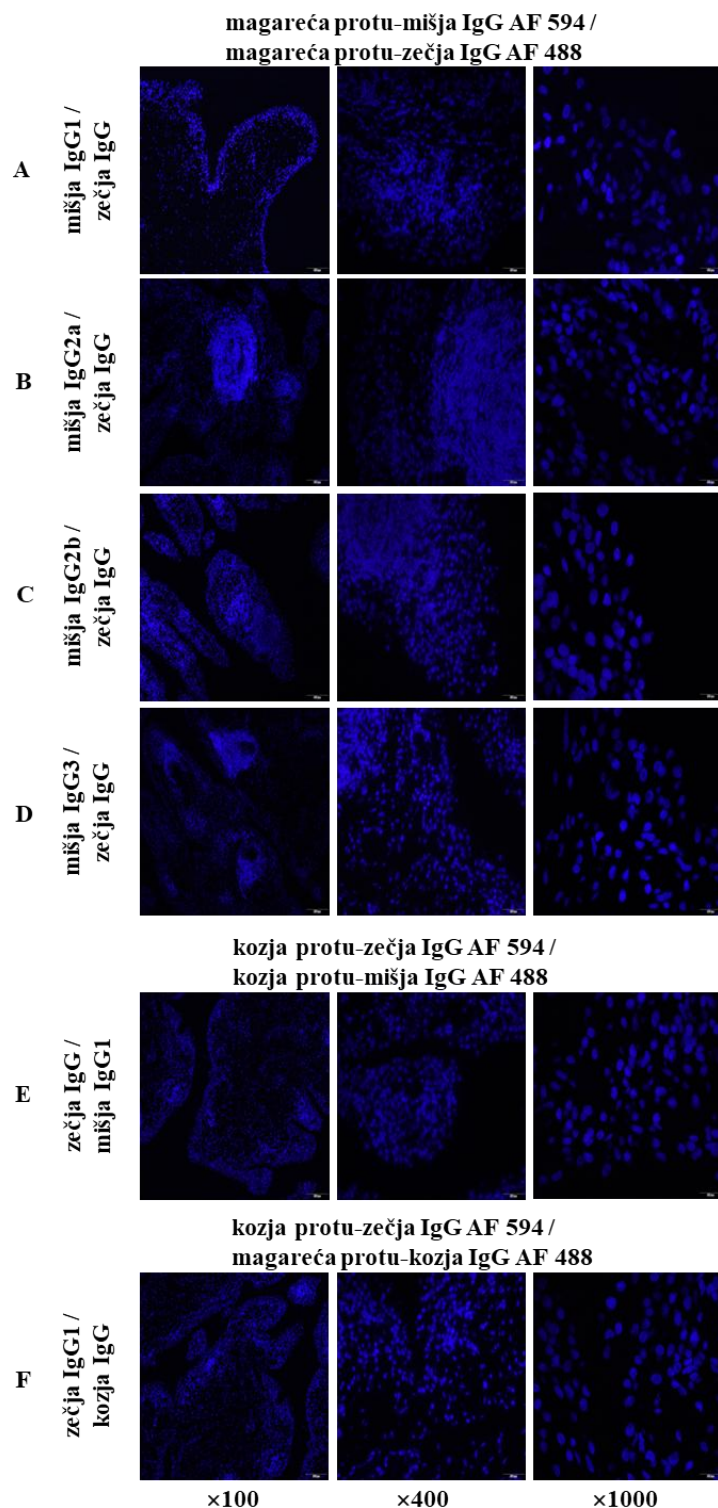
CD68⁺ stanice nalazimo u jednom sloju na površini razgranatih sinovijskih izdanaka (Slika 13A, označeno crvenim strelicama). U stromi izdanaka CD68⁺ stanice nalaze se u središtima nakupina limfocita (Slika 13B, označeno crvenim strelicama). Pozitivne CD68 stanice određene su prema kontroli istog podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 13C i

D). Stupići grafikona E prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju broja sinovijskih CD68⁺ stanica po jednom vidnom polju srednjeg povećanja ($\times 400$) izbrojenih od tri neovisna istraživača. Izbrojene vrijednosti se nisu međusobno statistički značajno razlikovale, a srednja vrijednost broja CD68⁺ stanica svih triju istraživača je iznosila 35 ± 21 stanica.

4.1.2. Kontrole irelevantne specifičnosti korištene kao negativne kontrole kod dokazivanja biljega od interesa u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena metodom dvostruke imunofluorescencije

Kombinacije primarnih protutijela koje su korištene za obilježavanje biljega od interesa metodom dvostruke imunofluorescencije tkivnih rezova navedene su u Tablici 3. Slika 14. prikazuje obilježavanja kontrola irelevantne specifičnosti čije kombinacije protutijela odgovaraju kombinacijama protutijela specifičnih za biljege od interesa uz primjenu odgovarajućih sekundarnih protutijela obilježenih s fluorokromom za vizualizaciju. Na temelju kontrola irelevantne specifičnosti određena je pozitivnost biljega od interesa. Slika 14A prikazuje kombinaciju mišjeg IgG1/zečjeg IgG irelevantne specifičnosti što odgovara podrazredu i razredu protutijela korištenih u obilježavanjima CD68/CD3, GNLY/CD68, CD68/4-HNE, CD91/CD68 i GNLY/CD56 biljega. Slika 14B prikazuje kombinaciju mišjeg IgG2a/zečjeg IgG irelevantne specifičnosti što odgovara podrazredu i razredu protutijela korištenih u obilježavanju CD14/CD68 biljega. Slika 14C prikazuje kombinaciju mišjeg IgG2b/zečjeg IgG irelevantne specifičnosti što odgovara podrazredu i razredu protutijela korištenih u obilježavanjima TLR4/CD68 i perforin/CD56 biljega. Slika 14D prikazuje kombinaciju mišjeg IgG3/zečjeg IgG irelevantne specifičnosti što odgovara podrazredu i razredu protutijela korištenih u obilježavanju arginaza-1/CD68 biljega. Magareće protu-mišje IgG Alexa Flour (AF) 594 (crvena fluorescencija) i magareće protu-zečje IgG AF 488 (zelena fluorescencija) korištena su kao sekundarna protutijela za vizualizaciju kombinacija primarnih protutijela (Slika 14A - D). Slika 14E prikazuje kombinaciju zečjeg IgG/mišjeg IgG1 irelevantne specifičnosti što odgovara razredu i podrazredu protutijela korištenih u obilježavanjima CD56/CD68, iNOS/CD68, APAF-1/CD68 i NF- κ B/CD68 biljega. Za vizualizaciju korištena su sekundarna protutijela kozja protu-zečja IgG AF 594 (crvena fluorescencija) i kozja protu-mišja AF 488 (zelena fluorescencija). Slika 14F prikazuje kombinaciju zečjeg IgG1/kozjeg IgG irelevantne specifičnosti što odgovara podrazredu i razredu protutijela korištenih u obilježavanju CD68/LXR biljega. Kozja protu-zečja IgG AF

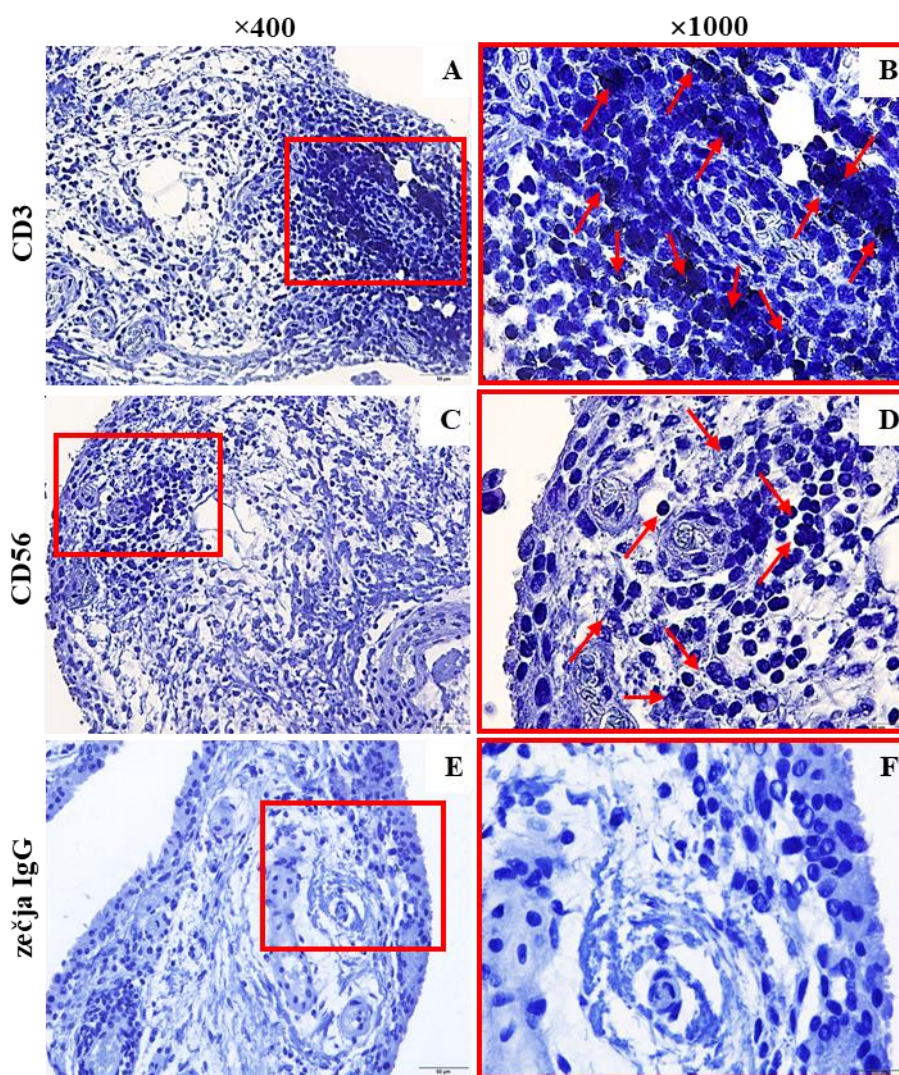
594 (crvena fluorescencija) i magareća protu-kozja IgG AF 488 (zelena fluorescencija) sekundarna protutijela su korištena za vizualizaciju.



Slika 14. Izražaj CD68 u sinovijalnoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Kombinacije protutijela (Pt) odgovaraju razredima ili podrazredima primarnih Pt koja su korištena za obilježavanje biljega od interesa. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je ×100, ×400 odnosno ×1000. AF- Alexa Flour; AF 594- crvena fluorescencija; AF 488- zelena fluorescencija; Ig- Imunoglobulin.

4.1.3. Izražaj i raspodjela CD3+ i CD56+ limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

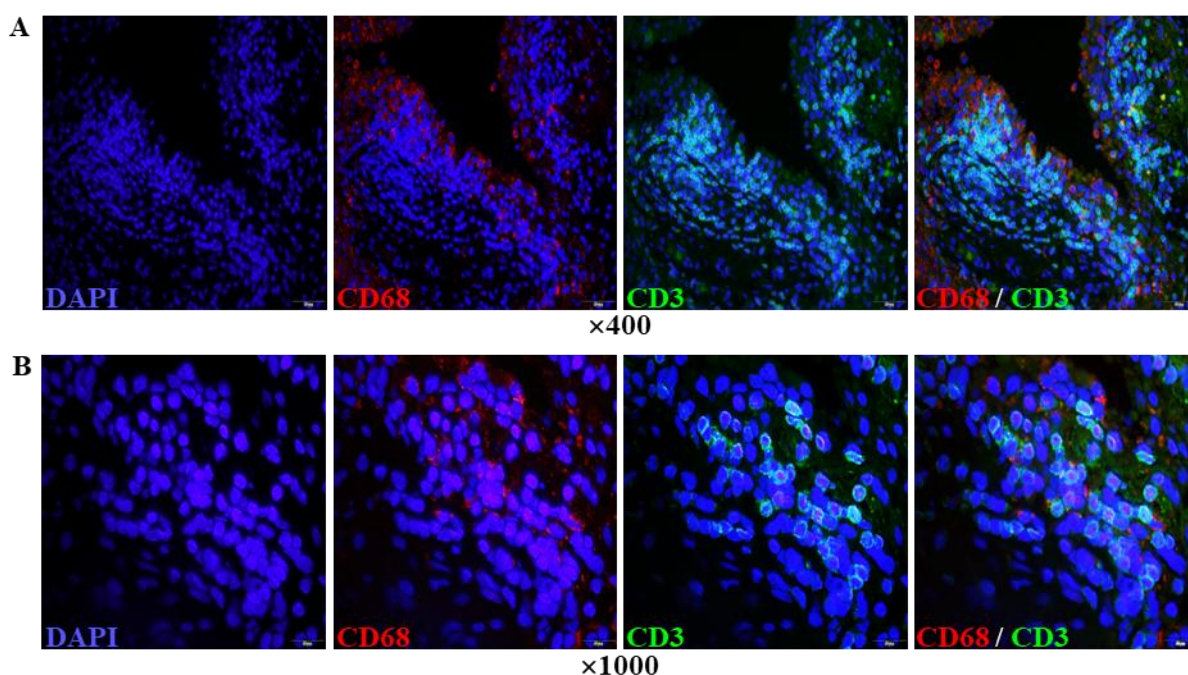
Izražaj i raspodjela CD3+ i CD56+ stanica limfocita u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena analizirana je imunohistokemijskim obilježavanjem (Slika 15). CD3+ stanice (Slika 15A i B) i CD56+ stanice (Slika 15C i D) označene su crvenom strelicom. Najveći broj CD3+ i CD56+ stanica nalazi se u okolini krvnih žila strome izdanaka sinovijske membrane. Pozitivnost CD3 i CD56 biljega određen je prema protutijelima istog razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 15E i F).



Slika 15. Izražaj CD3+ i CD56+ limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa zečjim protu-CD3 IgG (A i B) te zečjim protu-CD56 IgG protutijelima (Pt) (C i D) prikazano je smeđom bojom 3'3-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja Pt za antigen. Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu zečja IgG Pt irelevantne specifičnosti (E i F). Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno osam uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); Ig- Imunoglobulin.

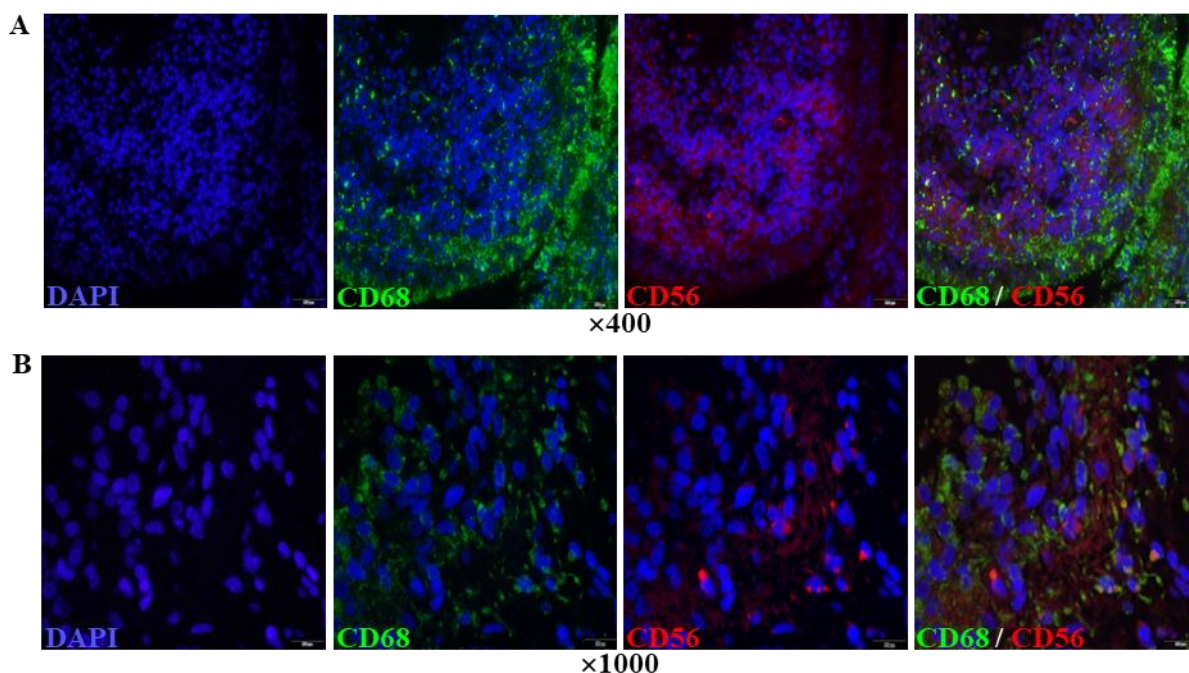
4.1.4. Tkivni međuodnos CD68+ stanica s CD3+ i CD56+ limfocitima u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Tkivni međuodnos CD68+ stanica s CD3+ limfocitima (Slika 16) prikazan je metodom dvostruke imunofluorescencije pri povećanju $\times 400$ (Slika 16A) i $\times 1000$ (Slika 16B). Međuodnos CD68+ stanica (crvena fluorescencija) s CD3+ limfocitima (zeleno fluorescencija) pokazuje da su CD68+ stanice smještene u neposrednoj blizini CD3+ limfocita.



Slika 16. Tkivni međuodnos CD68+ stanica s CD3+ limfocitima u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira crveno, a vezanje zečjeg IgG protu-CD3 Pt fluorescira zeleno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 594 i magarećeg protu-zečjeg IgG Pt obilježenog s AF 488. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$ (A) odnosno $\times 1000$ (B). Prikazan je jedan od osam obilježanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

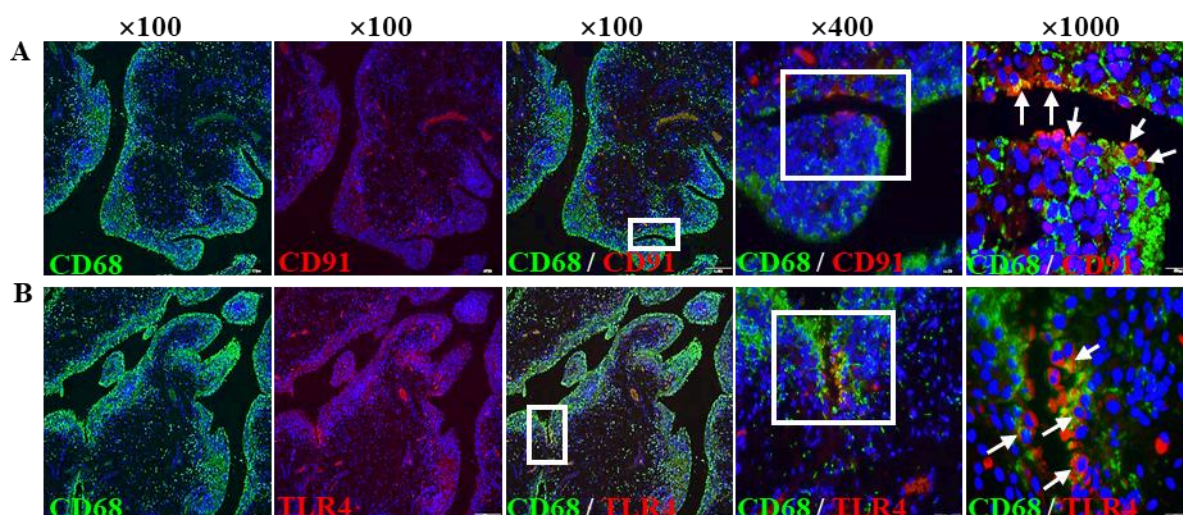
Tkivni međuodnos CD68+ stanica (zeleno fluorescencija) s CD56+ limfocitima (crvena fluorescencija) (Slika 17) prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije pri povećanju $\times 400$ (Slika 17A) i $\times 1000$ (Slika 17B) pokazuje da su CD68+ stanice također okružene s CD56+ limfocitima te da među njima postoji blizak međusobni dodir (Slika 17A i B). Pozitivni rezultati imunofluorescencije za CD68 i CD3 te za CD68 i CD56 biljege određeni su prema kontrolama istog podrazreda odnosno razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14A).



Slika 17. Tkivni međuodnos CD68⁺ stanica s CD56⁺ limfocitima u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje zečjeg IgG protu-CD56 Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije kozjeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i kozjeg protu-zečjeg IgG obilježenog s AF 594 protutijelima. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$ (A) odnosno $\times 1000$ (B). Prikazan je jedan od osam obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. CD-Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

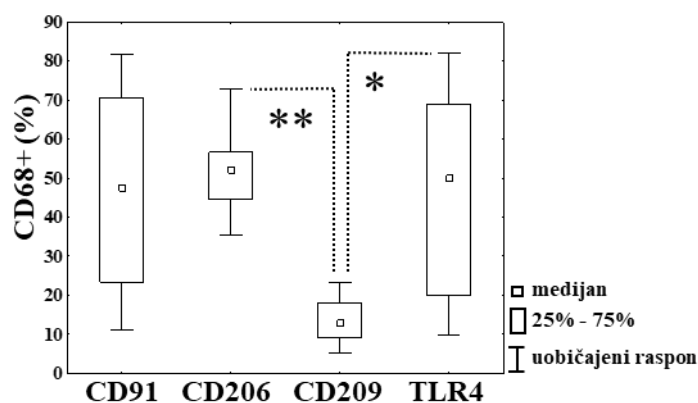
4.1.5. Izražaj receptora za prepoznavanje uzoraka, kostimulacijskih receptora, CD14 molekule i Hsp70 na CD68⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Metodom dvostruke imunofluorescencije prikazan je izražaj receptora za prepoznavanje uzoraka CD91 (Slika 18A) i TLR4 (Slika 18B) na CD68⁺ stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena. CD68⁺ stanice (zeleno fluorescencija) u značajnoj se mjeri raspoređuju na površini sinovijskih izdanaka. CD91 (crvena fluorescencija) i TLR4 (crvena fluorescencija) izraženi su također na površini sinovijskih izdanaka. Brojne dvostruko pozitivne CD68⁺CD91⁺ (Slika 18A) i CD68⁺TLR4⁺ (Slika 18B) stanice (žuta fluorescencija) označene su bijelim strelicama. Na temelju kontrolnih protutijela istog razreda odnosno podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti određeni u pozitivni rezultati fluorescencije za CD68 i CD91 (Slika 14A) te za CD68 i TLR4 (Slika 14C).



Slika 18. Izražaj receptora za prepoznavanje uzoraka CD91 i TLR4 na CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje zečjeg protu-CD68 IgG protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje mišjeg IgG1 protu-CD91 Pt (A) ili mišjeg IgG2b protu-TLR4 Pt (B) fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594. Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom (označeno bijelim strelicama). Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 100$, $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Prikazan je jedan od šest obilježanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation); TLR4 - Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

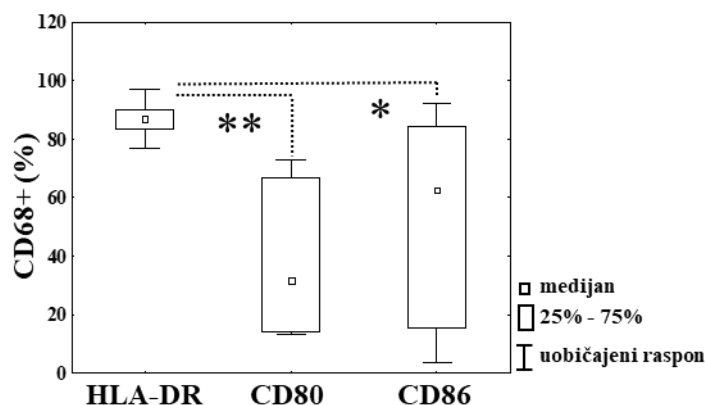
Metodom protočne citometrije, u svježe izdvojenim CD68+ stanicama sinovijske membrane, analizirani su receptori za prepoznavanje uzoraka CD91, CD206, CD209 i TLR4 (Slika 19).



Slika 19. Učestalost izražaja receptora za prepoznavanje uzoraka CD91, CD206, CD209 i TLR4 na CD68+ stanicama u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena. Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$; $**P = 0,006$. Statistička analiza je učinjena na broju od 6-12 uzoraka po pojedinoj grupi (Kruskal-Wallis test i post-hock Dunn test). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation); TLR4 - Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

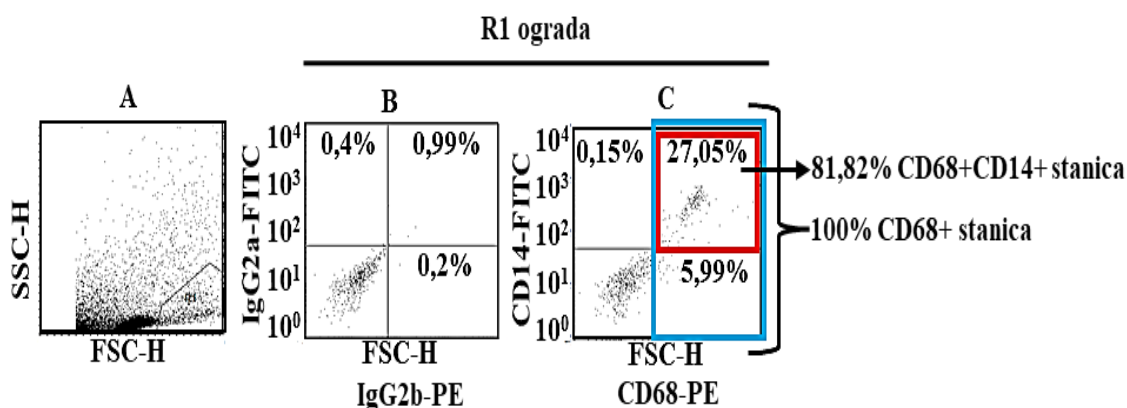
CD68+ stanice izražavaju CD206 52,1% (44,6 - 56,6 %) [median (25. - 75. percentil)] i TLR4 50% (20,3 - 64,2%) što je statistički značajno više u odnosu na CD209 12,9% (9,1 - 18,1%) ($P = 0,006$ odnosno $P = 0,01$). CD68+ stanice izražavaju CD91 biljeg 47,4 % (25,6 – 69,9%) i taj se postotak statistički značajno ne razlikuje od izražaja CD206 i TLR4.

Izražaj HLA-DR i kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 za predočavanje antigena limfocitima T na svježe izdvojenim CD68+ stanicama sinovijske membrane zrelog OA koljena prikazani su na Slici 20. HLA-DR biljeg izražen je na 86,2% (83,5 – 89,3%) CD68+ stanica, dok je izražaj kostimulacijskih molekula CD80 iznosio 31,8% (13,5 – 67%) odnosno CD86 62,5% (15,9 – 84,2%). Izražaj HLA-DR na CD68+ stanicama statistički je značajno viši u odnosu na CD80 i CD86 ($P = 0,00001$ odnosno $P = 0,001$).



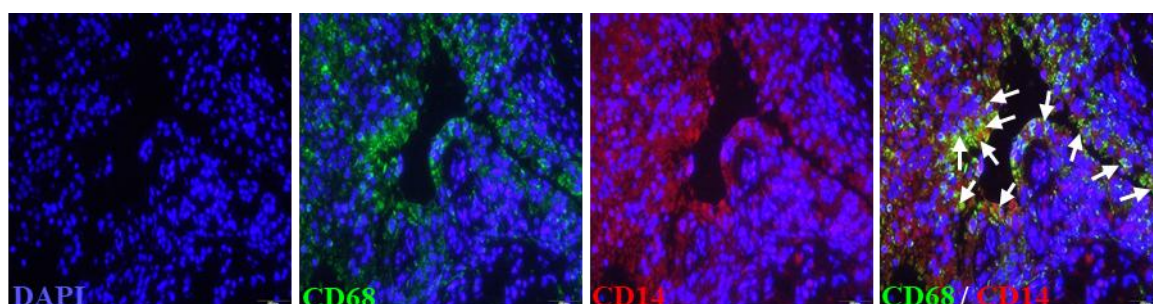
Slika 20. Učestalost izražaja HLA-DR i kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na CD68+ stanicama iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena. Površinski biljezi obilježeni su dvostrukom imunofluorescencijom uz očitavanje protočnim citometrom. Razina statističke značajnosti je * $P = 0,001$; ** $P = 0,00001$. Statistička analiza je učinjena na 6-10 neovisnih uzoraka po pojedinoj grupi (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation); HLA-DR- Humani leukocitni antigen- DR (od eng. Human Leukocyte Antigen- DR).

Slika 21. prikazuje izražaj signalne molekule CD14 na CD68+ stanicama u suspenziji svježe izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena, koje se prikazuju unutar R1 ograde temeljem svojih svojstava veličine (FSC, od eng. Forward scatter) i složenosti građe (SSC, od eng. Side scatter) (Slika 21A). Protutijela iste podvrste i irelevantne specifičnosti (IgG2a i IgG2b) vezala su se manje od 1% za ogradae stanice (Slika 21B). Graf C prikazuje 27,05% dvostruko pozitivnih CD14+CD68+ stanica. Oduzimajući kontrolnu vrijednost (0,99%) od broja učestalosti CD14+CD68+ stanica dobije se 26,06% dvostruko pozitivnih stanica unutar crvenog kvadrata. To predstavlja 81,82% svih CD68+stanica koje izražavaju CD14 signalnu molekulu unutar plavog kvadrata (Slika 21C).



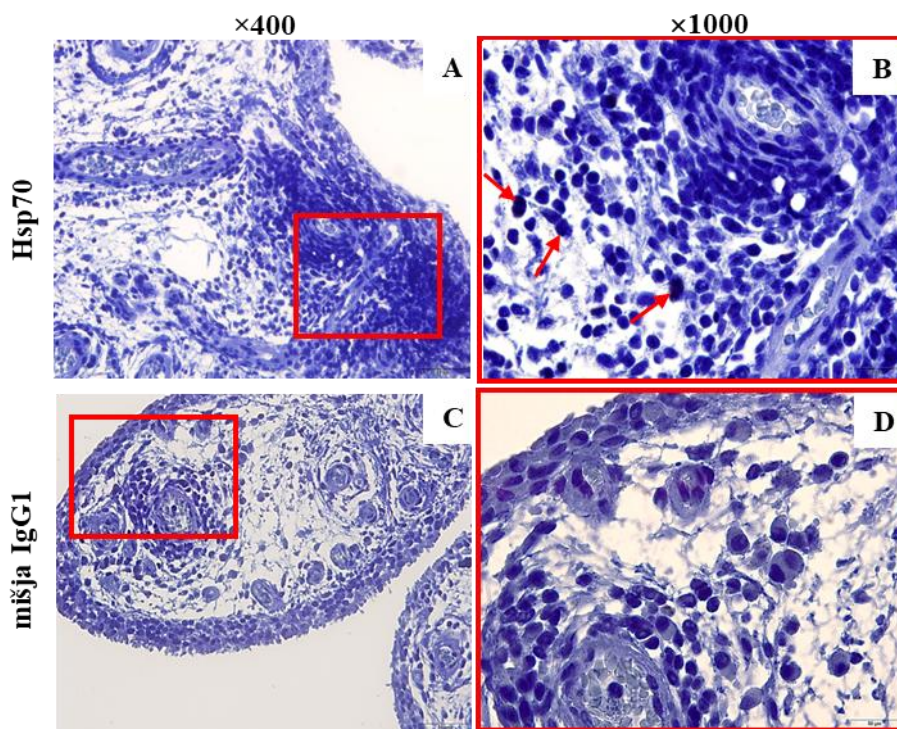
Slika 21. Izražaj signalne molekule CD14 na CD68+ stanicama u suspenziji svježe izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena. Ograda R1 je postavljena na točkastom grafu A apcise FSC (od eng. Forward scatter) i ordinate SSC (od eng. Side scatter). Točkasti graf B predstavlja dvostruko obilježavanje kontrolnim protutijelima (Pt) irelevantne specifičnosti [mišja IgG2a konjugirana s fluorescein izotiocijanatom (FITC)/mišja IgG2b konjugirana s fikoeritriinom (PE)]. Graf C predstavlja obilježavanje CD14 s protu-CD14 Pt konjugiranim s FITC-om i obilježavanje CD68 molekule s protu-CD68 konjugiranim s PE-om. Brojevi u kvadrantima označavaju postotak pozitivnih stanica. Prikazan je jedan od ukupno šest učinjenih neovisnih uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation); Ig- Imunoglobulin.

Primjenom metode dvostruke imunofluorescence zorno je predložen izražaj biljega CD14 na CD68+ stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena (Slika 22). CD68+ (zelena fluorescencija) i CD14+ (crvena fluorescencija) stanice nalazimo na površini sinovijskih izdanaka uz brojne dvostruko pozitivne CD68+CD14+ stanice (žuta fluorescencija) označene bijelim strelicama. Pozitivni rezultati fluorescencije za CD68 i CD14 određeni su prema kontroli istog razreda odnosno podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14B).



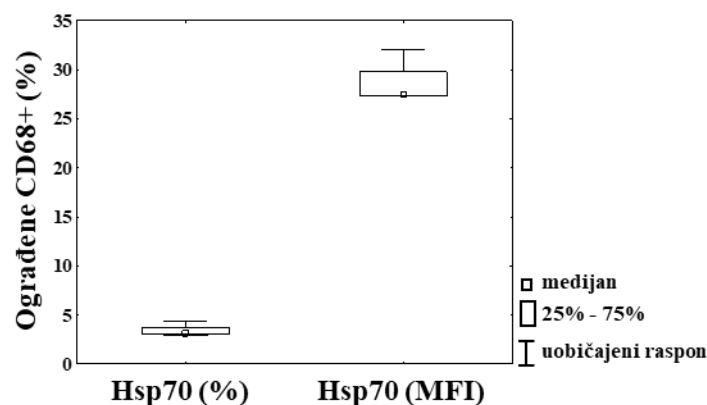
Slika 22. Izražaj CD14 molekule za prijenos signala na CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje zečjeg protu-CD68 IgG protutijela (Pt) fluorescira zeleno a vezanje mišjeg IgG2a protu-CD14 Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594. Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$. Prikazan je jedan od četiri obilježavanih uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

Imunohistokemijskim obilježavanjem prikazan je izražaj i raspodjela Hsp70 u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena (Slika 23A i B). Izražaj Hsp70 izražen je u stanicama limfocita u područjima limfocitnih nakupina strome sinovijske membrane (obilježeno crvenim strelicama) i prikazuje se u vidu zrnaca kao nuklearno i citoplazmatsko obilježavanje. Pozitivnost Hsp70 biljega određena je prema kontroli istog podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 23C i D).



Slika 23. Izražaj Hsp70 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa mišjim protu-Hsp70 IgG1 protutijelima (Pt) (A i B) prikazano je smeđom bojom 3'3'-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja Pt za antigen. Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu mišja IgG1 Pt irelevantne specifičnosti (C i D). Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno šest uzoraka. Hsp70- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. Heat Shock Protein 70); Ig- Imunoglobulin.

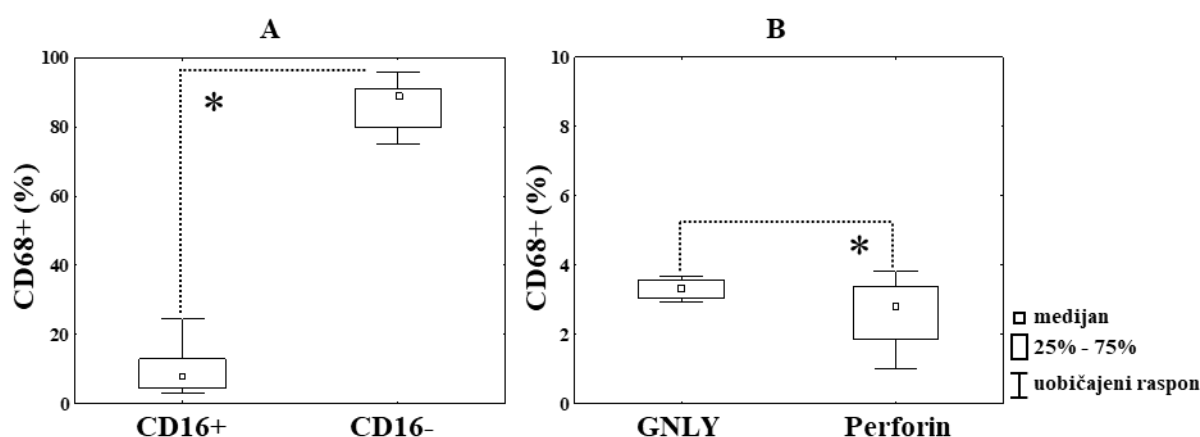
Unutarstanični izražaj Hsp70 u svježe izdvojenim CD68⁺ stanicama sinovijske membrane zrelog OA koljena metodom protočne citometrije prikazan je na Slici 24. Izraženo u postocima, manje od 5% CD68⁺ stanica izražava Hsp70, a srednji intenzitet fluorescencije ili MFI za Hsp70 također je nizak i iznosi od 25-30.



Slika 24. Učestalost izražaja Hsp70 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Obilježavanje površinskog (CD68) i unutarstaničnog (Hsp70) biljega učinjeno je dvostrukom imunofluorescencijom uz očitavanje protočnim citometrom. Rezultati su izraženi kao postotak (%) i srednji intenzitet fluorescencije ili MFI (od eng. Mean Fluorescence Intensity). Analiza je učinjena na 5 neovisnih uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); Hsp70- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. Heat Shock Protein 70).

4.1.6. Izražaj citotoksičnog receptora CD16 i citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina na/u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

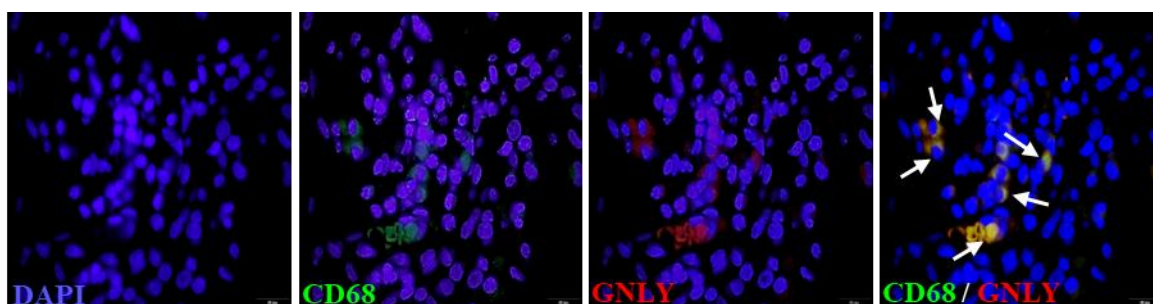
Iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena metodom protočne citometrije analiziran je izražaj površinskog citotoksičnog receptora CD16 na CD68+ stanicama (Slika 25A). Većina CD68+ stanica nije izražavala CD16. Učestalost CD68+ stanica koje su izražavale CD16 receptor iznosila je 8,1% (4,5-12%). Statistički značajna razlika među navedenim skupinama iznosila je $P = 0,01$.



Slika 25. Učestalost izražaja citotoksičnog receptora CD16 (A) te citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina (B) na/u CD68+ stanicama iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena protočnom citometrijom. Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$. Statistička analiza je učinjena u 6-12 uzoraka po pojedinoj grupi (Mann Whitney U test). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); GNLY- Granulizin.

Izražaj GNLY-a i perforina u CD68⁺ stanicama prikazana je na Slici 25B. CD68⁺ stanice izražavale su svega oko 3% citotoksičnog posrednika GNLY-a i to je bilo statistički značajno više u odnosu na izražaj citotoksične bjelančevine perforina ($P=0,01$).

Izražaj GNLY-a u CD68⁺ stanicama zorno je prikazan dvostrukom imunofluorescencijom na Slici 26. CD68⁺ stanice (zelena fluorescencija) u čijoj je citoplazmi izražen GNLY u vidu zrnaca (crvena fluorescencija) su rijetke, prikazane kao dvostruko pozitivne CD68⁺GNLY⁺ stanice (žuta fluorescencija) i označene bijelim strelicama. Pozitivna fluorescencija za biljege CD68 i GNLY određena je na temelju kontrole istog razreda odnosno podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14A).

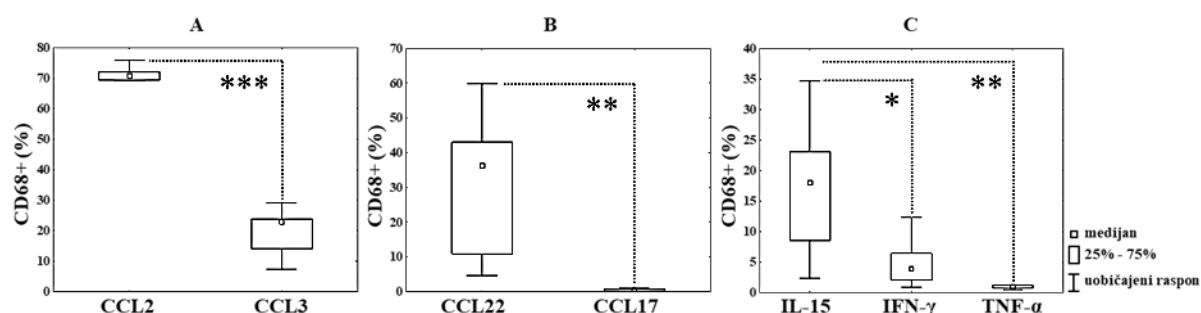


Slika 26. Izražaj GNLY-a u CD68⁺ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije. Vezanje zečjeg protu-CD68 IgG protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje mišjeg IgG1 protu-GNLY Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594. Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom (označeno bijelim strelicama). Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 1000$. Prikazan je jedan od 10 obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); GNLY- Granulizin.

4.1.7. Izražaj kemokina u CD68⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

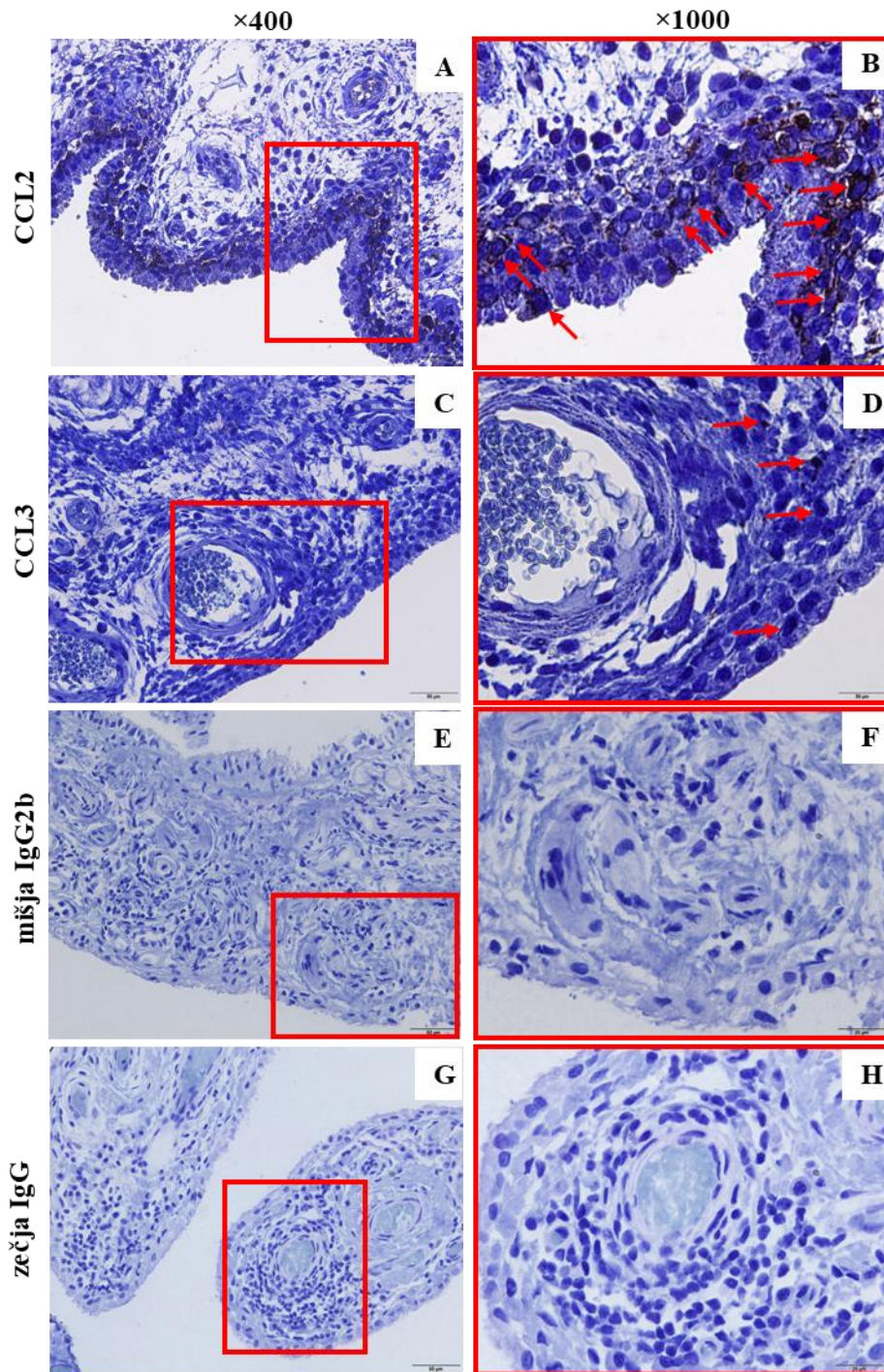
Slika 27 prikazuje rezultate unutarstaničnog obilježavanja citokina i kemokina u CD68⁺ stanicama iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom. Najveći je udio CD68⁺ stanica koje izražavaju CCL2 [71% (69,3 - 71,8%)] što je statistički značajno više u odnosu na izražaj CCL3 [22,9% (15,2 - 37,5%)] ($P = 0,001$) (Slika 27A). Analiza protuupalnih kemokina CCL22 i CCL17 u CD68⁺ stanicama koji reguliraju kemotaksiju Th2 polariziranih limfocita, pokazala je statistički značajno veći izražaj CCL22 [41,3% (16,9 – 42,4%)] u odnosu na neznatni izražaj CCL17 ($P = 0,005$) (Slika 27B). Od

proupalnih citokina koji reguliraju aktivaciju i proliferaciju stanica NK analizirani su IL-15, IFN- γ i TNF- α (Slika 27C). Izražaj IL-15 u CD68+ stanicama iznosio je 18,2% (10,5 – 21,9%) što je statistički značajno više u odnosu na neznatni izražaj IFN- γ ($P = 0,01$) i TNF- α ($P = 0,005$).



Slika 27. Učestalost izražaja proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 (A), protuupalnih kemokina CCL22 i CCL17 (B) te proupalnih monokina IL-15, IFN- γ i TNF- α (C) u CD68+ stanicama. Analiza je učinjena iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena prikazanih obilježavanjem površinskih i unutarstaničnih biljega dvostrukom imunofluorescencijom uz očitavanje protočnim citometrom. Razine statističke značajnosti su * $P = 0,01$; ** $P = 0,005$; *** $P = 0,001$. Statistička analiza je učinjena na broju od 6-10 neovisnih uzoraka po pojedinoj grupi (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); IL- Interleukin; IFN- γ - Interferon gama; TNF- α - Čimbenik nekroze tumora alfa (od eng. Tumor Necrosis Factor alpha).

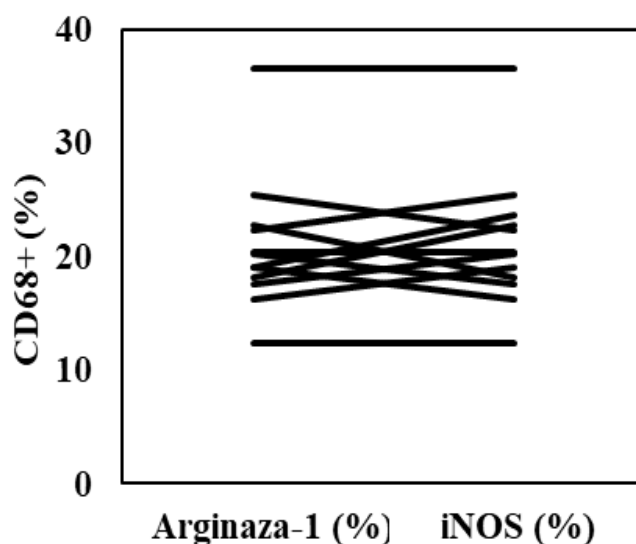
Imunohistokemijskim obilježavanjem prikazan je izražaj proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 u tkivu sinovijske membrane zrelog OA-a koljena (Slika 28). CCL2 je izražen na površini sinovijskih izdanaka (Slika 28A i B, označeno crvenim strelicama). CCL3 također dominantno nalazimo na površini sinovijskih izdanaka (Slika 28C i D, označeno crvenim strelicama), međutim uz znatno slabiji izražaj u odnosu na CCL2 u vidu tek nekoliko CCL3 obilježenih stanica. Na temelju kontrola istog podrazreda odnosno razreda protutijela irelevantne specifičnosti određene su CCL2+ (Slika 28E i F) i CCL3+ (Slika 28G i H) stanice.



Slika 28. Izražaj CCL2 i CCL3 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje s mišjim IgG2b protu-CCL2 (A i B) i zečjim IgG protu-CCL3 (C i D) protutijelom (Pt) prikazano je smeđom bojom 3'3-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja Pt za antigen i označeno crvenim strelicama unutar pravokutne ograde. Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu mišja IgG2b (E i F) i zečja IgG Pt (G i H) irelevantne specifičnosti. Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Prikazan je jedan od učinjenih ukupno šest uzoraka u svakoj grupi. CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand); Ig-Imunoglobulin.

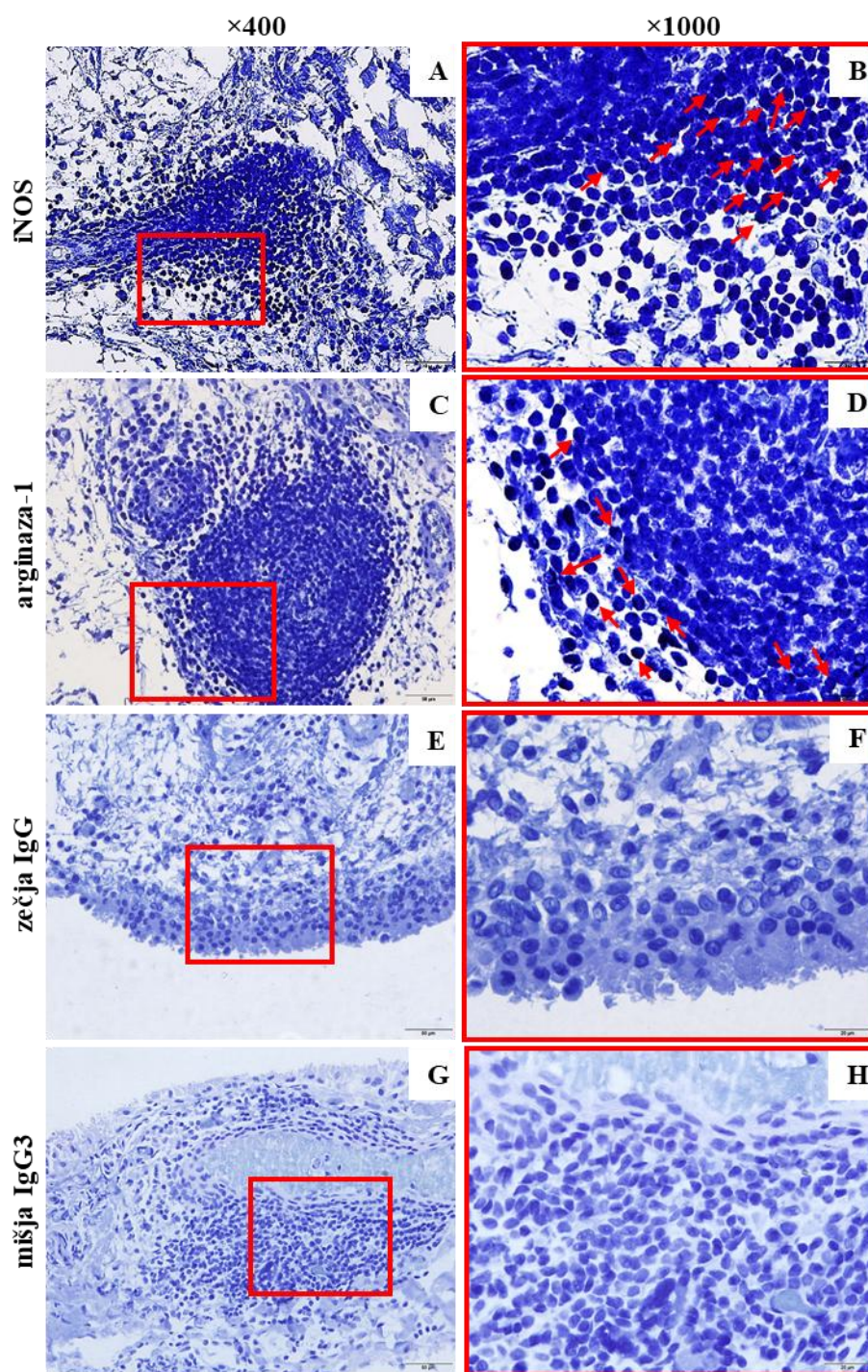
4.1.8. Izražaj arginaze-1 i iNOS biljega u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Polarizacija CD68⁺ stanica u suspenziji svježih mononuklearnih stanica sinovijske membrane ispitivana je unutarstraničnim obilježavanjem M2 biljega arginaze-1 i M1 biljega iNOS (Slika 29.) Oba biljega su izražena u podjednakom omjeru.



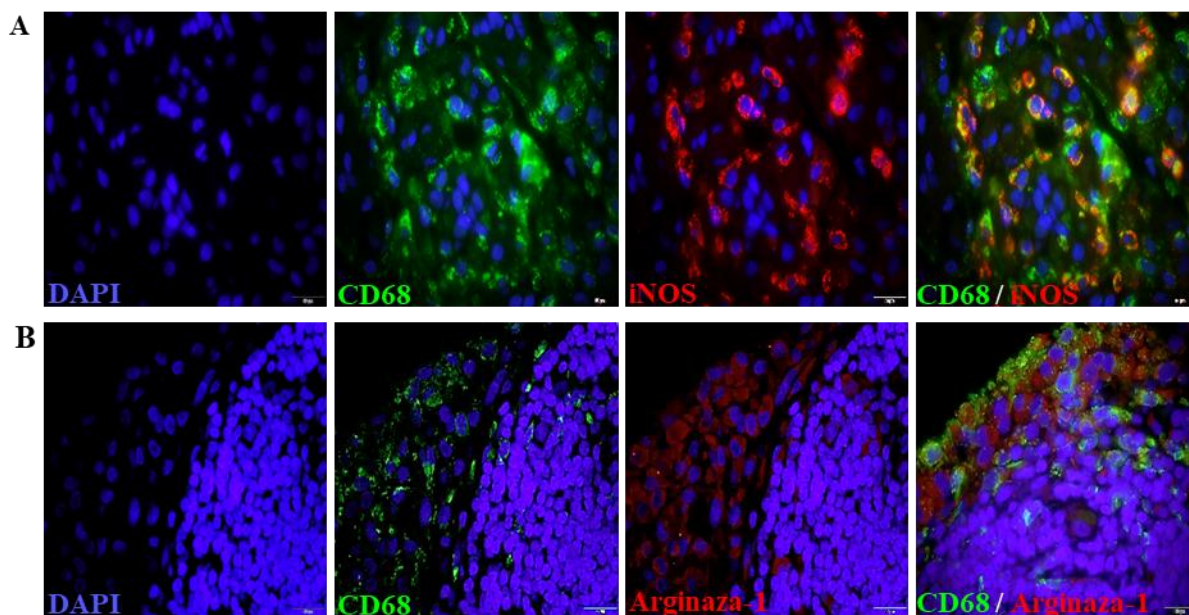
Slika 29. Učestalost izražaja i međuodnos M2 biljega arginaze-1 i M1 biljega iNOS u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena. Prikazani unutarstanični biljezi obilježeni su dvostrukom imunofluorescencijom uz očitavanje protočnim citometrom na 11 neovisnih uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. inducible Nitric Oxide Synthase).

Izražaj iNOS⁺ i arginaza-1⁺ stanica u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena jednostrukim imunohistokemijskim obilježavanjem prikazan je na Slici 30. iNOS⁺ stanice (Slika 30A i B, označene crvenim strelicama) obilno su prisutne u nakupinama limfocita u stromi sinovijske membrane. Arginaza-1⁺ stanice (Slika 30C i D, označeno crvenim strelicama) izražene su u većem broju na površini sinovijskih izdanaka. Na temelju kontrolnog obilježavanja protutijelima istog razreda odnosno podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti određene su iNOS⁺ (Slika 30E i F) odnosno arginaza-1⁺ stanice (Slika 30G i H).



Slika 30. Izražaj M1 biljega iNOS i M2 biljega arginaza-1 u sinovijalnoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa zečjim IgG protu-iNOS (A i B) i mišjim IgG3 protu-arginaza-1 protutijelom (Pt) (C i D) prikazano je smeđom bojom 3'3-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja protutijela za antigen i označeno crvenim strelicama unutar pravokutne ograde. Jezgre su obojene hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrole su zečja IgG (E i F) i mišja IgG3 Pt-a (G i H) irelevantne specifičnosti. Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno 11 uzoraka u svakoj grupi. Ig- Imunoglobulin; iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. inducible Nitric Oxide Synthase).

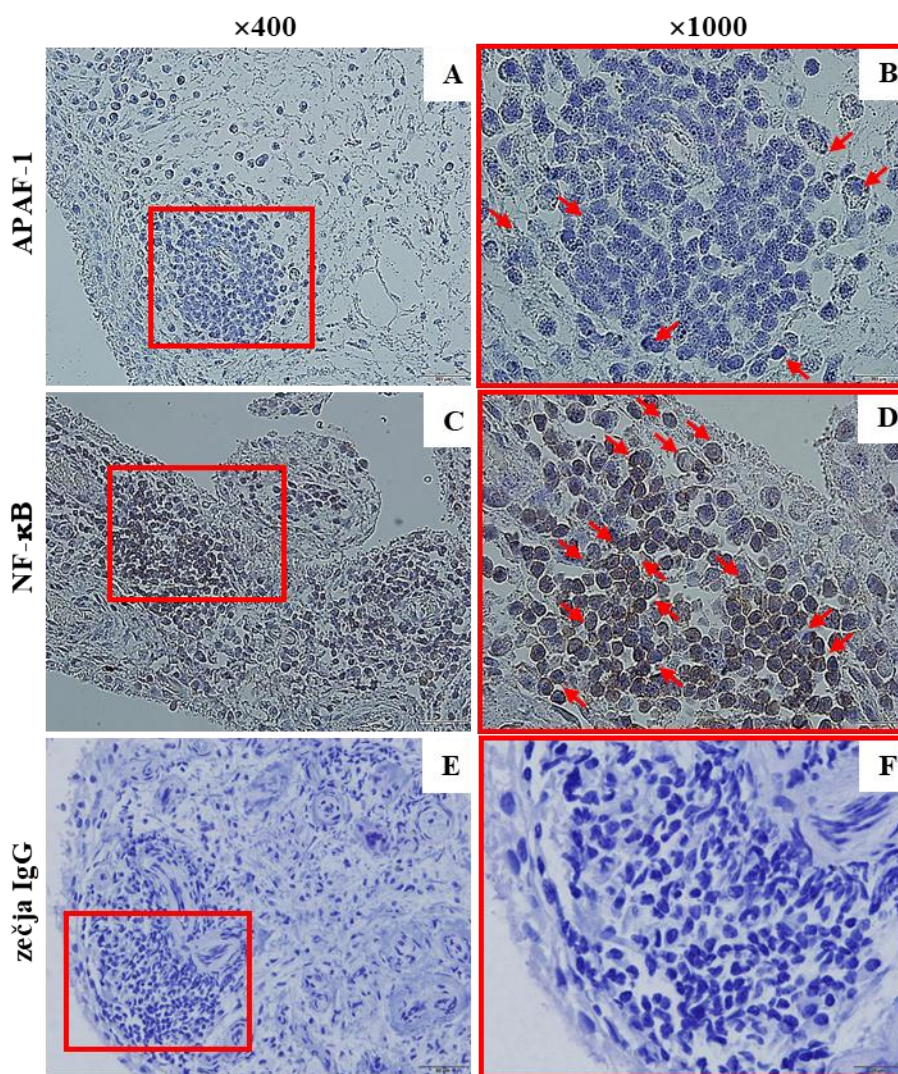
Izražaj M1 biljega iNOS i M2 biljega arginaza-1 u CD68+ stanicama analiziran je metodom dvostruke imunofluorescence (Slika 31). Brojne CD68+ stanice (zelena fluorescencija) izražavaju biljeg iNOS (crvena fluorescencija) što je vidljivo na temelju velikog broja dvostruko pozitivnih CD68+iNOS+ stanica (Slika 31A) prikazano žutom fluorescencijom u nakupinama limfocita u stromi izdanaka sinovijske membrane. Velik broj CD68+ stanica (zelena fluorescencija) izražava i arginaza-1 biljeg (crvena fluorescencija) što je također vidljivo na temelju žute fluorescencije brojnih dvostruko pozitivnih CD68+arginaza-1+ stanica (Slika 31B), ali na samoj površini izdanaka sinovijske membrane. Pozitivna fluorescencija određena je na temelju kontrola istog razreda odnosno podrazreda irelevantne specifičnosti za CD68 i iNOS (Slika 14A) te za za CD68 i arginaza-1 (Slika 14D).



Slika 31. Izražaj iNOS i arginaze-1 u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje zečjeg IgG protu-iNOS Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije kozjeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i kozjeg protu-zečjeg IgG Pt obilježenog s AF 594 (A). Vezanje zečjeg IgG protu-CD68 fluorescira zeleno, a vezanje mišjeg IgG3 protu-arginaza-1 Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s AF 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594 (B). Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 1000$. Prikazan je jedan od 10 obilježanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od eng. inducible Nitric Oxide Synthase).

4.1.9. Izražaj APAF-1 i NF- κ B biljega u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

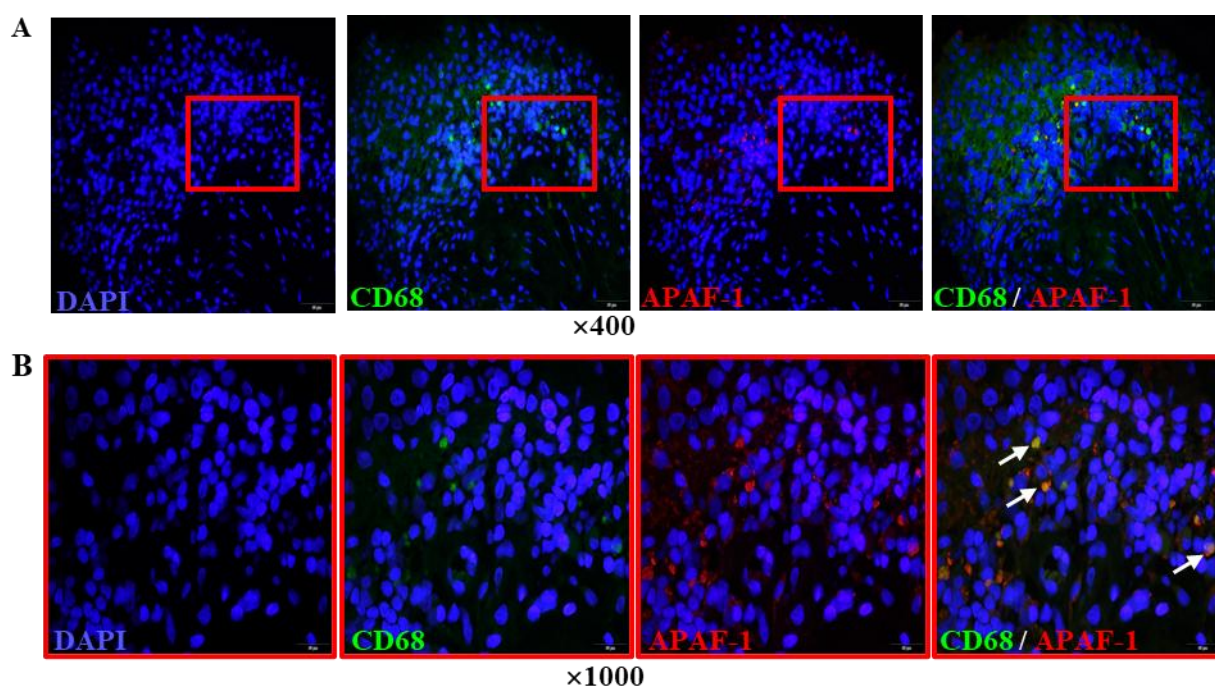
Izražaj APAF-1 i NF- κ B u sinovijskoj membrani zorno je prikazan metodom imunohistokemije (Slika 32). Izražaj APAF-1 (Slika 32A i B, označeno crvenim strelicama) očituje se kao citoplazmatsko i nuklearno zrnato obilježavanje u manjem broju stanica limfocita u područjima limfocitnih nakupina strome sinovijskih izdanaka.



Slika 32. Izražaj APAF-1 i NF- κ B u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa zečjim IgG protu-APAF-1 (A i B) i zečjim IgG protu-NF- κ B (C i D) protutijelima (Pt) prikazano je smeđom bojom 3'3-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja Pt za antigen. Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu zečja IgG Pt irelevantne specifičnosti (E i F). Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno osam uzoraka u svakoj grupi. APAF-1- Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1 (od engl. Apoptotic Protease Activating Factor-1); Ig- Imunoglobulin; NF- κ B- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa B).

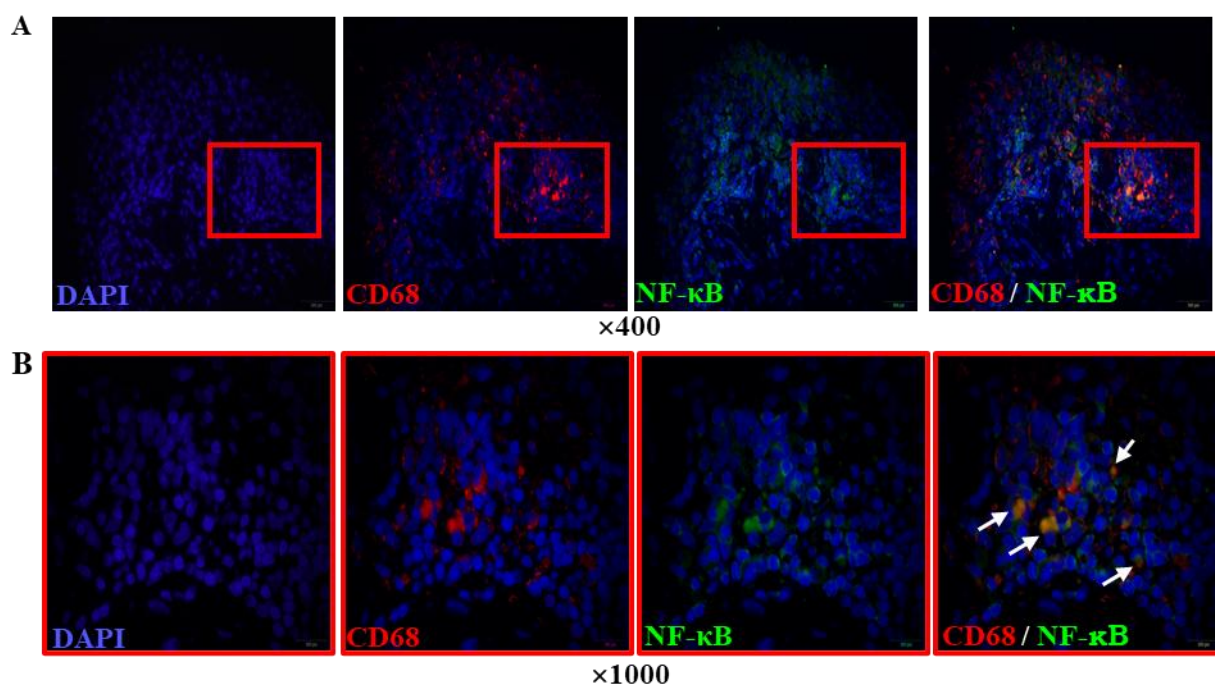
NF- κ B također se prikazuje kao citoplazmatsko i nuklearno obilježavanje jačeg inteziteta u većem broju stanica limfocita u područjima limfocitnih nakupina strome i površinskom sloju sinovijskih izdanaka (Slika 32 C i D, označeno crvenim strelicama). Pozitivan izražaj APAF-1 i NF- κ B određen je prema kontroli istog razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 32E i F).

Metodom dvostruke imunofluorescencije prikazan je izražaj APAF-1, ključne molekule u aktivaciji unutarstaničnog signalnog puta apoptoze, u CD68⁺ stanicama (Slika 33A i B). CD68⁺ stanice fluoresciraju zeleno, APAF-1⁺ stanice fluoresciraju crveno, a svega nekoliko CD68⁺APAF-1⁺ stanica fluorescira žuto (označeno bijelim strelicama) u područjima limfocitnih nakupina strome sinovijske membrane. Pozitivna fluorescencija CD68 i APAF-1 biljega određena je na temelju kontrola istog podrazreda odnosno razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14A).



Slika 33. Izražaj APAF-1 u CD68⁺ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje zečjih IgG protu-APAF-1 Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije kozjeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i kozjeg protu-zečjeg IgG Pt obilježenog s AF 594. Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom i označeno je bijelim strelicama. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$ (A) odnosno $\times 1000$ (B). Prikazan je jedan od četiri obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. APAF-1- Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1 (od eng. Apoptotic Protease Activating Factor-1); CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

Izražaj transkripcijskog čimbenika NF- κ B u CD68+ stanicama metodom dvostruke imunofluorescence prikazan je na Slici 34A i B. CD68+ stanice fluoresciraju crveno, a NF- κ B+ stanice fluoresciraju zeleno. CD68+Nf- κ B+ stanice izražene su u područjima limfocitnih nakupina strome sinovijske membrane (označeno bijelim strelicama). Pozitivnost CD68 i NF- κ B biljega određen je na temelju kontrola istog podrazreda odnosno razreda irelevantne specifičnosti (Slika 14A).

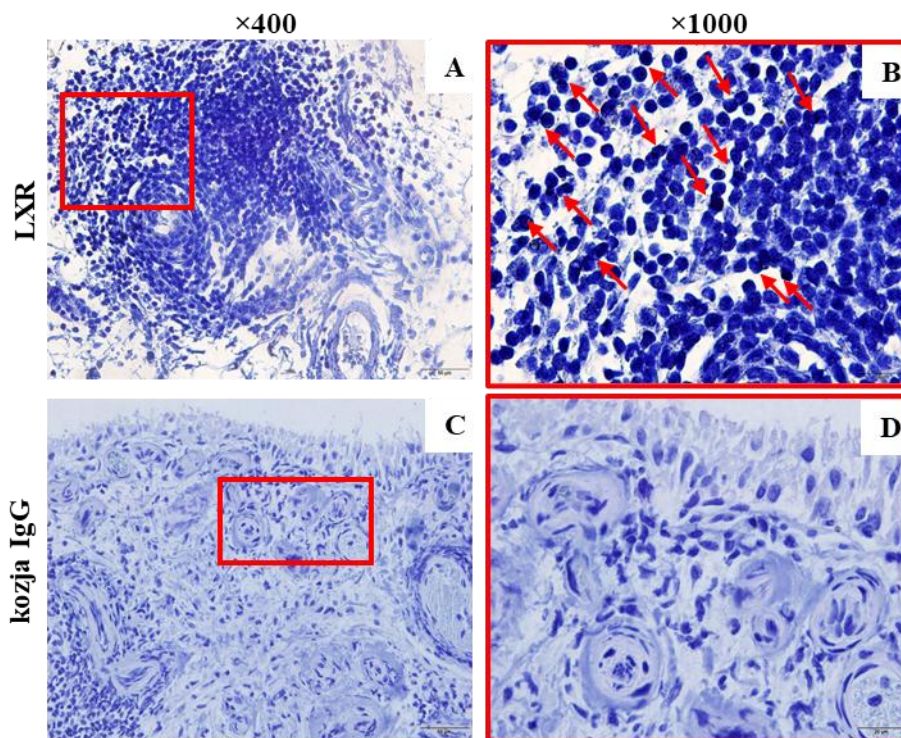


Slika 34. Izražaj NF- κ B u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira crveno, a vezanje zečjih IgG protu-NF- κ B Pt fluorescira zeleno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 594 i magarećeg protu-zečjeg IgG Pt obilježenog s AF 488. Preklapanje zelene i crvene fluorescence prikazuje se žutom fluorescencijom i označeno je bijelim strelicama. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$ (A) odnosno $\times 1000$ (B). Prikazan je jedan od četiri obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); NF- κ B- Nuklearni čimbenik kapa B (od eng. Nuclear Factor kappa B).

4.1.10. Izražaj LXR receptora u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

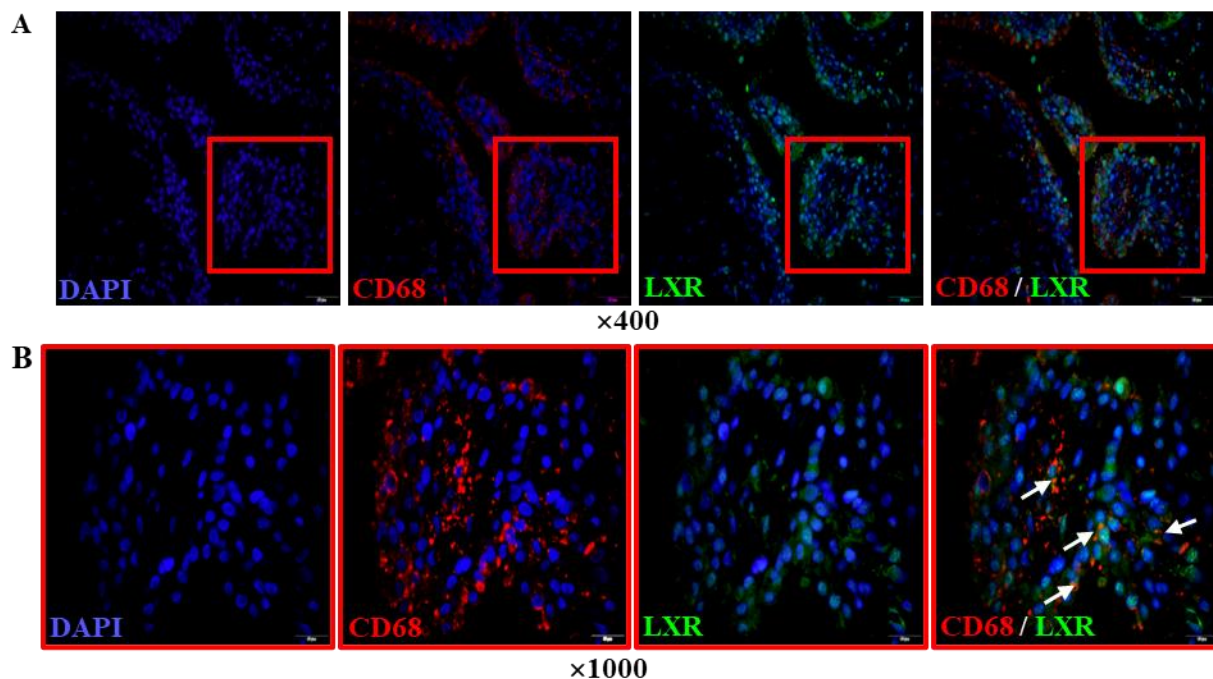
Izražaj LXR receptora u sinovijskoj membrani prikazan je imunohistokemijskim obilježavanjem (Slika 35). LXR dominantno je izražen u stanicama limfocita u područjima limfocitnih nakupina strome sinovijske membrane i očituje se kao intenzivno, mjestimično

zrnato nukleolarno obilježavanje (Slika 35A i B, označeno crvenim strelicama). Pozitivan izražaj LXR biljega određen je na temelju kontrola istog razreda irelevantne specifičnosti (Slika 35C i D).



Slika 35. Izražaj LXR-a u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa kozjim IgG protu-LXR $\alpha+\beta$ protutijelima (Pt) prikazano je smeđom bojom 3'3'-diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja Pt za antigen (A i B). Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu kozja IgG Pt irelevantne specifičnosti (C, D). Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno pet uzoraka u svakoj grupi. Ig-Imunoglobulin; LXR- Jetreni X receptor (od eng. Liver X Receptor).

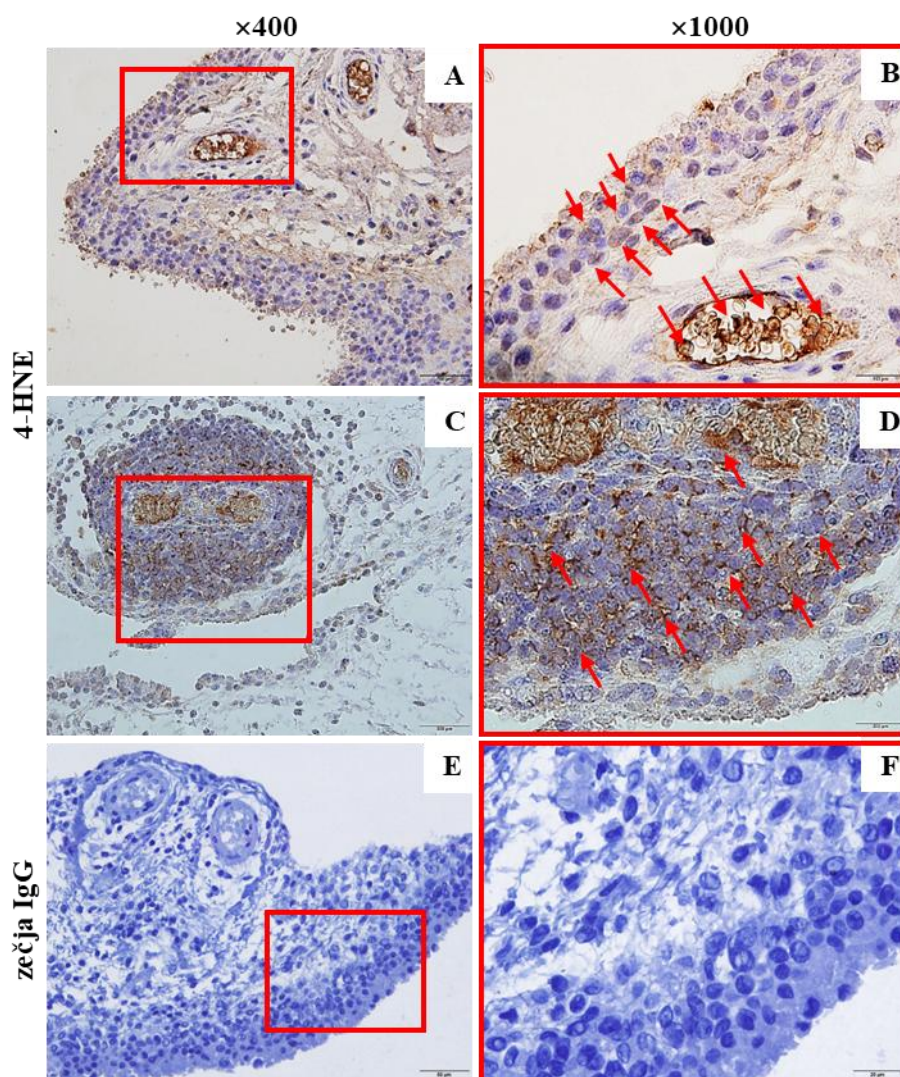
Metodom dvostruke imunofluorescence na Slici 36A i B prikazan je izražaj LXR biljega u CD68+ stanicama sinovijske membrane. LXR biljeg obilježavao se u jezgrama stanica (zelena fluorescencija) uključujući i jezgre manjeg broja CD68+ stanica (crvena fluorescencija) što je zorno prikazano žutom fluorescencijom dvostruko pozitivnih CD68+LXR+ stanica (označeno bijelim strelicama) u područjima strome sinovijske membrane. Pozitivan izražaj CD68 i LXR biljega određena je na temelju kontrolnog obilježavanja protutijelima istog razreda odnosno podrazreda irelevantne specifičnosti (Slika 14F).



Slika 36. Izražaj LXR u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje zečjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira crveno, a vezanje kozjeg IgG protu-LXR $\alpha + \beta$ Pt fluorescira zeleno po vezivanju kombinacije kozjeg protu-zečjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 594 i magarećeg protu-kozjeg IgG Pt obilježenog s AF 488. Preklapanje zelene i crvene fluorescence prikazuje se žutom fluorescencijom i označeno je bijelim strelicama. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 400$ (A) odnosno $\times 1000$ (B). Prikazan je jedan od pet obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); LXR- Jetreni X receptor (od eng. Liver X Receptor).

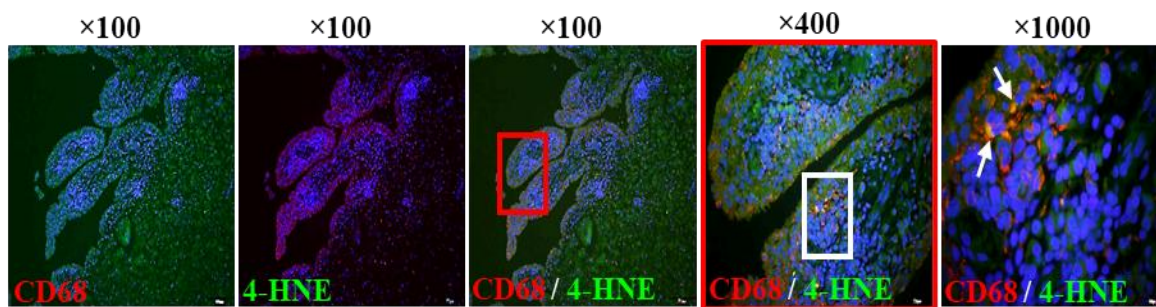
4.1.11. Izražaj 4-HNE u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Izražaj proizvoda oksidacije višestruko nezasićenih omega-6 masnih kiselina 4-HNE u sinovijskoj membrani prikazan je imunohistokemijskim obilježavanjem (Slika 37). 4-HNE (označeno crvenim strelicama) izražen je u stanicama površinskog sloja sinovijskih izdanaka (Slika 37A i B) i stanicama strome sinovijske membrane, krvnim i endotelnim stanicama sinovijskih krvnih žila (Slika 37C i D). Na temelju kontrole istog razreda protutijela irelevantne specifičnosti određen je pozitivan izražaj 4-HNE biljega (Slika 37E i F).



Slika 37. Izražaj 4-HNE u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Imunohistokemijsko obilježavanje sa zečjim IgG protu-4-HNE protutijelima (Pt) prikazano je smeđom bojom 3'3'- diaminobenzidina na mjestu specifičnog vezanja protutijela za antigen (A-D) i označeno crvenim strelicama unutar pravokutne ograde. Jezgre su obojene s hematoksilinom i prikazuju se plavo. Kontrola jesu zečja IgG Pt irelevantne specifičnosti (E i F). Izvorno povećanje je $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Analizirano je ukupno osam uzoraka u svakoj grupi. Ig- Imunoglobulin; 4-HNE- 4-hidroksinonenal.

Izražaj 4-HNE u CD68+ stanicama metodom dvostruke imunofluorescence prikazan je na Slici 38. Najveći udio CD68+ (crvena fluorescencija) i 4-HNE+ (zelena fluorescencija) stanica pokazuje izražaj na površinskom sloju sinovijskih izdanaka. Brojne dvostruko pozitivne CD68+4-HNE+ stanice (žuta fluorescencija) također su najizraženije na površinskom sloju sinovijskih izdanaka. Pozitivna fluorescencija za biljege CD68 i 4-HNE određena je prema kontroli istog podrazreda odnosno razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14A).

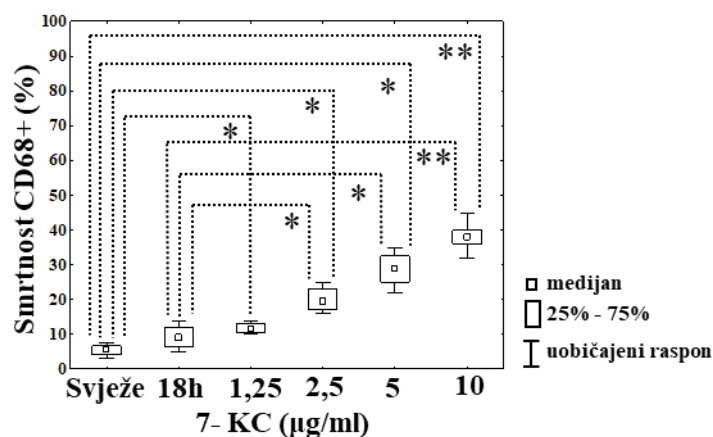


Slika 38. Izražaj 4-HNE u CD68+ stanicama u sinovijalnoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije. Vezanje mišjeg IgG1 protu-CD68 protutijela (Pt) fluorescira crveno, a vezanje zečjeg IgG protu-4-HNE Pt fluorescira zeleno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-mišjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 594 i magarećeg protu-zečjeg IgG Pt obilježenog s AF 488. Preklapanje zelene i crvene fluorescencije prikazuje se žutom fluorescencijom (označeno bijelim strelicama). Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol- DAPI). Izvorno povećanje je $\times 100$, $\times 400$, odnosno $\times 1000$. Prikazan je jedan od šest obilježavanih uzoraka. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); 4-HNE- 4-hidroksinonenal.

4.2. Utjecaj 7-KC-a na smrtnost, fenotip i funkciju CD68+ stanica u suspenziji sinovijalnih mononuklearnih stanica zrelog OA-a koljena

4.2.1. Utjecaj 7-KC-a na smrtnost CD68+ stanica sinovijalne membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

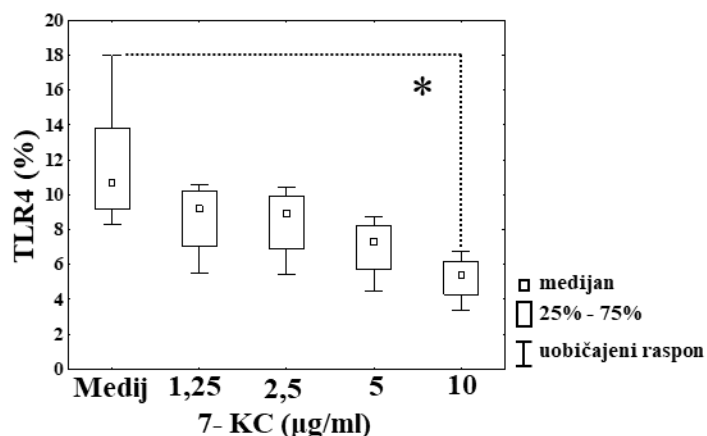
Smrtnost stanica sinovijalne membrane primjenom rastućih koncentracija 7-KC-a određena je bojenjem s PI-om uz očitavanje protočnim citometrom (Slika 39). Smrtnost svježe izdvojenih CD68+ stanica je iznosila oko 5%, a 18 sati kultiviranih u RPMI mediju za kulturu iznosila je oko 10%. Kultura CD68+ stanica s koncentracijom 1,25 $\mu\text{g/ml}$ 7-KC-a statistički je značajno povećala smrtnost CD68+ stanica u odnosu na svježe izolirane ($P = 0,008$), a kultura CD68+ stanica s rastućim koncentracijama 7-KC-a (5 i 10 $\mu\text{g/ml}$) statistički je značajno povećala smrtnost CD68+ stanica u odnosu na svježe izdvojene i 18 sati kultivirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,008$). Smrtnost CD68+ stanica bila je najveća po stimulaciji sa 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijom 7-KC-a i iznosila je oko 40% što je statistički značajno više u odnosu na stanice kultivirane 18 sati u RPMI mediju za kulturu ili svježe izdvojene stanice ($P = 0,004$).



Slika 39. Smrtnost CD68+ stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Postotak mrtvih CD68+ stanica obilježenih s PI-om (1,75 µg/ml) analiziran je u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica te nakon 18 sati kulture u RPMI mediju za kulturu, odnosno s dodatkom 7-ketokolesterola (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) u rastućim koncentracijama (1,25; 2,5; 5 i 10 µg/ml). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,008$ i ** $P = 0,004$ u šest neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi (Kruskal-Wallis test i post- hoc Dunn test). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

4.2.2. Utjecaj 7-KC-a na izražaj TLR4 na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Slika 40 prikazuje utjecaj 7-KC-a na izražaj TLR4 na CD68+ stanicama izdvojenim iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

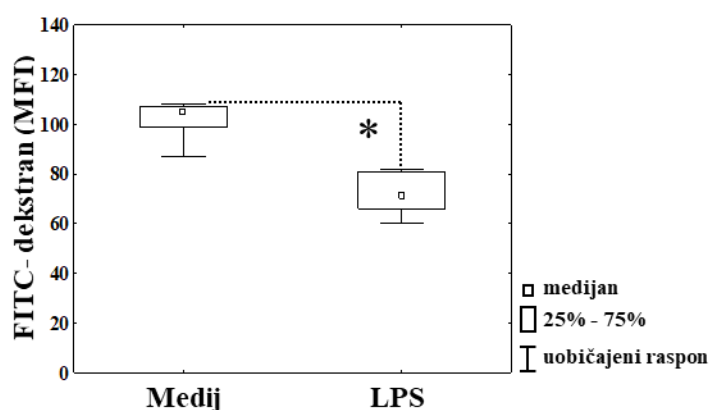


Slika 40. Utjecaj 7-ketokolesterola (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) na izražaj TLR4 na CD68+ stanicama. Analiza izražaja TLR4 je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena inkubiranih u RPMI mediju za kulturu ili u mediju sa 7-KC-om u rastućim koncentracijama (1,25; 2,5; 5 i 10 µg/ml). Razina statističke značajnosti je * $P = 0,01$ u 6-8 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test). TLR4 - Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

7-KC smanjuje postotak CD68+TLR4+ stanica na način ovisan o koncentraciji (1,25; 2,5; 5 i 10 µg/ml). Udio CD68+ stanica koje izražavaju TLR4 iznosi do 5% nakon 18 sati kulture sa 10 µg/ml 7-KC-om, što je statistički značajno manje ($P = 0,01$) u odnosu na stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu.

4.2.3. Utjecaj LPS-a na FITC-dekstran pinoendocitozu svježe izdvojenih CD68+ stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Protočnom citometrijom analizan je utjecaj LPS-a na pinoendocitozu FITC-dekstrana u svježe izdvojenih CD68+ stanica sinovijske membrane (Slika 41). LPS, snažan aktivator Th1 imunološkog odgovora, je statistički značajno smanjio pinoendocitozu FITC-dekstrana u odnosu na CD68+ stanice kultivirane samo u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$).

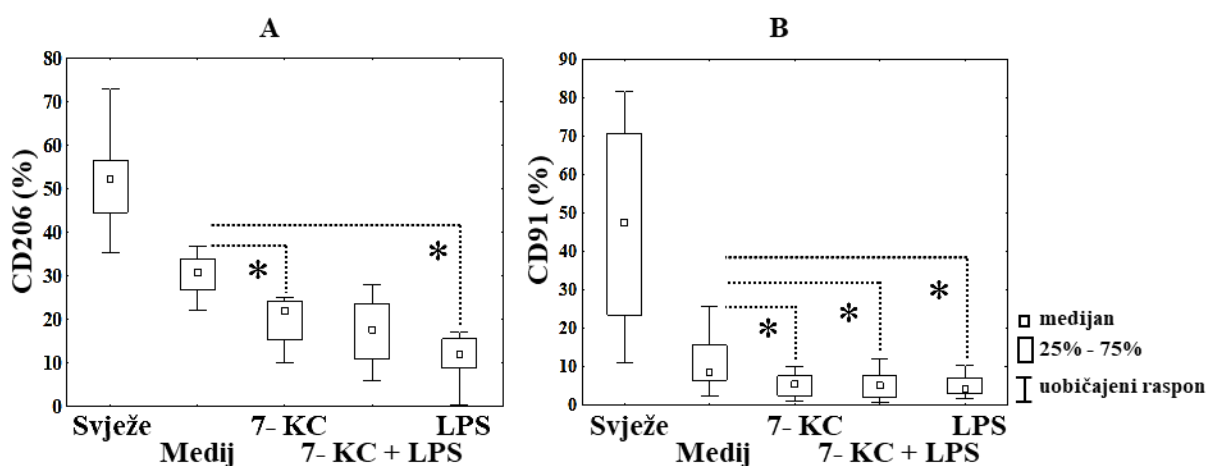


Slika 4110. Pinoendocitoza FITC-dekstrana u ograđene CD68+ stanice iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Rezultati su prikazani kao srednji intenzitet fluorescencije ili MFI (od engl. Mean Fluorescence Intensity) za FITC-dekstran u CD68+ stanicama kultiviranim u RPMI mediju za kulturu 18 sati (100% vrijednosti MFI) dok je vrijednost MFI za FITC-dekstran stimulacijom CD68+ stanica s lipopolisaharidom (LPS, 10 ng/ml) izračunata kao postotak navedene vrijednosti. Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$ (Mann Whitney U test). Izvedeno je šest neovisnih pokusa po pojedinoj grupi.

4.2.4. Usporedba 7-KC-a i LPS-a na izražaj receptora za prepoznavanje obrazaca na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

CD206 i CD91 se ubrajaju u skupinu receptora za prepoznavanje obrazaca i imaju ulogu u procesu vezanja, endocitoze i prezentacije antigena. Inkubacija CD68+ stanica u mediju samo sa 7- KC-om i samo s LPS-om statistički je značajno smanjila frekvenciju izražaja biljega CD206 u odnosu na stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$) dok inkubacija sa 7-KC-om i LPS-om statistički nije značajno promijenila izražaj CD206 u odnosu na CD68+ stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu (Slika 42A).

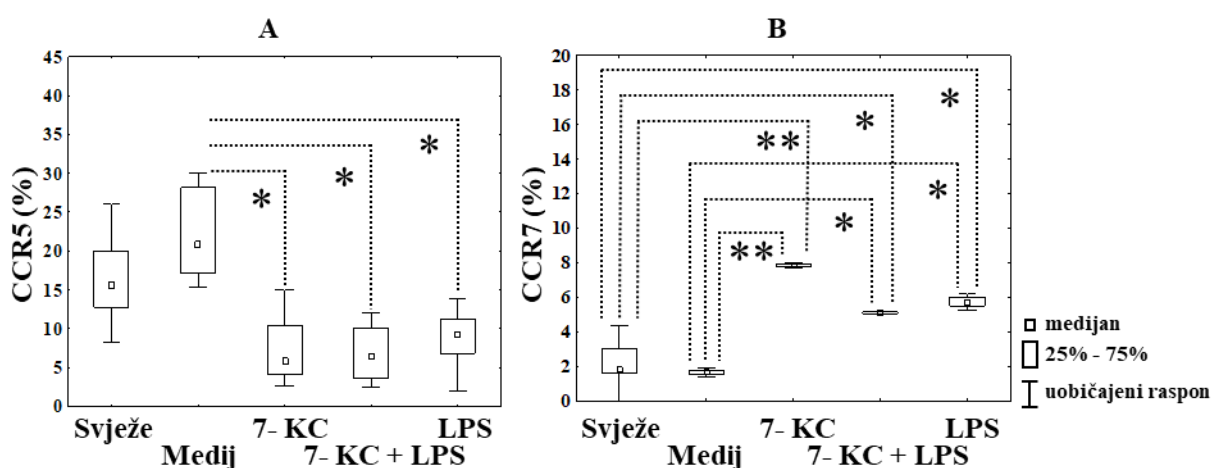
Inkubacija CD68+ stanica u mediju sa 7-KC-om, kombinacijom 7-KC-a i LPS-a te samo s LPS-om statistički je značajno smanjila frekvenciju izražaja CD91 na CD68+ stanicama u odnosu na stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$) (Slika 42B).



Slika 4211. Izražaj receptora za prepoznavanje obrazaca CD206 (A) i CD91 (B) na CD68+ stanicama iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Analiza izražaja je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 $\mu\text{g/ml}$), u mediju sa 7-KC-om (10 $\mu\text{g/ml}$) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6-8 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

4.2.5. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora za kemokine na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

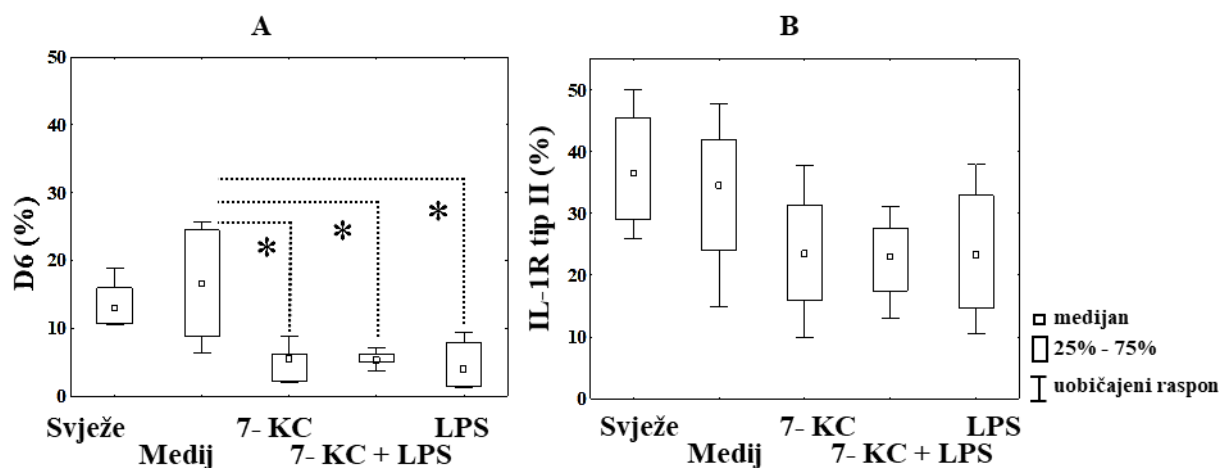
Analiza izražaja CC receptora za kemokin (CCR) 5, kojeg je izražavalo 15,6% (12,7 - 20,0%) svježe izdvojenih CD68+ stanica, prikazana je na slici 43A. Inkubacija CD68+ stanica u mediju samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om statistički je značajno smanjila frekvenciju izražaja CCR5 u odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$). Analiza izražaja receptora CCR7 prikazana je na slici 43B. Mali udio svježe izdvojenih CD68+ stanica izražavalo je biljeg CCR7. Frekvencija izražaja CCR7 na CD68+ stanicama je statistički značajno porasla inkubacijom samo sa 7-KC-om ($P = 0,004$), 7-KC i LPS-om i samo s LPS-om (oba $P = 0,01$). Frekvencija izražaja CCR7 statistički je značajno porasla i inkubacijom CD68+ stanica samo sa 7-KC-om ($P = 0,004$), 7-KC-om i LPS-om (oba $P = 0,01$) i samo s LPS-om ($P = 0,004$) u odnosu na svježe izdvojene CD68+ stanice i one inkubirane u RPMI mediju za kulturu.



Slika 43. Izražaj receptora za kemokine CCR5 (A) i CCR7 (B) na CD68+ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 $\mu\text{g/ml}$), u mediju sa 7-KC-om (10 $\mu\text{g/ml}$) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,01$; ** $P = 0,004$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6-8 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CCR- CC kemokinski receptor (od eng. CC chemokine Receptor)

4.2.6. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora mamilica na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Analiza izražaja proupalnog kemokinskog D6 receptora, kojeg je na površini izražavalo oko 15% svježe izdvojenih CD68+ stanica, prikazana je na slici 44A. Stimulacija samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om statistički je značajno smanjila frekvenciju izražaja D6 na CD68+ stanicama u odnosu na stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$). Na Slici 44B prikazana je analiza izražaja IL-1R tip II receptora na površini CD68+ stanica. Oko 35% svježe izdvojenih CD68+ stanica izražavalo je IL-1R tip II receptor, a stimulacija samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om nije pokazala statističku značajnost na njegov izražaj na površini u odnosu na svježe izdvojene i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu.

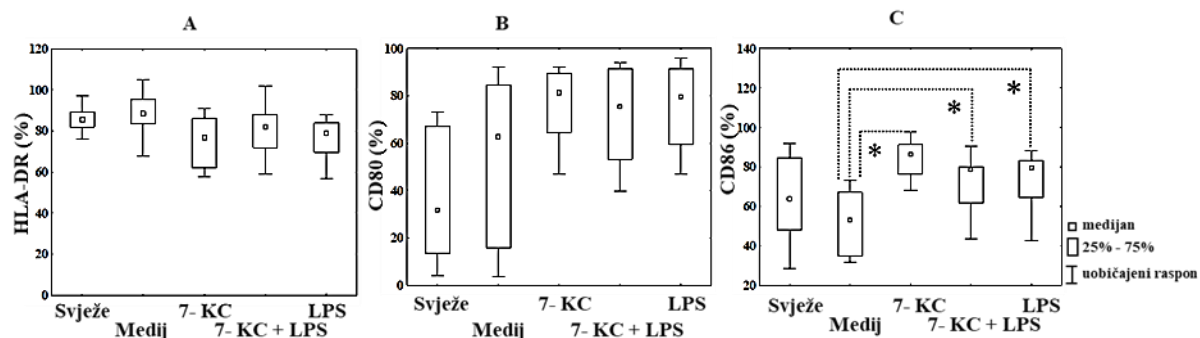


Slika 44. Izražaj receptora mamilica za proupalne kemokine D6 (A) i za IL-1R vrste II (B) na CD68+ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 $\mu\text{g/ml}$), u mediju sa 7-KC-om (10 $\mu\text{g/ml}$) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. IL-1R- Interleukin-1 receptor.

4.2.7. Utjecaj 7-KC-a na izražaj receptora HLA-DR i kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Utjecaj 7-KC-a na izražaj HLA-DR, CD80 i CD86 biljega prikazan je na Slici 45. Stimulacija svježe izdvojenih CD68+ stanica samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om nije statistički značajno utjecala na frekvenciju izražaja površinskog HLA-DR receptora u odnosu

na svježe izdvojene i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu (Slika 45A). Frekvencija izražaja kostimulacijske molekule CD80 nije se statistički značajno promijenila po stimulaciji CD68⁺ stanica samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo LPS-om u odnosu na svježe izdvojene i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu (Slika 45B). Udio CD86 molekula bio je statistički značajno viši po stimulaciji samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om ($P = 0,01$) u odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu (Slika 45C).



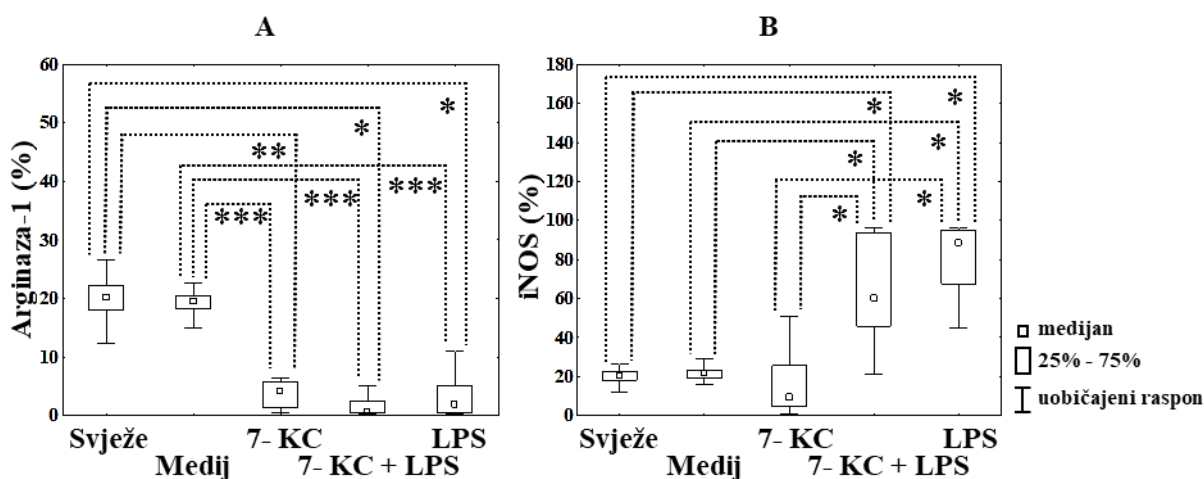
Slika 45. Izražaj HLA-DR (A) i kostimulacijskih receptora CD80 (B) i CD86 (C) na CD68⁺ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 μ g/ml), u mediju sa 7-KC-om (10 μ g/ml) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razina statističke značajnosti je * $P = 0,01$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); HLA-DR- Humani leukocitni antigen- DR (od eng. Human Leukocyte Antigen- DR).

4.2.8. Utjecaj 7-KC-a na izražaj arginaze-1 i iNOS biljega u CD68⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Utjecaj 7-KC-a na izražaj M2 biljega arginaze-1 i M1 biljega iNOS u CD68⁺ stanicama prikazan je na Slici 46. Utjecaj 7-KC-a na izražaj M2 biljega arginaze-1 u CD68⁺ stanicama prikazan je na Slici 46A. Sam 7-KC ($P = 0,000009$), 7-KC i LPS ($P = 0,00007$) i sam LPS ($P = 0,00007$) statistički su značajno smanjili frekvenciju izražaja arginaze-1 u odnosu na svježe izdvojene stanice. U odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu, sam 7-KC ($P = 0,000000$), 7-KC i LPS ($P = 0,000000$) i sam LPS ($P = 0,000000$) su statistički značajno smanjili frekvenciju izražaja arginaze-1.

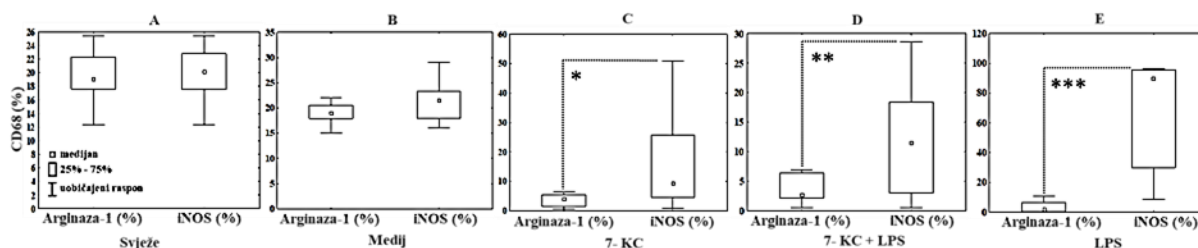
Utjecaj 7-KC-a na izražaj M1 biljega iNOS u CD68⁺ stanicama prikazan je na Slici 46B. Učinak stimulacije CD68⁺ stanica pokazao je da 7-KC i LPS ($P = 0,00007$) i sam LPS ($P = 0,00007$) su statistički značajno smanjili frekvenciju izražaja iNOS u odnosu na svježe izdvojene stanice.

= 0,00007) statistički značajno povećavaju frekvenciju izražaja iNOS-a u odnosu na svježe izdvojene stanice. 7-KC i LPS ($P = 0,00007$) i sam LPS ($P = 0,00007$) statistički su značajno povećali i frekvenciju njegovog izražaja u odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu. Inkubacija sa 7-KC-om i LPS-om ($P = 0,00007$) i samo s LPS-om ($P = 0,00007$) statistički je značajno povećala frekvenciju izražaja biljega iNOS na CD68+ stanicama u odnosu na stanice inkubirane samo sa 7-KC-om.



Slika 46. Izražaj arginaza-1(A) i iNOS (B) biljega u CD68+ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 $\mu\text{g/ml}$), u mediju sa 7-KC-om (10 $\mu\text{g/ml}$) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,00007$, ** $P = 0,000009$ i *** $P = 0,000000$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida (od engl. inducible Nitric Oxide Synthase).

Odnos izražaja arginaza-1+ i iNOS+ biljega u CD68+ stanicama nije pokazao statistički značajnu razliku u svježe izdvojenim (Slika 47A) i stanicama inkubiranim u RPMI mediju za kulturu (Slika 47B). Inkubacija stanica u mediju samo sa 7-KC-om (Slika 47C), 7-KC-om i LPS-om (Slika 47D) i samo s LPS-om (Slika 47E) nakon 18 sati na 37 °C uzrokovala je statistički značajan porast izražaja biljega iNOS u odnosu na izražaj arginaze-1 ($P = 0,002$, $P = 0,0005$ i $P = 0,00009$).

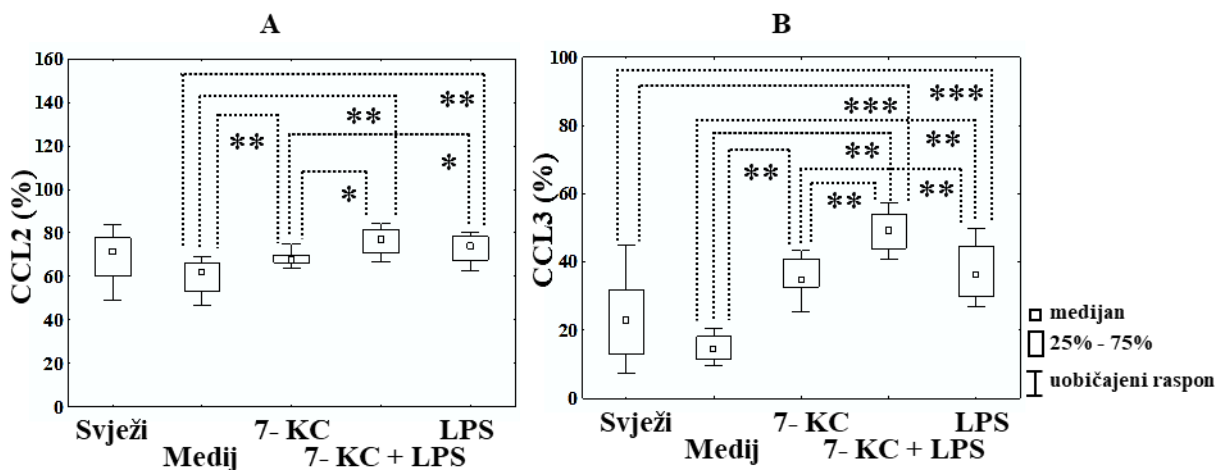


Slika 47. Odnos izražaja arginaze-1 i iNOS-a u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim (0 sati) (A), inkubiranim u RPMI mediju za kulturu (B), u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 µg/ml) (C), u mediju sa 7-KC-om (10 µg/ml) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) (D) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) (E) nakon 18 sati na 37 °C. Razine statističke značajnosti su *P = 0,002; **P = 0,0005 i ***P = 0,00009 (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 10 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation).

4.2.9. Utjecaj 7-KC-a na izražaj proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Frekvencija izražaja proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 u CD68+ stanicama po stimulaciji sa 7-KC-om prikazan je na Slici 48. Stimulacijom CD68+ stanica koje su izražavale CCL2 biljeg (Slika 48A) samo sa 7-KC-om (P = 0,002), 7-KC-om i LPS-om (P = 0,005) i samo s LPS-om (P = 0,005) statistički se značajno povećala frekvencija njegovog izražaja u odnosu na stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu. Inkubacija stanica sa 7-KC-om i LPS-om (P = 0,01) i samo s LPS-om (P = 0,01) također je pokazala statistički značajniji porast frekvencije izražaja CCL2 u odnosu na stanice inkubirane samo sa 7-KC-om.

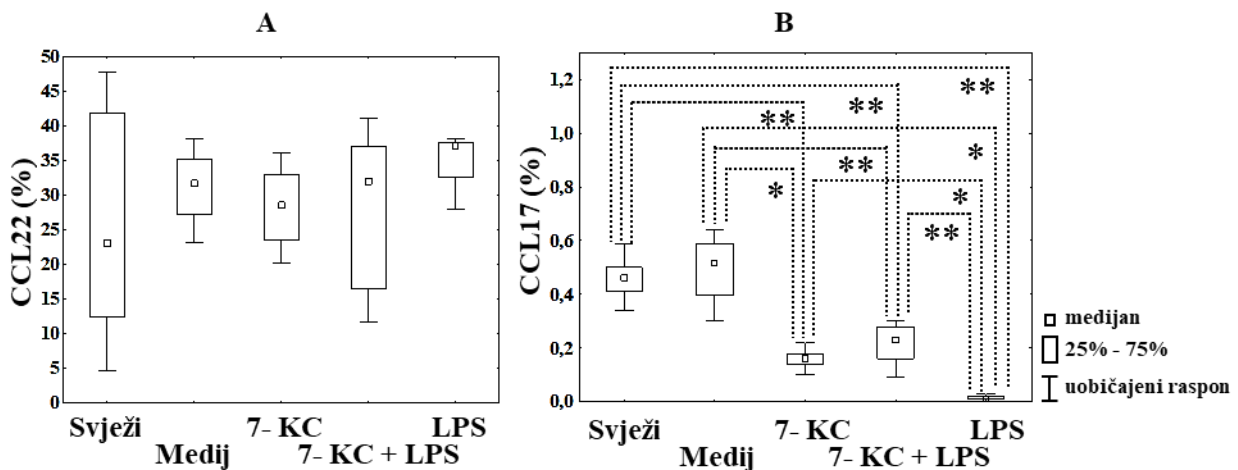
CD68+ stanice koje su izražavale CCL3 biljeg (slika 48B) statistički su značajno povećale njegov izražaj stimulacijom sa 7-KC-om i LPS-om (P = 0,0008) i samo s LPS-om (P = 0,0008) u odnosu na svježe izdvojene stanice. U odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu, sam 7-KC (P = 0,005), 7-KC i LPS (P = 0,005) i sam LPS (P = 0,005) također su statistički značajno povećali izražaj CCL3. Inkubacija stanica sa 7-KC-om i LPS-om (P=0,005) i samo s LPS-om (P = 0,005) statistički je značajno povećala frekvenciju izražaja CCL3 u CD68+ stanicama u odnosu na stanice inkubirane samo sa 7-KC-om.



Slika 48. Izražaj proupalnih kemokina CCL2 (A) i CCL3 (B) u CD68+ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 µg/ml), u mediju sa 7-KC-om (10 µg/ml) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,01$, ** $P = 0,001 - 0,008$ i *** $P = 0,0004 - 0,0008$ (Kruskal-Wallis test i post- hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand).

4.2.10. Utjecaj 7-KC-a na izražaj protuupalnih kemokina CCL22 i CCL17 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

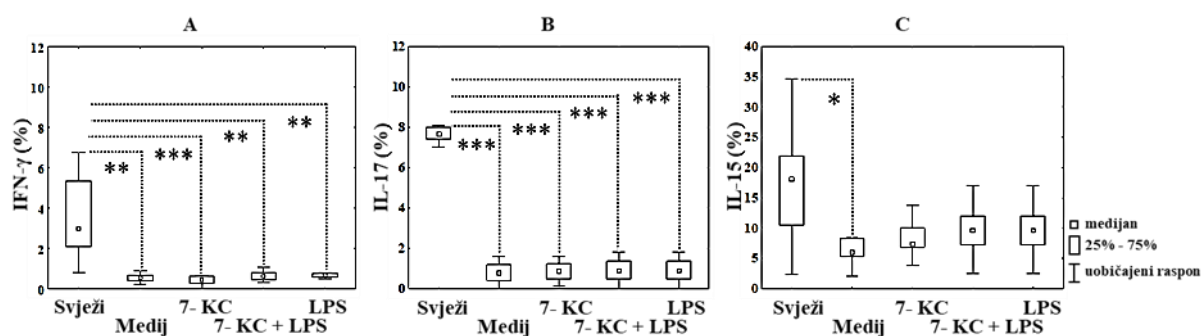
Utjecaj 7-KC-a na protuupalne kemokine CCL22 i CCL17 u CD68+ stanicama prikazan je na Slici 49. Inkubacija svježe izdvojenih CD68+ stanica samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om nije utjecala na frekvenciju izražaja CCL22 (Slika 49A) u odnosu na svježe izdvojene i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu. Inkubacija svježe izdvojenih CD68+ stanica samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om statistički je značajno smanjila frekvenciju izražaja CCL17 (Slika 49B) u odnosu na svježe ($P = 0,004$, $P = 0,001$ i $P = 0,004$) i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu ($P = 0,01$, $P = 0,003$ i $P = 0,01$). Inkubacija samo s LPS-om također je statistički značajno smanjila frekvenciju izražaja CCL17 u CD68+ stanicama u odnosu na stanice inkubirane samo sa 7-KC-om ($P = 0,01$) i te sa 7-KC-om i LPS-om ($P=0,003$).



Slika 49. Izražaj protuupalnih kemokina CCL22 (A) i CCL17 (B) u CD68⁺ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) (10 µg/ml), u mediju sa 7-KC-om (10 µg/ml) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37 °C. Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razine statističke značajnosti su *P = 0,01 i **P = 0,001-0,004 (Kruskal Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. CCL- CC kemokinski ligand (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand).

4.2.11. Utjecaj 7-KC-a na izražaj IFN-γ, IL-17 i IL-15 u CD68⁺ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

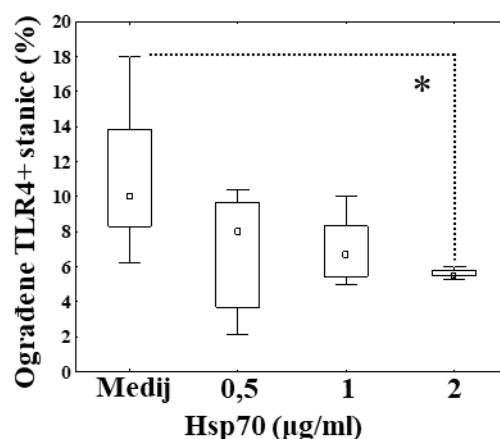
Utjecaj 7-KC-a na izražaj IFN-γ, IL-15 i IL-17 koji djeluju kao snažni promotori sinteze proupalnih citokina prikazan je na Slici 50. Inkubacija CD68⁺ stanica u RPMI mediju za kulturu (P = 0,001), samo sa 7-KC-om (P = 0,008), 7-KC-om i LPS-om (P = 0,001) i samo s LPS-om (P = 0,001) statistički je značajno smanjio udio izražaja IFN-γ u odnosu na svježe stanice (Slika 50A). Inkubacijom stanica u RPMI mediju za kulturu, samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om dovelo je također do statistički značajnog smanjenja udjela izražaja IL-17 u odnosu na svježe stanice (P=0,008) (Slika 50B). Frekvencija izražaja IL-15 u CD68⁺ stanicama (Slika 50C) nije imala statistički značajnu promjenu po stimulaciji samo sa 7-KC-om, 7-KC-om i LPS-om i samo s LPS-om u odnosu na svježe i stanice kultivirane u RPMI mediju za kulturu. Statistički značajno niži izražaj IL-15 imaju CD68⁺ stanice koje su inkubirane u RPMI mediju za kulturu u odnosu na svježe izolirane stanice (P = 0,01).



Slika 50. Izražaj $IFN-\gamma$ (A), $IL-17$ (B) i $IL-15$ (C) u $CD68+$ stanicama. Analiza je učinjena iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena i to svježe izdvojenim, inkubiranim u RPMI mediju za kulturu, u mediju sa 7-ketokolesterolom (7-KC, od engl. 7-ketocholesterol) ($10 \mu\text{g/ml}$), u mediju sa 7-KC-om ($10 \mu\text{g/ml}$) i lipopolisaharidom (LPS) (10 ng/ml) ili u mediju s LPS-om (10 ng/ml) nakon 18 sati na 37°C . Rezultati su izraženi kao postotak (%). Razine statističke značajnosti su $*P = 0,01$, $**P = 0,001$ i $***P = 0,0008$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 6 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. IL- Interleukin; $IFN-\gamma$ - Interferon gama.

4.3. Vezanje Hsp70 za TLR4 na $CD68+$ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena

Slika 51. prikazuje postotak $CD68+TLR4+$ mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA koljena inkubiranih u RPMI mediju za kulturu i u mediju po stimulaciji s rastućim koncentracijama Hsp70. Postotak $CD68+$ stanica koje izražavaju TLR4 smanjuje se paralelno s povećanjem koncentracije Hsp70. Frekvencija izražaja TLR4 (5%) na $CD68+$ stanicama po stimulaciji s $2 \mu\text{g/ml}$ Hsp70 bila je dva puta niža u odnosu na izražaj TLR4 (10%) na $CD68+$ stanicama kultiviranim samo u RPMI mediju za kulturu što potvrđuje vezanje Hsp70 za TLR4 izražen na $CD68+$ stanicama *in vitro*.

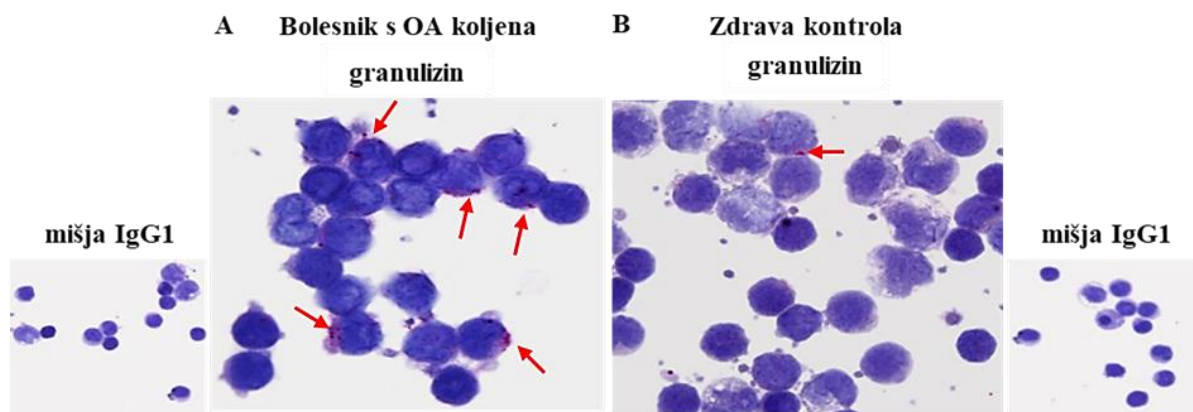


Slika 51. Izražaj TLR4 na CD68+ stanicama po stimulaciji s Hsp70. Analiza je učinjena iz suspenzije svježe mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena inkubiranih u RPMI mediju za kulturu ili u mediju s rastućim koncentracijama Hsp70 (0,5; 1 i 2 µg/ml) tijekom 30 min na +4 °C. Razina statističke značajnosti je $*P = 0,01$ (Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunn test) u 5 neovisnih obilježavanja po pojedinoj grupi. Hsp70- Protein toplinskog stresa 70 (od eng. Heat Shock Protein 70); TLR4 - Receptor sličan Toll-u 4 (od eng. Toll-like Receptor 4).

4.4. Izražaj GNLY-a i GNLY-om posredovana apoptoza u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena u odnosu na zdravu kontrolu

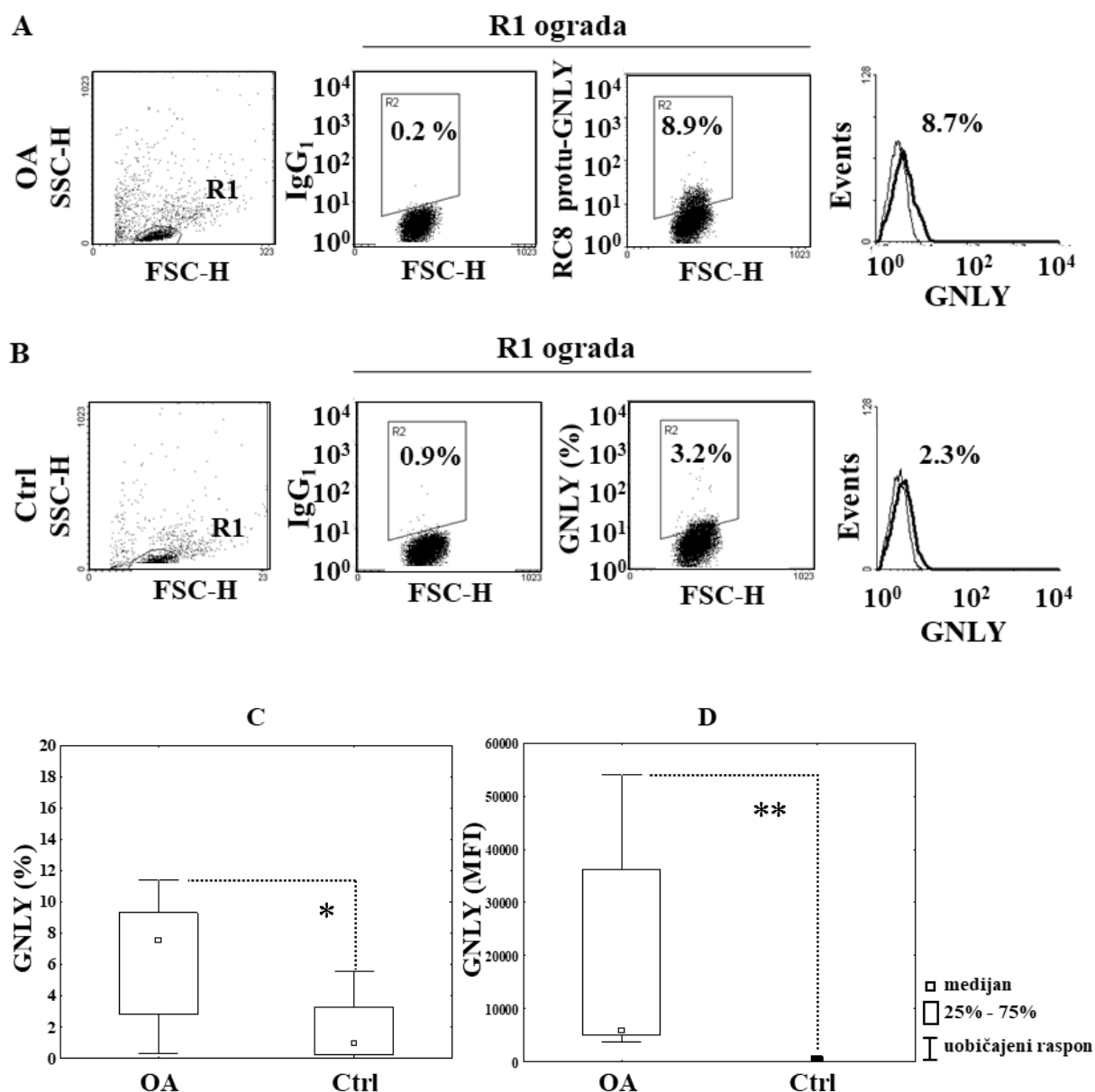
4.4.1. Izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena i zdrave kontrole

Imunocitokemijskim obilježavanjem GNLY-a u limfocitima periferne krvi vizualiziran je veći broj GNLY+ limfocita (označeno crvenim strelicama) u bolesnika s ranim OA-om koljena u odnosu na zdravu kontrolu (Slika 52).



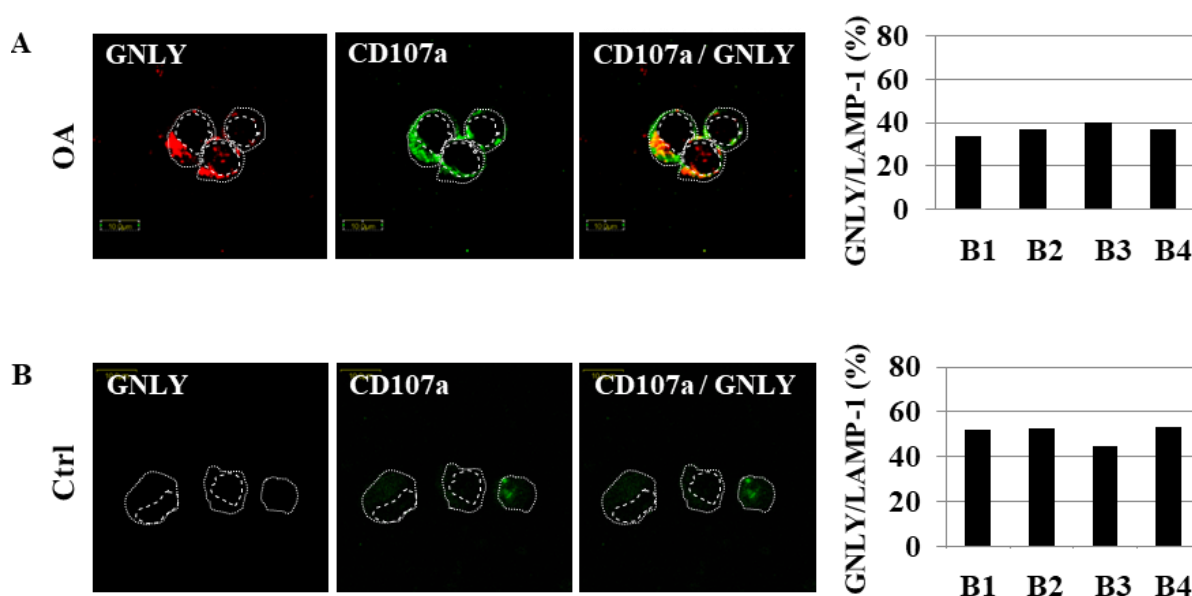
Slika 52. Imunocitokemijsko obilježavanje granulizina u limfocitima periferne krvi. GNLY je obilježen imunoperoxidaznom metodom uz pomoć RC8 mišjeg IgG1 protu-GNLY protutijela u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena (A) i zdrave kontrole (B). Prikazan je u crvenoj boji uz pomoć aminoetil karbazola (označeno crvenim strelicama) u usporedbi s kontrolom istog podrazreda irelevantne specifičnosti (mišji IgG1). Prikazan je jedan od tri neovisno obilježavana uzorka. Izvorno povećanje je $\times 1000$. Ig- Imunoglobulin.

Izražaj GNLY-a dodatno je analiziran i protočnom citometrijom. Rezultati analize limfocita periferne krvi postavljenih unutar ograde (R)1 prikazani su točkastim dijagramima i histogramima u bolesnika s ranim OA-om (Slika 53A) i zdravim kontrolama (Slika 53B). Točkasti dijagram bolesnika s OA-om pokazuje da se 8,9% GNLY+ stanica nalazi unutar R2 ograde u odnosu na IgG1 kontrolu irelevantne specifičnosti (0,2%), odnosno histogramskim prikazom, 8,7% GNLY+ stanica nalazi se unutar analizirane populacije limfocita (Slika 53A). Kod zdravih kontrola, 3,2% GNLY+ stanica nalazi se unutar R2 ograde u odnosu na IgG1 kontrolu irelevantne specifičnosti (0,9%), odnosno prikazano histogramom, 2,3% GNLY+ stanica nalazi se unutar analizirane populacije limfocita (Slika 53B). Frekvencija izražaja GNLY+ limfocita periferne krvi je viša [7.5% (2.8-9%)] kod OA bolesnika u odnosu na zdrave kontrole [1.7% (0.3-3.9%)] (Slika 53C). Također, intenzitet fluorescencije GNLY+ limfocita statistički je značajno viši ($P = 0,000001$) kod OA bolesnika u odnosu na zdrave kontrole (Slika 53D). Koncentracija GNLY-a u serumu, analizirana ELISA metodom, kod OA bolesnika i zdrave kontrole, bila je $<0,3$ ng/ml.



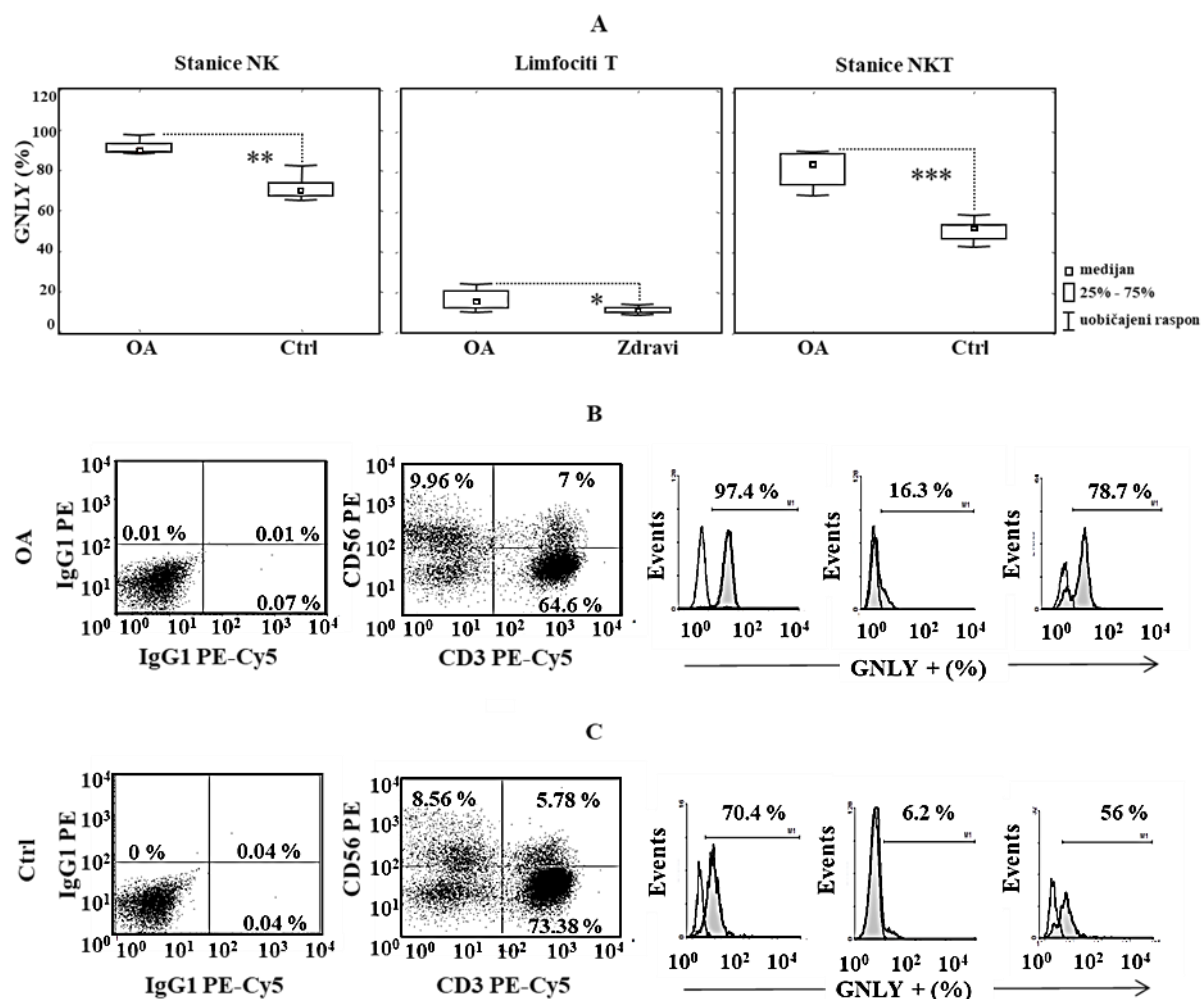
Slika 53. Izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena i zdravim kontrolama. Ograda R1 je postavljena na limfocite. Reprezentativni primjeri točkastih dijagrama i histogrami pokazuju rezultate analize limfocita unutar R1 ograde protočnom citometrijom za GNLY+ stanice obilježene RC8 mišjim IgG1 protu-GNLY monoklonskim protutijelom (ograda u R2 ogradi) kod bolesnika s OA-om (A) i zdravim kontrolama (B) u usporedbi s obilježavanjem s protutijelom iste podvrste irelevantne specifičnosti. Grafovi pokazuju medijan (raspon) postotka (C) i srednjeg intenziteta fluorescencije ili MFI (od engl. Mean Fluorescence Intensity) (D) za GNLY+ limfocite u bolesnika s OA-om i zdravim kontrolama analiziranim protočnom citometrijom ($n = 18$). Razine statističke značajnosti su $*P = 0,003$ i $**P = 0,000001$ (Mann-Whitney U test). Ctrl- Zdrava kontrola; GNLY- Granulizin; OA- Osteoartritis.

Konfokalnom mikroskopijom analizirana je kolokalizacija GNLY-a (crvena fluorescencija) u odnosu na biljeg egzocitoze LAMP-1 (zelena fluorescencija) u limfocitima bolesnika s ranim OA-om koljena (Slika 54A) i zdravim kontrolama (Slika 54B). Kolokalizacija GNLY-a i LAMP-1 prikazuje se žutom fluorescencijom, kao rezultat preklapanja crvene fluorescencije GNLY-a i zelene fluorescencije LAMP-1 u citotoksičnim efektorskim stanicama kontrola, ali prvenstveno kod OA bolesnika. Izražena je u jednoj polovici stanice i formira oblik nalik pečatnom prstenu. Stupičasti grafovi (Slika 54A i B) prikazuju pojedinačne vrijednosti postotka kolokalizacije GNLY-a lokaliziranog unutar LAMP-1+ granula za četiri neovisna uzorka po grupi. Kod OA bolesnika medijan (25. – 75. percentil) GNLY-a unutar LAMP-1+ granula iznosio je 32,2% (35,4 - 38,5%) i nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na zdrave kontrole [51% (48,0 - 51,4%)].



Slika 54. Konfokalna laserska mikroskopija GNLY-a (crvena fluorescencija) i LAMP 1 (zelena fluorescencija) u limfocitima bolesnika s ranim OA-om koljena (A) i kontrolom (B). Kolokalizacija GNLY i LAMP-1 prikazuje se žutom fluorescencijom kao rezultat preklapanja zelene i crvene fluorescencije. Izvorno povećanje slika je 900×8. Postotak kolokalizacije GNLY i LAMP-1 prikazan je u stupičastim grafovima za svaki od četiri neovisna uzorka (A i B). B- Bolesnik; Ctrl- Zdrava kontrola; GNLY- Granulizin; OA- Osteoartritis;

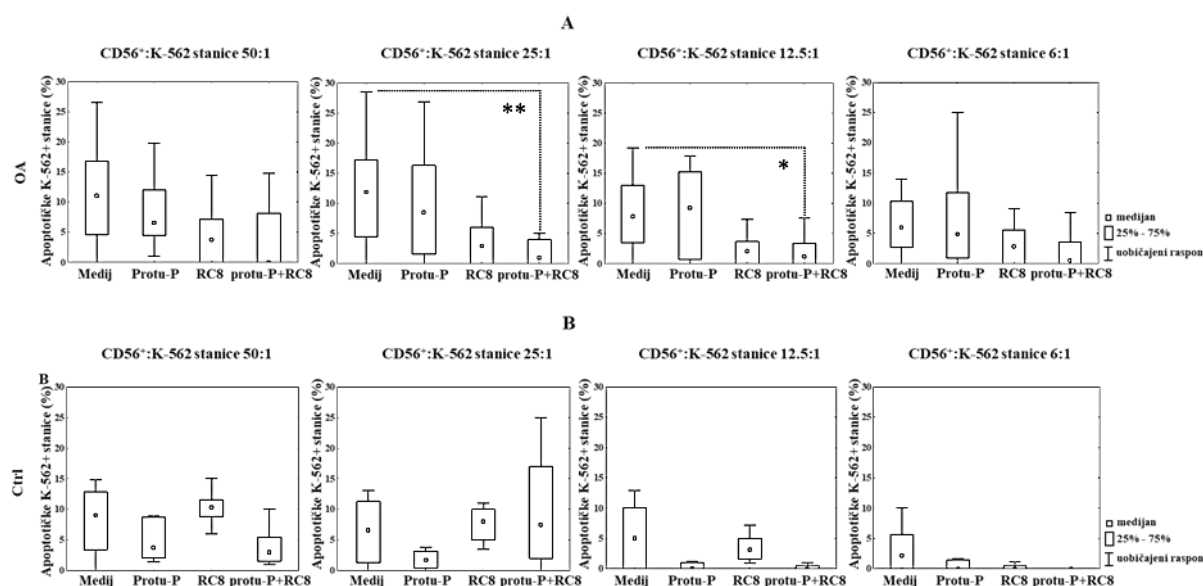
4.4.2. Citotoksični potencijal GNLY+ izvršnih stanica



Slika 55. Udio GNLY+ stanica u subpopulacijama limfocita periferne krvi. Učestalost izražaja GNLY-a u CD3-CD56+ NK stanicama, CD3+CD56- T stanicama i CD3+ CD56+ NKT stanicama između bolesnika s ranim OA-om koljena i zdrave kontrolne skupine (A). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,03$, ** $P = 0,01$ i *** $P = 0,003$ (Mann-Whitney U test) u 18 neovisnih obilježavanja. Kvadranti u točkastim dijagramima ilustriraju analizu subpopulacija limfocita bolesnika s ranim OA-om koljena (B) i zdravih kontrola (C), koje se odnose na označavanje CD3/CD56, odnosno kontrolnih protutijela iste podvrste, ali irelevantne specifičnosti. GNLY+ stanice unutar subpopulacija limfocita prikazane su kao ispunjeni histogrami u odnosu na kontrolno obilježavanje (prazni histogrami) za bolesnike s OA (B) i zdrave kontrolne skupine (C). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); Ctrl- Zdrava kontrola; GNLY- Granulizin; Ig- Imunoglobulin; OA- Osteoartritis; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); PE-Cy5- Fikoeritrin-cianin5 (od eng. Phycoerythrin- Cyanin5).

Udio GNLY+ stanica u subpopulacijama CD3-CD56+ stanicama NK, CD3+CD56- limfocitima T i CD3+CD56+ stanicama NKT statistički je značajno viši kod OA bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,01$, $P = 0,03$ odnosno $P = 0,003$) (Slika 55A). Točkastim dijagramima prikazana je analiza limfocita periferne krvi kod OA bolesnika (Slika 55B) i kontrolne skupine

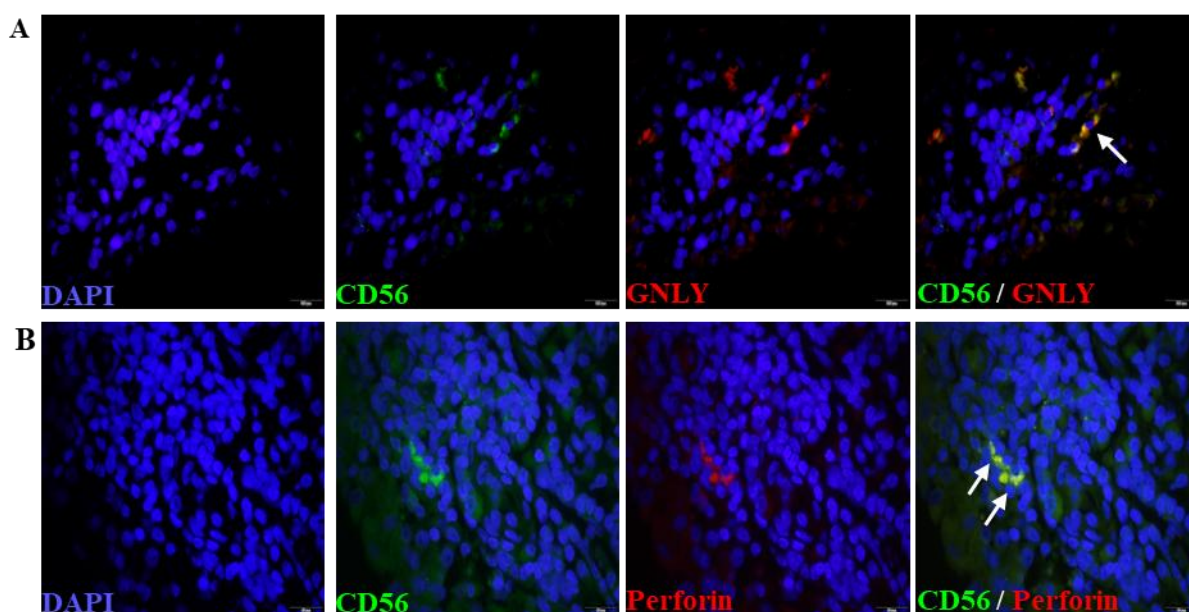
(Slika 55C) koji prikazuju udio CD3-CD56⁺ stanica NK (9,96 odnosno 8,56%), CD3⁺ CD56⁻ limfocita T (7 odnosno 5,78%) i CD3⁺ CD56⁺ stanica NKT (64,6 odnosno 73,38%) u odnosu na kontrolna protutijela iste podvrste irelevantne specifičnosti. Te vrijednosti odgovaraju medijanu (25. – 75. percentil) stanica NK [8,3% (6,8 - 10%)], limfocita T [73,2% (70,4 - 76,5%)] i stanica NKT [2,9% (2,1 - 3,9%)] kod OA bolesnika. U odnosu na dobivene vrijednosti kod OA bolesnika, nema statistički značajne razlike stanica NK [10,3% (7,2 - 14,5%)], limfocita T [70,6% (67,2 - 75%)] i stanica NKT [3,5% (2,3-5,4%)] u kontrolnoj skupini. Histogrami u sklopu Slike 55B i C prikazuju frekvenciju izražaja GNLY⁺ stanica unutar subpopulacija limfocita periferne krvi kod OA bolesnika i zdrave kontrole. Histogrami su dobiveni na temelju razlike između postotka GNLY⁺ stanica i postotka GNLY⁺ stanica u kontroli istog podrazreda protutijela irelevantne specifičnosti.



Slika 56. Analiza apoptoze posredovane GNLY-om u stanicama prirodnim ubojicama (NK) (od engl. Natural Killer Cells) periferne krvi. Stupci u dijagramima prikazuju srednje vrijednosti rane apoptoze K-562 stanica kokultiviranih sa stanicama NK iz bolesnika s ranim OA-om koljena (A) ili zdrave kontrole (B) u navedenim omjerima u samom mediju, s protu-perforinskim (protu-P) monoklonskim protutijelima (mPt), s protu-GNLY RC8 mPt, ili s kombinacijom protu-perforinskim mPt i protu-GNLY RC8 mPt. Razine statističke značajnosti su * $P = 0,01$ i ** $P = 0,006$ (Kruskal-Wallis i post-hoc Dunnov test) u 5-6 mjerenja po skupini. Ctrl- Zdrava kontrola; OA- Osteoartritis.

Slika 56 prikazuje analizu rane apoptoze posredovane GNLY-om u stanicama NK kod bolesnika s ranim OA-om koljena (Slika 56A) i kontrolne skupine (Slika 56B). Stanice NK (CD56) kokultivirane su s K-562 stanicama u omjerima 50:1, 25:1, 12,5:1 i 6:1 samo u RPMI mediju za kulturu, s protu-perforinskim (protu-P) monoklonskim protutijelima (mPt), s protu-GNLY RC8 mPt, ili s kombinacijom protu-GNLY RC8 mPt i protu-P mPt. Rana apoptoza

K-562 stanica kokultiviranih sa stanicama NK samo u mediju nije se statistički značajno razlikovala između OA bolesnika i kontrole (Slika 56A i B). Međutim, analiza molekularnih mehanizama koji su uključeni u apoptozu K-562 stanica posredovanu stanicama NK, pokazuje ranu apoptozu posredovanu GNLY-om samo kod OA bolesnika (Slika 56A). Primjena kombinacije protu-GNLY i protu-P mPt gotovo u potpunosti zaustavlja ranu apoptozu u stanicama NK u omjerima 50:1 ($P = 0,01$), 25:1 ($P = 0,006$) i 12,5:1 ($P = 0,01$) (Slika 56A), ali bez dodatnog učinka u odnosu na stanice kokultivirane samo sa protu-GNLY RC8 mPt. U kontrolnoj skupini kokultura s protu-GNLY mPt ili kombinacija protu-P mPt i protu-GNLY mPt nije statistički značajno utjecala na ranu apoptozu (Slika 56B). Kokultura samo s protu-P mPt nije imala utjecaj na ranu apoptozu K-562 stanica kod OA bolesnika (Slika 56A) kao niti kod kontrole (Slika 56B).

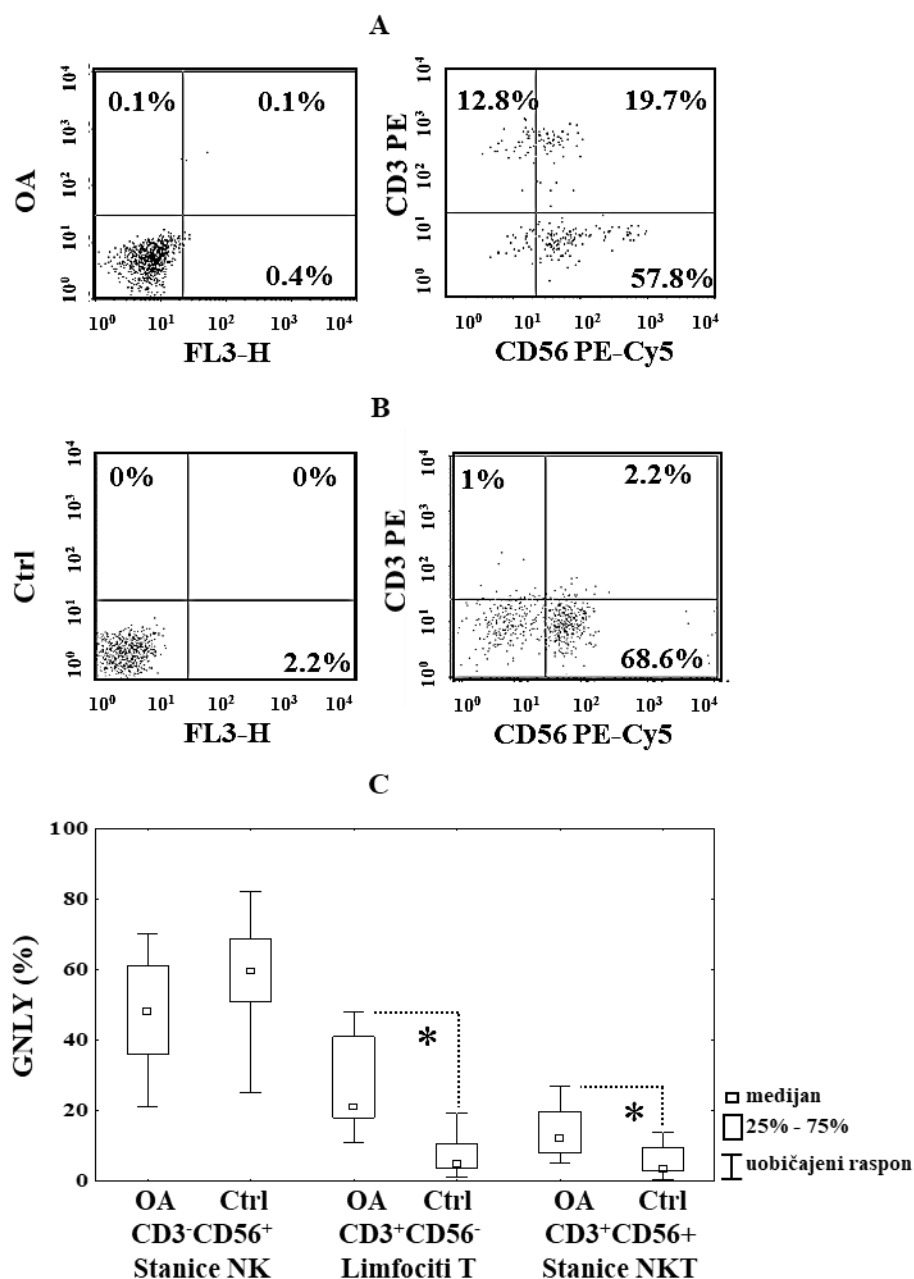


Slika 57. Izražaj citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina u CD56⁺ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescence. Vezanje zečjeg IgG protu-CD56 protutijela (Pt) fluorescira zeleno, a vezanje mišjeg IgG1 protu-GNLY Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s Alexa Fluor (AF) 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594 (A). Vezanje zečjeg IgG protu-CD56 Pt fluorescira zeleno, a vezanje mišjeg IgG2b protu-perforin Pt fluorescira crveno po vezivanju kombinacije magarećeg protu-zečjeg IgG obilježenog s AF 488 i magarećeg protu-mišjeg IgG Pt obilježenog s AF 594 (B). Preklapanje zelene i crvene fluorescence prikazuje se žutom fluorescencijom. Jezgre fluoresciraju plavo (4',6-diamidin-2-fenilindol-DAPI). Izvorno povećanje je $\times 1000$. Prikazan je jedan od 10 obilježavanih uzoraka u svakoj grupi. CD- Klaster diferencijacije (od eng. Cluster of Differentiation); GNLY-Granulizin.

Izražaj GNLY-a i perforina u CD56⁺ limfocitima sinovijske membrane zrelog OA koljena analiziran je metodom dvostruke imunofluorescencije (Slika 57). Manji broj CD56⁺ limfocita (zelena fluorescencija) izražavaju GNLY (crvena fluorescencija) (Slika 57A) kao i perforin (crvena fluorescencija) (Slika 57B). Također, rijetke su i dvostruko pozitivne CD56⁺GNLY⁺ (Slika 54A) i CD56⁺perforin⁺ stanice (Slika 54B). Dvostruko pozitivne stanice u oba primjera prikazuju se žutom fluorescencijom i označene su bijelim strelicama. Pozitivna fluorescencija CD56 limfocita i GNLY-a odnosno CD56 limfocita i perforina određena je na temelju kontrole istog podrazreda odnosno razreda protutijela irelevantne specifičnosti (Slika 14A i C).

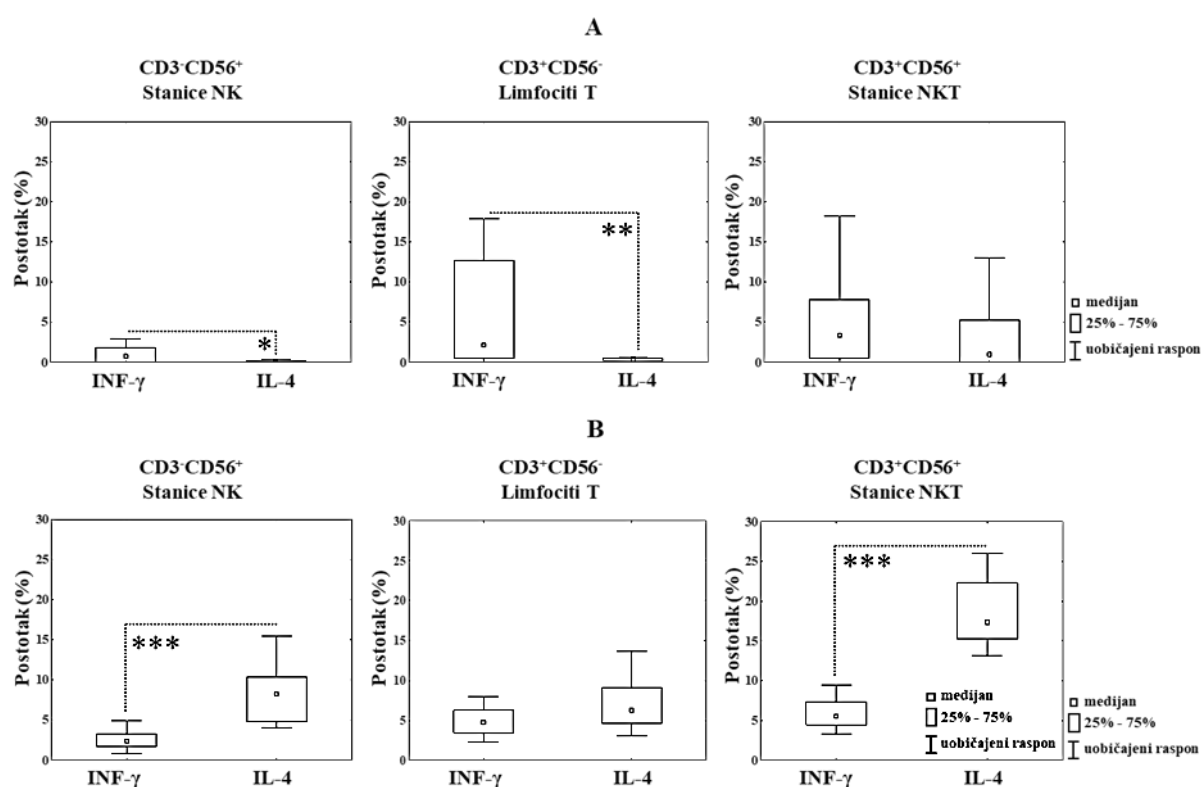
4.4.3. Raspodjela GNLY-a i unutarstanični izražaj citokina u subpopulacijama limfocita periferne krvi

Točkastim dijagramima prikazana je analiza raspodjele GNLY-a u ogradenim GNLY⁺ stanicama koje se odnose na obilježavanje CD3/CD56 subpopulacija limfocita kod OA bolesnika (Slika 58A) i kontrolne skupine (Slika 58B) u odnosu na odgovarajuća kontrolna protutijela iste podvrste, ali irelevantne specifičnosti. Uspoređujući uzorke kod OA bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu, raspodjela GNLY u CD3-CD56⁺ stanicama NK iznosi 57,8 odnosno 68,6%, u CD3+CD56⁻ T stanicama 12,8 odnosno 1%, u CD3+CD56⁺ NKT stanicama 19,7 odnosno 2,2% i zanemariva je u izotipskim kontrolama (Slika 58A i B). Kod OA bolesnika raspodjela GNLY-a u T i NKT stanicama statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,004$) dok u NK stanicama nema statistički značajne razlike između dvije skupine (Slika 58C).



Slika 58. Raspodjela GNLY-a u subpopulacijama limfocita periferne krvi. Točkasti dijagrami pokazuju raspodjelu ogradenih GNLY⁺ stanica u podvrstama limfocita koje se odnose na označavanje CD3/CD56 u odnosu na protutijela iste podvrste, ali neodređene specifičnosti u bolesnika s OA-om (A) i u kontrolama (B). Razina statističke značajnosti je * $P = 0,004$ (Kruskal-Wallisov i post-hoc Dunnov test) u 6 neovisnih mjerenja po skupini (C). CD- Klaster diferencijacije (od eng. Clusster of Differentiation); Ctrl- Zdrava kontrola; GNLY- Granulizin; Ig- Imunoglobulin; NK stanice- Stanice prirodne ubojice (od eng. Natural Killer Cells); OA- Osteoartritis; PE- Fikoeritrin (od eng. Phycoerythrin); PE-Cy5- fikoeritrin-cianin5 (od eng. Phycoerythrin- Cyanin5).

Unutarstanični izražaj IFN- γ i IL-4 u subpopulacijama limfocita periferne krvi razlikuje se između bolesnika s OA-om (Slika 59A) i zdrave kontrolne skupine (Slika 59B). Kod bolesnika s OA-om statistički značajno veći izražaj IFN- γ u odnosu na IL-4 prisutan je u stanicama NK i limfocitima T ($P = 0,03$ odnosno $P = 0,01$) dok u stanicama NKT nema statistički značajne razlike (Slika 59A). U kontrolnoj skupini, statistički je značajno veći izražaj IL-4 u odnosu na IFN- γ u stanicama NK i NKT ($P = 0,004$) dok u limfocitima T nema statistički značajne razlike (Slika 59B).



Slika 59. Usporedba unutarstaničnog izražaja IFN- γ i IL-4 u CD3-CD56⁺ stanicama NK, CD3⁺CD56⁻ limfocitima T i CD3⁺CD56⁺ stanicama NKT u bolesnika s ranim OA-om koljena (A) i zdravom kontrolom (B). Razine statističke značajnosti su * $P = 0,03$, ** $P = 0,01$ i *** $P = 0,004$ (Mann-Whitney U test) u 10-12 neovisnih mjerenja po skupini. Ctrl- Zdrava kontrola; IL- Interleukin; IFN- γ - Interferon gama; NK stanice- Stanice prirodne ubojice (od engl. Natural Killer cells); OA- Osteoarthritis.

5. RASPRAVA

OA je široko rasprostranjena svjetska iscrpljujuća bolest [299] koja većinom zahvaća pretilu žene, nižeg stupnja obrazovanja u zreloj dobi [300]. Stoga se desetljećima smatralo da OA nastaje jednostavno "habanjem" zgloba, odnosno kao posljedica izloženosti neprimijećenim ili klinički prepoznatim oštećenjima hondrocita i drugih skupina stanica, iako su se već tada prepoznale ograničene upalne promjene, najčešće na mjestima spoja hrskavice i sinovijske membrane [301,302]. Poluživot kolagena unutar hrskavice je dug, ali hrskavica zacjeljuje vrlo sporo ili uopće ne zacjeljuje, čak i kod manjih ozljeda, a njezine sastavnice se mogu naći u sinovijskoj tekućini kao DAMP [303]. Smatra se da DAMP iz oštećene hrskavice imaju presudnu ulogu u upalnom procesu sinovijske membrane, ako uzmemo u obzir da hrskavica značajno propada tijekom bolesti i ne može više omogućiti malo trenje kod pokretanja zgloba [299]. Upalni proces OA-a počinje u sinovijskoj membrani kao imunološki odgovor na „strano tijelo“ oštećene hrskavice poticanjem stanične i humoralne imunosti [304]. DAMP bivaju prepoznati receptorima na antigen predodnim stanicama, dendritičkim stanicama i makrofagima, koji postaju glavni izvor proupalnog IL-1 β , klasičnog pokretačkog citokina u OA-u [305]. Dendritičke stanice u sinovijskoj membrani predstavljaju vrlo malu populaciju koja je bitna za pokretanje i usmjeravanje imunološkog odgovora u neposrednom dodiru s okolnim stanicama u imunološkim sinapsama i za stvaranje brojnih citokina i kemokina. Brojnija izvršna skupina stanica koja podržava usmjeravanje imunološkog odgovora jesu makrofagi [306]. Koljeno je pogodan zglob za istraživanje makrofaga, jer sinovijska membrana koljena obiluje makrofagima u količini četiri puta većoj u usporedbi s OA-om kuka [307]. Našim istraživanjem smo zaista i pokazali obilnu infiltraciju sinovijskog tkiva koljenog zgloba s OA-om CD68⁺ stanicama. CD68 ili LAMP-4 je glikozilirana bjelancevina tipa I iz obitelji LAMP izražena na membranama endosoma/lizosoma [308]. Može se dobro prikazati u zrcima mononuklearnih fagocita, ali nije izražen u dendritičkim stanicama [309]. Mišji CD68/makrosijalin je izražen na membranama lizosoma u 85-90%, ali se brzo izmjenjuje s CD68 izraženim na staničnoj površini [310]. Također je procijenjeno da oko pet tisuća CD68 molekula može biti izraženo na površini humanih makrofaga [311]. Stoga se smatra da CD68 sudjeluje u prijenosu peptida i preradi antigena, iako mu funkcija još nije dovoljno istražena. Koristan je biljeg za stanice loze makrofaga uključujući monocite, histiocite, Kupfferove stanice, mikrogliju, divovske stanice i osteoklaste [308]. Izražaj CD68 je pronađen u aktiviranim granulocitima kao što su bazofili bolesnika s mijeloproliferativnim poremećajima i neutrofilima, koji potječu iz crijeva bolesnika s upalnom bolesti crijeva, ali CD68⁺ neutrofila gotovo da nema u normalnom tkivu sluznice [312]. Vrlo je slabo izražen na stanicama koje nisu mijeloidnog porijekla poput CD19⁺ limfocita B i CD4⁺ limfocita T, fibroblasta, endotelnih

stanica, miocita i tumorskih stanica [313], što ipak dovodi u pitanje specifičnost ovog biljega za makrofage, iako je izražaj CD68 mnogo puta jači u mijeloidnim stanicama [314]. CD68 ne može razlikovati makrofage različitog porijekla tj. makrofage unutar tkiva koji potječu iz monocita ili izravno iz mijeloidnih progenitorskih stanica tijekom hematopoeze [315]. Stoga obilježavanjem CD68 biljega nismo mogli razlučiti vrste makrofaga ovisno o porijeklu, iako smo jasno razlikovali izdašnu populaciju CD68⁺ makrofaga koji su bili uz samu površinu sinovijskih izdanaka i CD68⁺ makrofage koji su se nalazili u stromi izdanaka obilno okruženi stanicama okruglog oblika, a koje nisu izražavale CD68 biljeg. Pretpostavili smo da su stanice koje se ne obilježavaju s CD68 limfociti, sudeći po obliku i smještaju, ali i činjenici da se biljeg CD68 koristi za razlikovanje monocitno/makrofagne linije od limfocita koji ne izražavaju CD68 [316] ili izražavaju CD68 vrlo slabo [314] u tkivnim nakupinama. Obilježavanjem tkivnih rezova sinovijskog tkiva tehnikom dvostruke imunofluorescencije uz analizu fluorescentnim mikroskopom dokazali smo da se u našim uzorcima radi o limfocitima CD3⁺ i CD56⁺ fenotipa, koji neposredno okružuju CD68⁺ makrofage. To je u skladu s nalazom žarišta CD4⁺ i CD8⁺ limfocita T i stanica NK u bioptičkim uzorcima odabranim iz područja znatno upaljene sinovije bolesnika s OA-om koljena [307]. U našim uzorcima sinovijskog tkiva uzetih iz područja bez makroskopski vidljive upale, vidjelo se samo nekoliko infiltriranih limfocita što odgovara velikom rasponu od oko 5 do 80 CD68⁺ stanica po vidnom polju srednjeg povećanja mikroskopa. Čini se da su upalne promjene u sinovijskoj membrani nađene u OA-u anatomske ograničene i različite jačine, ali kada su prisutne, mikroskopski se ne mogu razlikovati od promjena koje su prethodno opisane kao svojstvene za RA [301]. Stekli smo dojam da se brojni CD68⁺ makrofagi stimuliraju antigenima (DAMP) iz sinovijske tekućine i zatim migriraju u unutrašnjost sinovijskih izdanaka prema krvnim žilama, gdje ih presretnu brojni limfociti. To podržava spoznaju da izražaj CD68 u makrofagima miša i čovjeka nastaje kao odgovor na upalne podražaje kao što je izloženost proizvodima oštećene hrskavice ili oxLDL-u [317] prisutnom u sinovijskoj tekućini [318] i sinovijskoj membrani [319]. U nakupinama limfocita, aktivirani pomoćnički limfociti T definirani izražavanjem Leu-3a⁺ antigena [320] bili su obrubljeni stanicama s dugačkim izdancima prekrivenim s HLA-DR molekulama za predočavanje antigena [301]. U našim pokusima oko 90% svježe izdvojenih CD68⁺ makrofaga iz sinovijskog tkiva su izražavali HLA-DR molekulu na staničnoj membrani, što ukazuje da sinovijski makrofagi mogu predočavati prerađene antigene iz okoline CD4⁺ limfocitima T [321]. Svježe izdvojeni iz sinovijske membrane posjeduju bogat izražaj CD80 i pogotovo CD86 za kostimulaciju limfocita T, kako se ne bi izazvala limfocitna areaktivnost (anergija) [322,323],

a stvaranje i lučenje citokina i kemokina iz makrofaga podržava usmjerenost, uvećava i proširuje imunološki odgovor [324].

Od proupalnih M1 citokina najveći postotak CD68⁺ stanica izražavao je u citoplazmi IL-15 u odnosu na IFN- γ i TNF- α . IL-15 je citokin prisutan u citoplazmi i na površini makrofaga koji stimulira susjedne stanice na parakrini način i putem imunološke sinapse u neposrednom dodiru [325]. On je posebno važan faktor rasta, umnožavanja i diferencijacije stanica NK [326], koje su kroz CD56 obilježavanje prikazane u tijesnom dodiru sa stanicama koje izražavaju CD68 biljeg u stromalnim nakupinama limfocita. IL-15 potiče citotoksični potencijal stanica NK [325], ali ne nužno i citotoksičnost [327], što ovisi o mnogobrojnim istovremenim signalima putem aktivacijskih i inhibicijskih receptora izraženih na stanici NK u ovisnosti o stupnju diferencijacije i sazrijevanja [328].

Lučenje pojedinih kemokina također je više svojstveno M1, odnosno M2 makrofagima. Kemokini su male bjelančevine veličine 8-12 kDa koji posreduju kemotaksiju, odnosno usmjerenje gibanja stanica imunološkog sustava i poticanje aktivnosti regrutiranih izvršioca [329]. Utjecaj kemokina na patogenezu OA-a povezuje se s ranom fazom razvoja OA-a [239] i unutarstaničnom aktivacijom NF- κ B signalnog puta [330]. Tim mehanizmima sudjeluju u razvoju i održavanju upalnog procesa zahvaćenog zgloba, ali također doprinose apoptozi hondrocita stimulacijom sinteze MMP-a i ADAMTS-a te ogoljavanju subhondralne kosti [107,330]. U patogenezi OA-a najznačajniji učinak imaju proupalni kemokini CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 i CCL8 [107,239,330]. U našem istraživanju oko 70% svježe izdvojenih CD68⁺ makrofaga iz sinovijske membrane izražavali su u citoplazmi CCL2, što je statistički značajno više od postotka CCL3 (20-30%). CCL2 je mali M1 CC kemokin, koji se luči na proupalni poticaj i značajno nadzire regrutiranje monocita [331], dendritičkih stanica, memorijskih limfocita T [332] i stanica NK [333] koje izražavaju CCR2 i CCR4 na mjestu ozljede tkiva. Stanice koje izražavaju CCR2 nakupljaju se u sinovijskoj membrani bolesnika s OA-om, od kojih su makrofagi povezani s erozijom hrskavice [334]. U sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om, koncentracije CCR2 liganada (CCL2, CCL7 i CCL8), ali ne i CCR5 liganada (CCL3, CCL4 i CCL5) bile su povišene [334], što je u skladu s našim rezultatima izražaja CCL2 i CCL3 u CD68⁺ makrofagima. Miševi kojima je nedostajao CCL2 ili CCR2, bili su zaštićeni od OA-a s istodobnim smanjenjem broja monocita/makrofaga u zglobovima [334]. Jednako tako kočenje provođenja signala putem CCL2/CCR2 značajno je smanjilo nakupljanje makrofaga, jačinu sinovitisa i oštećenje hrskavice kod miševa s OA-om [334]. Ovi rezultati ukazuju na važnost uloge CCL2 kemokina u patogenezi OA-a. Razlika u izražaju CCL2 i CCL3 se lijepo oslikala metodom imunohistokemije u tkivnom rezu uklopljenom u parafin, gdje su osobito makrofagi

s površine sinovijskih izdanaka izražavali proupalni CCL2, što upućuje na stimulaciju makrofaga tvarima koje su prisutne u sinovijskoj tekućini. Iako manje izražen od CCL2, CCL3 stvoren u koljenu s OA-om regrutira cirkulirajuće CD14+CD16- monocite u upaljenu sinovijsku membranu putem CCR1 receptora [335], što odgovara fenotipu približno 90% svježe izdvojenih makrofaga iz sinovijske membrane u našim pokusima. CCL3 posreduje osteoklastogenezu i njegova koncentracija se povećava u serumu prirodno ostarjelih miševa [336] te žena s osteoporozom nakon menopauze [337] zajedno s razvojem fenotipa starenja kostiju, uključujući gubitak koštane mase i ulaganje masti u koštanu srž. Mi smo dokazali da oko 15% svježe izdvojenih sinovijskih CD68+ makrofaga iz sinovijske membrane bolesnika s OA-om izražava CCR5, koji predstavlja ligand za CCL3 i koji moguće označava makrofage diferencirane iz monocita, koji su pod utjecajem CCL3 naselili zglob i sudjeluju u oštećivanju hrskavice i kosti.

Proizvodnja i lučenje CCL2, CCL3 i CCL5 od strane hondrocita značajno je povećano u OA-om zahvaćenom zglobu [338]. U svojoj studij Xu i sur. [339] su pokazali povećan izražaj CCL2 i CCR2 u stanicama hondrocita izoliranih iz zgloba s OA-om po stimulaciji s CCL2 u odnosu na zdravu kontrolu. CCL2 utječe na smanjenje umnažanja hondrocita i stvaranja proteoglikana kao ključnih građevnih molekula zglobne hrskavice te povećava proizvodnju i učinak iNOS-a što povećava njihovu apoptozu i nekrozu [339,340]. CCL3 također potiče apoptozu hondrocita, razaranje zglobnog tkiva i stvaranje proupalnog okruženja u zglobu zahvaćenom OA-om [341]. CCL2, CCL3 i CCL5 utječu i na pojačano stvaranje osteoklasta i istovremeno smanjenje stvaranja i učinka osteoblasta u subhondralnoj kosti bolesnika s OA-om što dovodi do njene razgradnje, razvoja osteopenije i smanjenja mineralne gustoće kostiju koji ubrzavaju napredovanje osteoporoze [338,342].

CCR7 zadužen za putovanje aktiviranih antigen predočnih stanica prema limfnom čvoru [343] izražavalo je svega oko 2% svježe izdvojenih CD68+ makrofaga, što govori u prilog makrofaga koji djeluju lokalno u zglobnim tkivima regrutiranjem Th1 limfocita [344].

Dok CCL2 i CCL3 posreduju oštećivanje tkiva u upali i narušavanje tkivne strukture regrutiranim leukocitima, M2 kemokini potiču stišavanje upale, čišćenje staničnih ostataka fagocitozom, tkivnu regeneraciju, ali i fibrozu [196]. Od M2 kemokina udio CCL22 je iznosio oko 40% i bio je statistički značajno viši u odnosu na neznajčajni izražaj CCL17 na sinovijskim CD68+ makrofagima. Međutim, udio stanica koje izražavaju M2 kemokin CCL22 je bio manji od udjela stanica koje izražavaju M1 kemokin CCL2, iako se temeljem jednog biljega za polarizaciju ne može jasno odrediti dominacija M1 ili M2 makrofaga u sinovijskoj membrani. CCL22 potiče apoptozu hondrocita *in vitro* i potiče upalu u sinoviocitima nalik na fibroblaste

jer smanjuje njihov izražaj IL-4 i IL-10 [345]. CCL22 je član obitelji CC-kemokina, koji uglavnom proizvode makrofagi i dendritičke stanice nakon stimulacije mikrobnim produktima, a potiču ga citokini Th2 grupe, kao što su IL-4 i IL-5, ali ga smanjuju citokini Th1 grupe, kao što je IFN- γ [346]. CCL22 uzrokuje kemotaktičku migraciju dendritičkih stanica i Th2 stanica i povezan je s bolestima koje su posredovane s Th2 imunološkim odgovorom, kao što su preosjetljivost dišnih putova i atopijski dermatitis [346]. Prisutnost CCL22 u sinovijskoj tekućini, kao i CCL2 i CCL17, smatra se ključnim čimbenikom za razvoj boli u zglobovima [338]. U modelu ranog OA-a na štakorima dokazano je da je koncentracija CCL22 u serumu u pozitivnom međudnosu s jačinom boli i strukturnim promjenama na zglobnoj hrskavici [347]. Također, istraživanja na štakorskim i humanim hondrocitima u OA-u su dokazala zajednički izražaj CCL22 i kaspaze-3, koja predstavlja biljeg apoptoze stanica, što ukazuje na njegovu moguću ulogu u regulaciji staničnih signalnih puteva koji dovode do razaranja zglobne hrskavice [347]. Utjecajem na stanice makrofaga i fibroblasta u sinovijskoj membrani CCL22 potiče aktivnost proupalnih čimbenika S100A12 i NF- κ B te MMP-a i smanjuje djelovanje protuupalnih čimbenika IL-4 i IL-10 [338] što ukazuje na njegov mogući utjecaj na ranu patogenetsku fazu razvoja oštećenja hrskavice [347]. U sinoviji makrofagi i dendritičke stanice stvaraju kemokinski ligand CCL17 [348]. CCL17 neposredno potiče fibroblaste na stvaranje i otpuštanje MMP-a koje uzrokuju oštećenje zglobnih struktura [338]. Stoga je CCL17 uključen u nastanak boli koja je potaknuta s GM-CSF-om i ovisna o COX-i [338]. Povećan izražaj CCL17 u sinovijskoj membrani i subhondralnoj kosti kod muškaraca s OA-om koljena u pozitivnom je međudnosu s boli koja se javlja kod pritiska na zglob [349].

Ugađanje je ključni aspekt upalne reakcije neophodan u homeostazi i patologiji [349]. Istovremeno s izražavanjem proupalnih CC kemokina, oko 15% CD68+ makrofaga je izražavalo i mamac D6 za većinu proupalnih, ali ne homeostatskih kemokina [349], što ukazuje na postojanje mehanizama stišavanja proupalnog lokalnog imunološkog odgovora. Naime, receptor mamac D6 igra neredundantnu ulogu u kontroli upalnih procesa kroz uklanjanje upalnih kemokina, jer ih dovodi do odjeljaka za degradaciju u makrofagima [350].

Makrofagi su izrazito plastični i sposobni modificirati svoj fenotip i ponašanje prema znakovima iz mikrokolišta te nastaje dihotomija na M1 i M2 makrofage, koja se odražava i postoji paralelno s Th1 i Th2 podskupinama limfocita [349,351]. Kao odgovor na bakterijske motive (npr. LPS) i IFN- γ , makrofagi prolaze kroz M1 "klasičnu aktivaciju", stvaraju puno IL-12, a malo IL-10 i podržavaju proupalnu orijentaciju Th1 limfocita [352]. Upalni podražaji povećavaju izražaj PRR-a, pojačavajući njihovo imunološko ponašanje u vezi s uklanjanjem bakterija, odnosno upalom općenito i utječu na ravnotežu lučenja citokina [351]. Smatra se da

polarizacija makrofaga nastaje u ovisnosti o PAMP koji se veže na različite stanične PRR poput TLR4, CD91, CD206 i CD209 [353]. Oko polovice svježe izdvojenih sinovijskih makrofaga izražavali su PRR CD91, CD206 i TLR4, dok je CD209 bio znatno manje izražen. CD91 je receptor za gp96, odnosno za antigenske peptide koji su praćeni s gp96, a našli su se u izvanstaničnom okružju nakon oštećenja stanice i njezine smrti nekrozom [354]. CD91 također veže Hsp70 i kalretikulin [355]. Stoga CD91 djeluje kao senzor nekrotičnih stanica [356]. Antigenski peptidi se putem CD91 internaliziraju u makrofagima i bivaju predloženi kroz endogeni put prezentacije antigena u sklopu MHC molekula razreda I citotoksičnim CD8⁺ limfocitima [356,357]. Pored internalizacije, CD91 potiče unutarstanični prijenos signala koji nizvodno posreduje u umnažanju, pokretljivosti i sazrijevanju makrofaga [355]. Gp96 i Hsp70 potiču djelotvornost NF- κ B u makrofagima [355] i podupiru M1/Th1 obrambene mehanizme. Međutim, kalretikulin u okruženju s TGF- β potiče odgovore Th17 stanica na način ovisan o CD91 [355]. Oba mehanizma mogla bi biti aktivna u sinovijskoj membrani *in vivo*, budući da je dvostruko obilježavanje imunofluorescencijom dokazalo NF- κ B i IL-17 u CD68⁺ stanicama. Tijekom 18 sati kultivacije *in vitro* udio CD91⁺ makrofaga (CD68⁺ stanica) se statistički značajno smanjuje po izlaganju LPS-u u odnosu na kulturu samo u mediju, što tumači svojevrsno sazrijevanje makrofaga [358].

U zdravim stanicama Hsp70 je glavni inducibilni protein toplinskog stresa čiji je izražaj potaknut staničnim stresorima poput povišene temperature, produktima oksidativnog stresa (ROS), hipoksije i upale [359]. Unutarstanični Hsp70 ima ulogu molekulskog šaperona nastojeći popraviti greške u strukturi staničnih bjelančevina te ujedno surađuje i sa staničnim mehanizmima u uklanjanju oštećenih bjelančevina kako bi se na taj način očuvala homeostaza i funkcija stanice [360]. U krvi bolesnika s OA-om koncentracija potaknutog (inducibilnog) Hsp70 je veća nego u zdravih [361], što upućuje da se lokalna imunološka zbivanja iz OA zgloba odražavaju na sustavnoj razini. U sinovijskoj membrani zgloba s OA-om, izražavanje Hsp70 i konstitutivnog Hsc70 (od eng. Heat Shock constitutive 70) je neznatno [361]. Imunohistokemijskim obilježavanjem dokazali smo rijetke Hsp70 u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena u jezgri i citoplazmi limfocita nakupljenim u stromi sinovijske membrane. Metodom dvostruke imunofluorescencije dokazali smo unutarstanični izražaj Hsp70 u svega oko 5% CD68⁺ makrofaga. Poznato je da se Hsp70 pojačano oslobađa u izvanstanični prostor i djeluje kao DAMP, kao posljedica apoptoze ili nekroze stanica koje su izazvane pojačanim oksidativnim stresom u stanjima kao što je upala, infekcija ili mehaničko oštećenje stanica, [167]. Stoga sinovijska tekućina zgloba s OA-om ima trostruko veću koncentraciju Hsp70 u

odnosu na perifernu krv bolesnika s OA-om, a obje su u pozitivnom međuođnosu s radiografskim stupnjem oštećenja OA-a koljena [360].

Hsp70 vezanjem na TLR4 i/ili TLR2 putem MyD88/NF- κ B transkripcijskih čimbenika potiče proizvodnju proupalnih citokina. Svježe izdvojene mononukelarne stanice sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena, koje su stimulirane s Hsp70 u koncentraciji od 2 μ g/ml u našem istraživanju smanjile su izražaj TLR4 na CD68+ makrofagima za 50% u odnosu na stanice inkubirane u RPMI mediju za kulturu. To je u skladu s podacima o vezanju Hsp70 za TLR4 na dendritičkim stanicama [362], gdje Hsp 70 potiče proizvodnju proupalnih citokina putem MyD88/NF- κ B signaliranja [166]. Stoga je moguće da Hsp70 usmjerava M1 polarizaciju makrofaga u sinovijskom tkivu i podržava egzacerbacije OA-a u ljudi .

PRR CD206 i CD209 su biljezi M2 makrofaga [196]. CD206 služi za internalizaciju različitih liganada, od kojih se endocitoza FITC-dekstrana odvija putem regije za prepoznavanje ugljikohidrata, iako FITC-dekstran može prijeći staničnu membranu putem klatrin-ovisne endocitoze [363]. Stanice CD68+ fenotipa su manje fagocitirale FITC-dekstran i izražaj CD206 je bio statistički značajno manji nakon 18 sati kultivacije *in vitro*, moguće zbog *in vitro* fenotipskog i funkcijskog sazrijevanja makrofaga u dodiru s laboratorijskim posuđem [364]. Od ranije je poznato da izduživanje makrofaga, bez egzogenih citokina, dovodi do izražaja biljega fenotipa M2 i smanjuje izlučivanje upalnih citokina [365]. Produljivanje stanica pojačava učinke citokina IL-4 i IL-13 koji potiču M2 i štite stanice od podražaja s LPS-om i IFN- γ koji potiču M1 [365]. To je u skladu s našim rezultatima, koji dokazuju statistički značajno smanjenje udjela CD68+ makrofaga, koji u svojoj citoplazmi sadržavaju IFN- γ , IL-17 i IL-15 nakon 18 sati kulture samo u RPMI mediju za kulturu, a ni LPS nije mogao povećati njihov izražaj.

IL-15 je utvrđen u većoj koncentraciji u sinovijskoj tekućini i sinovijskoj membrane bolesnika s ranim OA-om koljena u odnosu na zreli (kasni) OA [366] i učinkovit je kemoatraktant za neaktivirane i aktivirane limfocite T i stanice NK [367]. IL-15 u sinovijskoj tekućini je bio u pozitivnom međuođnosu s infiltracijom sinovijske membrane s CD8+ limfocitima te koncentracijom MMP-1, IL-6 i TNF- α [366].

IFN- γ je utvrđen u zglobo bolesnika s OA-om, a učestalost Th17 stanica je bila manja u zglobo bolesnika s OA-om nego s RA-om [368]. IL-6, IFN- γ , TNF- α i MMP-e mogu se stvarati po aktivaciji TLR4 [163]. Svježe izdvojeni CD68+ makrofagi iz sinovijske membrane izražavaju oko 50% TLR4, koji se znatno smanji na oko 10%, nakon 18 sati kulture *in vitro* samo u RPMI mediju za kulturu. LPS je prototip liganada za TLR4, koji potiče M1/Th1 odgovor *in vivo* i *in vitro* putem koreceptorske CD14 molekule za provođenje signala u stanicu po vezanju liganada

za TLR4 [196]. Metodom dvostrukog obilježavanja imunofluorescencijom oslikalo se istovremeni izražaj CD68 i CD14 u sinovijskoj membrani, a protočna citometrija je dokazala da preko 80% CD68+ stanica izražava CD14. LPS se veže na TLR4 i potiče provodnju signala za aktivaciju NF- κ B, što dovodi do nishodne regulacije M2 biljega CD206 na površini makrofaga [369,370] i svojevrsnog preusmjeravanja tj. ponovnog programiranja makrofaga u M1 [196]. U istom smislu govore rezultati naših istraživanja, koji dokazuju smanjenje CD206 i CD91 u kulturi sinovijskih CD68+ makrofaga, nakon 18 sati stimulacije s LPS-om *in vitro*, što predstavlja proces sazrijevanja zajedno s povećanim izražajem kostimulacijske molekule CD86 [358,370]. LPS je povećavao unutarstanično stvaranje proupalnih monokina CCL2 i CCL3, ali i smanjio izražaj njihovog receptora D6 na sinovijskim CD68+ makrofagima i time pojačao upalnu reakciju svojstvenu za M1 fenotip [338,352]. Udio CD68+ makrofaga, koji su izražavali CCL17 i arginazu-1, svojstvenih za M2 polarizaciju [371,372], su bili smanjeni u suspenziji kultiviranih sinovijskih makrofaga poticanih s LPS-om. Stoga je dominirao udio iNOS+CD68+ makrofaga u odnosu na makrofage koje su izražavali arginazu-1. To ponovno ukazuje na dominaciju M1 fenotipskih obilježja sinovijskih makrofaga po stimulaciji s LPS-om *in vitro*.

Stecheni imunitet, u kome jača M1/Th1 imunološki odgovor potiče obranu protiv unutarstaničnih mikroorganizama [373] i poželjan je u obrani od infekcija i tumora [374], ali pretjerana aktivnosti M1, odnosno Th1, koja je izmakla nadzoru može uzrokovati artritis i kardiovaskularne bolesti, uključujući pucanje aterosklerotskog plaka kao najtežu kliničku manifestaciju kardiovaskularnih bolesti [219]. To objašnjava visoku stopu komorbiditeta (>90%) od kojih prednjače arterijska hipertenzija (>80%) i šećerne bolesti (>30%) kod bolesnika s OA-om [31] u čijoj podlozi je endotelna disfunkcija [375,376].

Pokazalo se da makrofagi imaju ključnu ulogu u svim fazama aterogeneze, od započinjanja do stvaranja nekrotične jezgre i pucanja plaka [227,377]. Lezijski makrofagi primarno potječu od krvnih monocita, ali u plaku postoje i lokalni makrofagi koji se diferenciraju iz glatkih mišićnih stanica [227,378]. Makrofagi nastali iz monocita su brojniji u plaku, pokazuju proupalnu aktivnost i mogli bi promicati ranjivost plaka. Lokalni makrofagi plaka povezani su s homeostatskom aktivnošću, ali bi mogli biti proaterogeni u ranim fazama, dok kasnije promiču stabilnost plaka [227,377,379]. Slično plaku, rezultati našeg istraživanja dokazuju da se izdužene stanice koje izražavaju arginaza-1, biljeg M2 makrofaga [380], nalaze u blizini površine izdanaka sinovijske membrane, a okruglije stanice koje izražavaju iNOS, biljeg M1, u stromi sinovijske membrane, iako obje skupine predstavljaju makrofage sudeći po smještaju, obliku i izražaju arginaza-1/CD68+ ili iNOS/CD68+ biljega. Naime, makrofagi usvajaju

različite oblike stanice *in vivo* i *in vitro* tijekom polarizacije prema različitim fenotipovima [365]. M2 stanice pokazuju izduženi oblik u usporedbi s M1 stanicama [365]. Fenotip makrofaga također može ovisiti o smještaju u tkivu [381] jer makrofagi brzo reagiraju na promjene u mikrookruženju, mijenjajući se između proupalnih (M1) i različitih protuupalnih (M2) funkcionalnih fenotipa, kako je dokazano u masnom tkivu [382] ili aterosklerotskom plaku [227]. Makrofagi koji se nalaze u masnom tkivu mršavih miševa izražavaju biljege M2, dok su makrofagi masnog tkiva iz pretilih miševa M1 fenotipa i doprinose otpornosti na inzulin, što je opaženo i kod ljudi [382]. Aktivacija transkripcijskih čimbenika kao što su NF- κ B i IRF5, koja može uslijediti po vezanju liganda za TLR4 može potaknuti proupalnu aktivnost M1 doprinoseći fenotipu ranjivog plaka [227]. U zglobu s OA-om preusmjeravanje polarizacije M1 u M2 fenotip makrofaga smanjuje proupalni odgovor i povećava protuupalni odgovor makrofaga i sinoviocita, a time smanjuje upalu sinovijske membrane i oštećenja zglobnih tkiva [383]. Također, transkripcijski faktori kao što su IRF4 i PPAR γ mogu usmjeriti makrofage prema M2 podskupini potičući protuupalnu aktivnost i stabilnost plaka [227]. M2 makrofagi fino podešavaju Th2 odgovore i stečeni imunitet, čiste stanične ostatke nakon preinake tkiva receptorima za čišćenje, promiču imunološku snošljivost i popravak tkiva i predstavljaju heterogenu populaciju [352]. M2a makrofagi nastaju pod stimulacijom IL-4 i IL-13, jer ovi citokini koče učinak STAT1, NF- κ B djelotvornost, proizvodnju IFN- β i M1 polarizaciju [384], a povećavaju izražaj mamca za IL-1R tip II i IL-1R antagonist (IL-1Ra) za suzbijanje učinka IL-1 β [385]. U našim pokusima oko 35% CD68⁺ makrofaga izražava mamac IL-1R tip II za IL-1, bitnog pokretača upale i imunoloških reakcija u OA-u [386]. Naime, IL-1 se veže na dvije vrste receptora na staničnoj membrani, od kojih samo tip I (IL-1RI) provodi signale zajedno s pomoćnom bjelančevinom IL-1 receptora (IL-1RAcP), dok tip II (IL-1RII) funkcionira isključivo kao receptor mamac za vezanje liganda (IL-1) bez sudjelovanja u signalizaciji IL-1 [387]. Pored već dobro poznatih poticatelja IL-4/IL-13 za M2a, imunoloških kompleksa za M2b, IL-10/glukokortikoida za M2c i agonista adenozienskog receptora za M2d [352], nedavno su prepoznate dodatne podvrste makrofaga unutar plaka kao odgovor na CXCL4 (M4), komplekse hemoglobin/haptoglobin (HA-mac/M(Hb)) i hem (Mhem) i oksidirane fosfolipide (Mox) [227]. Široko korištena M1-M2 nomenklatura koja opisuje makrofage može biti prerevna, a makrofagi mogu umjesto toga postojati kao kontinuum, izražavajući biljege i funkcije M1 i M2 podvrste, samo u različitim omjerima. Tako u uzorcima sinovijske membrane u našem istraživanju metodom dvostruke imunofluorescencije nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti CD68⁺ makrofaga, koji su izražavali M1 unutarstanični biljeg iNOS i M2 biljeg arginaza-1. Takva polarizacija makrofaga opisana je kao progresija među višestrukim

podvrstama makrofaga, koji odražavaju aktivnost različitih transkripcijskih čimbenika u staničnoj signalizaciji [227]. Danas se OA shvaća kao složeno međudjelovanje lokalnih i sistemskih čimbenika s upalom male jačine nepoznatog uzroka [388]. Pored čimbenika koji se ne mogu modificirati (dob, spol, nasljeđe) prepoznat je doprinos endokrinih i metaboličkih čimbenika [148]. Zna se da lipidi utječu na obrasce aktivacije makrofaga [385]. Poticanje makrofaga pomoću oxLDL-a razvija aktivirani makrofag, koji pokazuje značajke aktivacije M1 i M2 dok su proizvodi MMP-a povezani s rupturom plaka [227,389] i moguće oštećuju zglobna tkiva u OA-u. Budući da je CD68 receptor za vezanje oxLDL-a, može surađivati s drugim receptorima čistačima za olakšavanje unosa lipida [390]. Pretpostavlja se da pjenaste stanice plaka, izvedene iz nedavno regrutiranih monocita, mogu imati nezreli fenotip koji ne odgovara niti M1 ni M2 makrofagima, dok zrele pjenaste stanice pokazuju značajke klasične i alternativne aktivacije [391].

Upalni događaji često su popraćeni oksidativnim stresom, koji prekomjerno stvara proizvode peroksidacije lipida, kao što je 4-HNE [392]. 4-HNE, proizvod je oksidacije višestruko nezasićenih omega-6 masnih kiselina i sudjeluje u degeneraciji hrskavice i subhondralnom preoblikovanju kosti tijekom razvoja OA-a [393]. Povećana koncentracija 4-HNE utvrđena je u nadtalogu sinoviocita iz zgloba s OA-om u odnosu na sinoviocite iz zgloba s RA-om ili zdrave kontrolne skupine *in vitro* [394]. Koliko je nama poznato, mi smo prvi put pokazali izražaj 4-HNE u CD68+ makrofagima smještenim na površini izdanaka sinovijske membrane. To je u skladu sa spoznajom da je 4-HNE prisutan u sinovijskoj tekućini bolesnika s OA-om [395]. Njegova koncentracija smanjuje se po primjeni hijaluronske kiseline u zglob zajedno s olakšanjem simptoma OA-a [395].

Suprotno tome u C57BL/6 miševa dijeta s malim dozama 4-HNE je pogoršala upalnu bolest crijeva, jer je smanjila izražaj molekula zasluženih za nadziranje propusnosti epitelne barijere (okludina), pojačala ulaz bakterijskog proizvoda (LPS) u podsluznični sloj što je dovelo do povećanog podražaja TLR4 signalnih puteva i pogoršanja proupalne bolesti [396].

Disregulacija TLR-a povećava rizik od kroničnih upalnih bolesti i imunoloških poremećaja. Dokazano je da 4-HNE uklanja aktivaciju mišjih makrofaga (RAW264.7) i primarnih makrofaga, koji potječu iz koštane srži LPS-om, jer potiskuje dimerizaciju TLR4 receptora kao prvog koraka u njegovoj aktivaciji, potiskuje aktivaciju NF- κ B i IRF3, te izražaj IFN- β , IL-10, CCL5 (RANTES, od eng. Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) i TNF- α [392]. Kočenje aktivacije TLR4 pomoću 4-HNE je smanjilo fagocitnu aktivnost makrofaga [392]. To sve ukazuje da 4-HNE utječe na urođene imunološke odgovore, moguće i na CD68+

makrofage na površini izdanaka sinovijske membrane u bolesnika s OA-om iz našeg istraživanja, kako bi smanjili upalni odgovor na ligande TLR4.

7-KC nastaje neenzimatskom oksidacijom kolesterola u tkivima, uključujući zglob i pokazuje 100 puta veću toksičnu aktivnost od molekule kolesterola [252]. Zbog svoje nestabilnosti teško se istražuje metodama obilježavanja tkiva [248], stoga smo mi istraživali da li 7-KC u farmakološkim koncentracijama vezanjem na TLR4 može mijenjati urođene imunološke odgovore u izdvojenim mononuklearnim stanicama sinovijske membrane *in vitro*.

Najprije smo provjerili smrtnost CD68+ makrofaga kultiviranih sa 7-KC-om tijekom 18 sati i ustanovili da se smrtnost povećava 10-40% na doza ovisan način pri koncentracijama od 1,25 do 10 µg/ml 7-KC-a, testirano PI-om u koncentraciji od 1,75 µg/ml protočnom citometrijom. Relativno velika smrtnost stanica kultiviranih 18 sati s 10 µg/ml 7-KC-a, mogla bi se odražavati na smanjenje izražaja TLR4 na CD68+ makrofagima i umanjiti snagu zaključka da se 7-KC veže za TLR4, jer smanjuje specifično vezanje protutijela za TLR4 i potiče proupalni imunološki odgovor. Međutim, u tom slučaju ne bismo imali niti zabilježen statistički značajan porast izražaja CCL2 i CCL3 u CD68+ stanicama kao i kod stimulacije s LPS-om uz smanjenje D6, što pogoduje povećanju lokalne upalne reakcije [338,352]. Dokazali smo također porast udjela CD68+ makrofaga koji izražavaju CD86 koreceptorsku molekulu za predočavanje antigena te statistički značajno povećan izražaj CCR7 na CD68+ makrofagima iz sinovijske membrane zgloba s OA-om pod utjecajem 7-KC-a, koji je odgovoran za putovanje zrelih stanica u regionalni limfni čvor prema CCL19 i CCL21 zbog predočavanja antigena [397]. Istovremeno se smanjio izražaj CD206 i CD91 pod utjecajem 7-KC-a, što smanjuje sposobnost endocitoze makrofaga tijekom sazrijevanja [196,358] te i CCR5 što smanjuje zadržavanje CD68+ makrofaga u sinovijskom tkivu preplavljenom CC kemokinima CCL2 i CCL3 (ligandima za CCR5) [334]. Još uvijek se ne zna da li CCR7+CD68+ makrofagi sudjeluju u aktivaciji sustavne imunosti u bolesnika s OA-om. Međutim, CCR7 je obilježje makrofaga M1 sinovijske tekućine u bolesnika s RA-om, i usko je povezan s aktivnošću bolesti [398]. Izraženije vezanje CCL19 za CCR7 pogoršava sustavne bolesti poput Sjogrenove bolesti, sistemskog eritemskog lupusa, polimiozitisa, radiološkog spondiloartritisa (psorijaze), multiple skleroze i astme [397,399]. Nadalje, 7-KC je smanjio izražaj M2 kemokina CCL17 u prilog proupalnog usmjeravanja CD68+ makrofaga [352,400], kao i izražaj arginaze-1 jednakom učinkovitosti kao LPS. LPS je statistički značajno povećao izražaj M1 biljega iNOS, što nije postignuto po stimulaciji sa 7-KC-om. Međutim, smanjenje udjela arginaza-1+CD68+ makrofaga je omogućilo prevlast iNOS+CD68+ makrofaga u suspenziji nakon 18 sati stimulacije sa 7-KC-om, jednako kao i po stimulaciji s LPS-om. Stoga zaključujemo da je 7-

KC ligand za TLR4 i posrednik proupalnog odgovora CD68+ makrofaga sinovijske membrane. U prilog tome govori izdašan izražaj NF- κ B u citoplazmi i jezgri CD68+ makrofaga u nakupinama leukocita u sinovijskoj membrani *ex vivo*, koji ukazuje na aktivaciju makrofaga, proupalno lučenje monokina i izražaj citotoksičnih posrednika po stimulaciji TLR4 [401,402]. Zaista, mali broj CD68+ makrofaga svježe izdvojenih iz sinovijske membrane izražava citotoksične molekule GNLY (3,3%) i perforin (2,8%) u citoplazmi, kako je dokazano protočnom citometrijom. GNLY se oslikao metodom dvostruke imunofluorescencije u CD68+ makrofagima u nakupinama leukocita u stromi sinovijskih izdanaka i moguće služi za stišavanje imunološke reakcije i retrakciju klonova regrutiranih limfocita T, kao što je predloženo za miokard nakon akutnog infarkta [296]. Zbog ograničenog broja izdvojenih mononuklearnih stanica iz sinovijske membrane nismo bili u mogućnosti istražiti citotoksičnost sinovijskih makrofaga i limfocita T, ali smo obilježili APAF-1, apoptotički medijator u parafinskim rezovima sinovijske membrane metodom imunohistologije i utvrdili točkasti pozitivitet uglavnom u jezgrama stanica nakupljenih u stromi, od kojih je u rijetkim CD68+ makrofagima prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije. U bolesnika s OA-om koljena, skupina citotoksičnih medijatora (sFas, perforin, granzim A i GNLY) je dokazana u visokim koncentracijama ELISA metodom u sinovijskoj tekućini po stimulaciji s proizvodima mononuklearnih stanica tzv. proteoglikanskim agreganskim peptidima [403]. Osim toga, upala u bolesnika s OA-om koljena bila je izraženija u tkivima koja okružuju zglobov, nego koncentracije IL-6 i citotoksičnih medijatora u cirkulirajućoj perifernoj krvi [403].

OA se danas shvaća kao lokalno proupalno zbivanje niskog stupnja s mogućim utjecajem na sustavnu imunost [297,299], pogotovo u razdobljima boli, koju posreduju citokini, koji ujedno uzrokuju progresiju bolesti [404].

Međutim, malo se zna o ulozi stanično posredovanog imunološkog odgovora i citotoksično/apoptotičnih mehanizama posredovanih perforinom i GNLY-om u patogenezi OA-a na lokalnoj i sustavnoj razini. Prisutnost citotoksičnog proteina perforina unutar citoplazmatskih zrnaca CD4+, CD8+, CD56+, CD16+ i CD25+ limfocita iz sinovijske tekućine i sinovijske membrane bolesnika s OA-om, utvrđena je protočnom citometrijom [405]. Izražaj perforina ukazuje na ulogu citotoksičnih limfocita T i stanica NK u patogenezi OA-a [405], jer perforin korelira sa stanično posredovanim citotoksičnim potencijalom limfocita T i stanica NK u različitim tkivima [406–408].

U aktiviranim izvršnim stanicama NK perforin je pohranjen u tzv. gustim zrcima kako se prikazuju elektroničkim mikroskopom, zajedno s posrednicima apoptoze kao što je granzim, Fas ligand i zreli (9 kDa) GNLY, kojemu se pripisuju citotoksična svojstva [408,409]. Dulji, 15

kDa oblik GNLY-a pohranjen je u zrnima, koja se nalaze izravno ispod stanične membrane i može se preraditi u kraći, citotoksični oblik GNLY-a od 9 kDa [409]. GNLY od 15 kDa pokazuje pretežno regulatorna svojstva kao alarmin, zbog regrutiranja imunoloških stanica na mjesto upale [408,410]. Snažno privlači monocite, CD4⁺ i CD8⁺ memorijske limfocite T i stanice NK i zrele dendritičke stanice [411] te potiče diferencijaciju monocita u dendritičke stanice [409]. Obje vrste zrnaca koje sadrže GNLY oslobađaju se iz izvršnih stanica na zahtjev, u skladu s poticajima [408]. Međutim, oblik od 9 kDa se oslobađa nakon vezanja aktivacijskih i inhibicijskih receptora na stanicama NK s ligandima na ciljnim stanicama, ovisno o njihovom trenutnom izražaju [409]. Duži 15 kDa oblik GNLY-a oslobađa se uglavnom iz stanica NK pod djelovanjem citokina npr. IL-15 [409]. GNLY koristi više mehanizama za ulazak i ubijanje ciljnih stanica. Zbog svoje građe i polarnosti (kationska molekula) iz obitelji bjelančevina sličnih saponinu lako se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj stanične membrane [412]. U stanicama, GNLY od 9 kDa ubija bakterije učinkovito unutar nekoliko minuta [411,413], ali ostavlja eukariotsku stanicu netaknutom [412]. Vjeruje se da je citotoksična aktivnost GNLY-a u eukariotskoj stanici rezultat vezanja GNLY-a za nabijenu membranu mitohondrija [414] nakon što uđe u citoplazmu kroz perforinsku poru [415,416]. Oštećenje mitohondrija uzrokuje brzo otpuštanje APAF-1 i mitohondrijskog citokroma C, koji onda uzrokuju cijepanje DNA na način ovisan i neovisan o kaspazama [414,417,418]. Sadašnje spoznaje ukazuju da GNLY može uzrokovati staničnu smrt neposrednim ulaskom u jezgru stanica [419]. Spori mehanizam djelovanja GNLY-a izgleda obuhvaća stvaranje ceramida u membrani ciljne stanice, moguće i bez posredovanja perforina [418].

Prema našim saznanjima, ne postoje podaci o izražaju i citotoksičnosti/apoptotičnim mehanizmima posredovanim GNLY-om u perifernoj krvi pacijenata s OA, s obzirom na blago proupalno okruženje [420–422]. Stoga smo mi analizirali izražaj GNLY-a, IFN- γ i IL-4 u limfocitima periferne krvi, i citotoksičnost stanica NK posredovanu GNLY-om prema ciljnim stanicama K-562 linije i određivali GNLY u serumu bolesnika s OA-om. Dokazali smo da je učestalost limfocita periferne krvi kod bolesnika s ranim OA-om koljena statistički značajno veća u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu uz pomoć protočne citometrije i protu-GNLY protutijela RC8 klona, čije je svojstvo da se specifično veže za epitop oba oblika GNLY-a (9 i 15 kDa) [423]. Zbog visokog postotka GNLY-a (~30%) u limfocitima periferne krvi bolesnika s OA-om i široke raspršenosti rezultata u našem pilot istraživanju [424], OA skupina i kontrole u ovom istraživanju definirane su preciznije prema kriterijima isključenja.

Povećan izražaj GNLY-a u NK, T i NKT stanicama u bolesnika s OA-om u skladu je s blago izraženim sustavnim, proupalnim imunološkim odgovorom niskog stupnja u OA-u [422,425] i

spoznajom da GNLY povećava upalu [426,427]. U bolesnika s OA-om prevladava proupalni imunološki odgovor s lučenjem IFN- γ nad protuupalnim imunološkim odgovorom posredovanim s IL-4 iz limfocita T i stanica NK periferne krvi u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj je prevladavalo stvaranje IL-4 nad IFN- γ u stanicama NK i limfocitima NKT [297]. Sukladno tome, Th1 citotoksični limfociti T koje proizvode IFN- γ pronađeni su u sinovijskoj tekućini i sinovijskoj membrani bolesnika s OA-om [428]. Izražaj IFN- γ na razini mRNA i bjelančevina ovisi o JAK/STAT signalnom putu u limfocitima T i stanicama NK, koji je poznat kao put za poticanje stanicama posredovane imunosti [421,429]. To je u skladu s porastom srednjeg intenziteta fluorescencije za GNLY u limfocitima periferne krvi bolesnika s OA-om u usporedbi sa zanemarivim fluorescentnim signalima za GNLY u kontrolnoj skupini. Poznat je blagi izražaj GNLY-a u limfocitima T i konstitucijski izražaj GNLY-a u stanicama NK, koji se u obje vrste stanica povećava nakon aktivacije s antigenom ili ligandima za citotoksične receptore [430]. Metodom imunocitokemije smo slikovito prikazali GNLY u većem broju limfocita periferne krvi bolesnika s OA-om u odnosu na manji broj i slabiju jačinu izražavanja GNLY-a u kontrolnoj skupini [297]. Također smo prikazali veće uvođenje NK ciljnih stanica K-562 u ranu apoptozu na način ovisan o GNLY-u za razliku od kontrolne skupine *in vitro*. Naime, citotoksičnost posredovana GNLY-om se gotovo potpuno uklonila djelovanjem protu-GNLY protutijela RC8 klonu. Zbog oskudnog izražaja GNLY-a u stanicama NK kontrolne skupine, nije se mogla niti ostvariti značajna citotoksičnost posredovana GNLY-om.

Citotoksičnost GNLY-a protiv K-562 ostvarivala se samo uz prisutnost perforina, jer su perforinske pore omogućavale ulazak GNLY-a u stanice, iako sam perforin ne potiče staničnu smrt apoptozom [430,431]. Apoptoza posredovana GNLY-om je potaknuta povećanjem koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} oštećenjem stanične membrane, stvaranjem ROS-a u mitohondrijima, oslobađanjem APAF-1, citokroma C i aktivacijom kaspaze 3, što remeti normalnu fiziologiju ciljnih stanica [427,430]. Ciljne stanice u našim pokusima su mogle umrijeti apoptozom, ali i nekrozom 4 sata nakon brzog ulaska GNLY-a kroz perforinske pore [427,431]. Međutim, način analize stanične smrti protočnom citometrijom nije uključivao nekrotične stanice, nego samo ograđene Annexin pozitivne i PI negativne stanice, koji se koriste za otkrivanje stanica koje su uvedene u ranu apoptozu na kraju 18 satnog testa citotoksičnosti [298].

Ubijanje ciljnih K-562 stanica humane eritroleukemije, koje ne izražavaju MHC molekule razreda I, predstavlja model za *in vitro* analizu citotoksičnosti posredovanu stanicama NK, ali i citotoksičnost prema vlastitim oštećenim stanicama, koje prilikom oštećivanja uklone MHC molekule sa svoje površine [432]. To implicira da aktivirane stanice NK u cirkulaciji mogu

ošteti endotelne stanice tijekom aterogeneze, neovisno ili u suradnji s klasičnim metaboličkim čimbenicima rizika i podržavati endotelnu disfunkciju u pozadini kardiovaskularne bolesti [404]. Prethodno je pokazano da >80% bolesnika s OA-om boluje od arterijske hipertenzije i >30% su dijabetičari [31], što se odražava i u skupini naših bolesnica s OA-om u ovom istraživanju. To označava mogućnost metabolički potaknute sustavne upale [433,434]. Sve bolesnice s OA-om uključene u ovo istraživanje, kao i kontrolna skupina, su imale hiperkolesterolemiju, koja je sastavnica metaboličkog sindroma. Zna se da unos zasićenih masti može utjecati na napredak OA-a koljena jer one postaju supstrat za neenzimatsku oksidaciju, neovisno o tjelesnoj masi, i mogu metabolički potaknuti sustavnu upalu niskog stupnja [249,433]. U našem istraživanju bolesnice nisu bile pretile nego su imale prekomjernu tjelesnu masu. Međutim, doprinos biokemijskih i metaboličkih čimbenika, zajedno s čimbenicima koji se ne mogu mijenjati (spol, dobi i nasljeđe) na aktivnost stanica NK ne mogu se potpuno isključiti [435]. Osim toga, OA koljena različito zahvaća muškarce i žene, jer žene pokazuju povećanu sklonost za OA, razvoj težeg oblika bolesti i invaliditet [436]. Kako bi se izbjegle razlike temeljene na spolu i mogućoj ulozi estrogena na funkciju limfocita i izražaj GNLY-a [437], u ovo istraživanje regrutirali smo žene u postmenopauzi kako u skupinu s OA-om, tako i u kontrolnu skupinu.

Za vizualizaciju GNLY-a i LAMP-1, biljega sekretornih organela povezanih s lizosomima [438], koristili smo konfokalnu mikroskopiju. Konfokalna mikroskopija potvrdila je učestaliji izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi iz skupine bolesnica s OA-om u usporedbi s kontrolnom skupinom, iako je kolokalizacija GNLY-a i LAMP-1 molekule iznosila oko 40% u obje skupine. To je dokazalo nakupljanje citotoksičnog oblika (9 kDa) GNLY-a u gustim, zrcima za egzocitozu, dok 15 kDa GNLY nije povezan s LAMP-1+ organelima i ne preklapa se po staničnom smještaju s citotoksičnim oblikom (9 kDa) GNLY-a [423]. Oblik GNLY-a od 15 kDa oslobađa se aktiviranjem stanice na način ovisan o citokinima i protein kinazi C [423]. On predstavlja topljivi serumski GNLY s regulacijskim funkcijama [423], koji je bio zanemariv u bolesnika s ranim OA-om i u kontrolnoj skupini. Na temelju ovdje prikazanih rezultata zaključujemo da je u žena s OA-om koljena, izražaj GNLY-a u podskupinama limfocita periferne krvi i GNLY-om posredovana apoptoza K-562 stanica veća nego u kontrolnoj skupini. Ipak, optimalno bi bilo proširiti istraživanje citotoksičnosti s većim brojem bolesnika i različitim vrstama OA u oba spola, kako bi se došlo do potpunijeg zaključka.

6. ZAKLJUČCI

1. **Srednji broj CD68+ makrofaga u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena u času aloartroplastike koljena iznosio je 35 ± 21 (srednja vrijednost $\pm$ SD) u polju srednjeg povećanja svjetlosnog mikroskopa ($\times 400$).**
2. **CD68+ stanice sinovijske membrane zrelog OA-a koljena su neznatno oštećene i vjerojatno potaknute (stimulirane) lokalnim tvarima.**
 - a) CD68+ makrofagi u svježe izdvojenoj suspenziji su izražavali unutarstanični inducibilni oblik Hsp70 manje od 5%, a srednji intenzitet fluorescencije za Hsp70 po pojedinoj stanici također je bio nizak i iznosio od 25-30 u nalazima protočne citometrije.
 - b) Rijetke Hsp70+ stanice utvrdili smo u nakupinama leukocita u stromi sinovijske membrane metodom imunohistokemije.
 - c) U nakupinama leukocita u stromi sinovijske membrane izražaj apoptotičke molekule APAF-1 (citoplazmatski i nuklearni) utvrđen je u manjem broju stanica metodom imunohistologije, dok je obilježavanje transkripcijskog biljega koji nadzire razvoj različitih podražaja NF- κ B bilo znatno učestaliji.
3. **CD68+ makrofagi sinovijske membrane zrelog OA-a koljena mogu učinkovito prepoznavati, internalizirati i provoditi signal u stanicu po vezanju liganada.**
 - a) U rezovima sinovijske membrane CD68+ stanice su izražavale membranske receptore za prepoznavanje imunoloških obrazaca CD91, TLR4 i molekulu CD14 za proslijeđivanje signala u stanicu po vezanju liganada za TLR4, kako je prikazano metodom dvostruke imunofluorescencije.
 - b) Protočna citometrija je dokazala da CD68+ makrofagi iz suspenzije mononuklearnih stanica izražavaju receptore za prepoznavanje imunoloških obrazaca CD91, TLR4 i CD206 u oko 50%, od čega je median za CD91 i TLR4 bio statistički značajno viši u odnosu na izražaj CD209 (median 12,9 %).
 - c) U suspenziji mononuklearnih stanica je bilo 81,82% CD68+ makrofaga koji su izražavali CD14.
 - d) U uvjetima *in vitro* Hsp70 se u koncentraciji 2 μ g/mL veže za TLR4 CD68+ makrofaga iz suspenzije mononuklearnih stanica.
 - e) Farmakološka koncentracija 7-KC (10 μ g/mL) veže se za TLR4 na površini CD68+ makrofaga iz suspenzije mononuklearnih stanica.
 - f) CD68+ makrofagi iz suspenzije mononuklearnih stanica učinkovito internaliziraju ligand za CD206, FITC-dekstran u uvjetima *in vitro*.

- g) LXR se obilježavao u jezgrama stanica, uključujući jezgre CD68+ makrofaga, u tkivnim rezovima sinovijske membrane metodom dvostruke imunofluorescencije.
- h) 4-hidroksinonenal, proizvod oksidacije višestruko nezasićenih omega-6 masnih kiselina, bio je homogeno izražen u citoplazmi CD68+ makrofaga raspoređenih po površini sinovijskih izdanaka i u nakupinama leukocita.
- i) CD68+NF- κ B+ stanice utvrđene su u nakupinama leukocita u stromi tkivnih rezova sinovijske membrane metodom dvostruke imunofluorescencije.

4. CD68+ stanice sinovijske membrane zrelog OA-a koljena imaju antigen predočna svojstva dok je njihova sposobnost fagocitoze opsoniziranih bakterija i citotoksičnosti vjerojatno manja.

- a) U svježe izdvojenoj suspenziji izražaj HLA-DR na CD68+ makrofagima je iznosio 86,2% i bio statistički značajno veći u odnosu na izražaj CD80 (31,8%) i CD86 (62,5%) potrebnih za prosljeđivanje prvog i drugog signala za aktivaciju limfocita T.
- b) Membranski izražaj CD16 receptora (median 8,1%) te unutarstanični izražaj citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina u svega nekoliko postotaka utvrđen je protočnom citometrijom u CD68+ makrofaga iz svježe izdvojene suspenzije;
- c) Rijetke granulizin+CD68+ stanice su utvrđene dvostrukom imunofluorescencijom u nakupinama leukocita u stromi tkivnih rezova sinovijske membrane.

5. CD68+ makrofagi iz sinovijske membrane zrelog OA-a koljena izražavaju proupalne kemokine i citokine.

- a) Unutarstanični izražaj M1 kemokina CCL2 (median 71%) je bio statistički značajno veći od M1 kemokina CCL3 (median 22,9%) u CD68+ makrofagima iz svježe suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane prema nalazu protočne citometrije, što je oslikano metodom imunohistokemije u tkivnim rezovima sinovijske membrane kao brojne CCL2+ stanice čija raspodjela prati raspodjelu CD68+ makrofaga u odnosu na neznatan izražaj CCL3+ stanica.
- b) Unutarstanični izražaj M2 kemokina CCL22 iznosio je 41,3% i bio je statistički značajno viši u odnosu na neznatni izražaj M2 kemokina CCL17 u CD68+ makrofagima iz svježe suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane, kako je dokazano protočnom citometrijom.
- c) Unutarstanični izražaj proupalnog citokina IL-15 bio je statistički značajno veći (median 18,2%) u odnosu na neznatan izražaj proupalnih citokina IFN- γ i TNF- α u CD68+ makrofagima iz svježe suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane prema rezultatima protočne citometrije.

- 6. U sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena nalazili smo podjednak broj M1 polariziranih (iNOS+) i M2 polariziranih (arginaza -1+) makrofaga, međutim njihova tkivna raspodjela nije bila istovjetna.**
- a) iNOS+ stanice su bile učestalije u nakupinama leukocita, dok su arginaza-1+ stanice bile zastupljenije na površini sinovijskih izdanaka metodom imunohistokemije.
 - b) U nakupinama leukocita dokazali smo više CD68+ makrofaga koji izražavaju M1 biljege iNOS+, IL-15+ i CCL2+, dok su M2 polarizacijski biljezi arginaza-1 i CCL22 gotovo izostali u tkivnim rezovima sinovijske membrane obilježenih dvostrukom imunofluorescencijom.
 - c) CD68+ makrofagi prošireni na površini sinovijskih izdanaka intenzivno su izražavali M2 biljeg arginazu-1, a rijetko IL-15 i okruživali su nakupine leukocita u stromi, što moguće ukazuje da pod poticajem antigena iz sinovijske tekućine mijenjaju imunološku polarizaciju iz M2 u M1 i okružuju se limfocitima zbog antigenske prezentacije.
 - d) U svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica sinovijske membrane CD68+ makrofagi izražavali su u podjednakom udjelu M1 biljeg iNOS i M2 biljeg arginazu-1 u citoplazmi prema nalazu protočne citometrije.
- 7. U stromi sinovijske membrane CD68+ makrofagi bili su neposredno okruženi brojnim limfocitima CD3+ fenotipa i limfocitima CD56+ fenotipa, što daje naslutiti njihovo funkcijsko međudjelovanje.**
- 8. CD68+ makrofagi sinovijske membrane zadržavaju svojstvo plastičnosti .**
- a) CD68+ stanice iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane sposobni su pokrenuti program sazrijevanja M1 pod utjecajem LPS-a (10 ng/ml).
 - b) LPS smanjuje internalizaciju FITC-dekstrana te izražaj kemokinskih receptora CCR5 i D6, receptora za prepoznavanje imunoloških obrazaca CD91 i CD206, citoplazmatski izražaj IFN- γ , IL-17, CCL17, dok povećava izražaj CD86, CCR7, CCL2 i CCL3 u usporedbi sa stanicama kultiviranim samo u RPMI mediju za kulturu tijekom 18 sati. Izražaj CD80, HLA-DR, IL-1Rtip II, CCL22 i IL-15 nisu se značajno mijenjali pod utjecajem LPS-a.
 - c) LPS je smanjio učestalost stanica arginaze-1+/CD68+ i povećao iNOS+/CD68+ u suspenziji, čime se povećao omjer iNOS+/arginaze-1+ u makrofagima nakon 18 sati kultiviranja *in vitro*.
 - d) Farmakološka koncentracija 7-KC (10 μ g/mL) podržava program sazrijevanja M1, usprkos smrtnosti od oko 40 %, jer je povećao izražaj CD86, CCR7, CCL2 i CCL3, a smanjio izražaj kemokinskih receptora CCR5 i D6, receptora za prepoznavanje

imunoloških obrazaca CD91 i CD206, citoplazmatski izražaj IFN- γ , IL-17 i CCL17 u usporedbi sa stanicama kultiviranim samo u RPMI mediju za kulturu tijekom 18 sati, dok su izražaji CD80, HLA-DR, IL-1R tip II, CCL22 i IL-15 ostali nepromijenjeni, kao i stimulacija s LPS-om.

- e) 7-KC je smanjio učestalost stanica arginaze-1+/CD68+ u suspenziji i nije promijenio iNOS+ u stanicama CD68+, čime se povećao omjer iNOS+/arginaze-1+ u podskupu CD68+.

9. Izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi žena nakon menopauze s ranim OA-om koljena je veći u odnosu na kontrolnu skupinu bez OA-a koljena.

- a) Postotak ukupnih GNLY+ limfocita periferne krvi bio je veći u bolesnica s ranim OA-om koljena nego u kontrolnoj skupini temeljem nalaza protočne citometrije i oslikan je metodom imunocitokemije.
- b) U bolesnica s ranim OA povećanja dokazali smo veći udio GNLY+ stanica u podvrstama stanica NK, limfocita T i stanicama NKT metodom protočne citometrije;
- c) Smještaj GNLY-a unutar LAMP+ citoplazmatskih lizosoma limfocita periferne krvi bila je ~40% u skupini bolesnica s ranim OA-om koljena i u kontroli prema nalazu konfokalne mikroskopije, međutim intenzitet obilježavanja GNLY-a u limfocitima periferne krvi bio je veći u bolesnica s OA-om nego u kontrolama prema nalazu protočne citometrije.
- d) Izražaj GNLY-a je podupiralo povećano unutarstanično izražavanje proupalnog IFN- γ u odnosu na IL-4 u stanicama NK i limfocitima T u bolesnica s OA-om koljena.

10. Koncentracija GNLY-a (citotoksičkog i regulacijskog oblika) u serumu bila je <0,3 ng/ml u bolesnica s ranim OA-om koljena i u kontroli.

11. Apoptoza ostvarena stanicama NK uz posredovanje GNLY-a predstavlja imunopatogenetski mehanizam koji djeluje na sustavnoj razini u bolesnika s ranim OA-om koljena.

- a) Protu-GNLY Pt RC8 klona nije značajno mijenjalo ranu apoptozu, dok je RC8 protu-GNLY mPt u kombinaciji s anti-perforinskim mPt značajno smanjilo ranu apoptozu NK ciljnih K-562 stanica posredovanu neposrednim dodirrom sa stanicama NK u bolesnica s ranim OA-om koljena, dok nije pokazao značajan učinak u kontrolama.

Zaključno, CD68+ makrofagi sinovijske membrane zrelog OA koljena su heterogena skupina stanica M1 i M2, a 7-KC, kao ligand za TLR4 promiče M1 polarizaciju *in vitro* i podudara se s uključivanjem GNLY-a i prevlasti upale u patogenezi OA.

7. LITERATURA

1. Yao Q, Wu X, Tao C i sur. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Feb 3;8(1):56.
2. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. Vol. 393, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 1745–59.
3. He Y, Li Z, Alexander PG i sur. Pathogenesis of osteoarthritis: Risk factors, regulatory pathways in chondrocytes, and experimental models. Vol. 9, *Biology*. MDPI AG; 2020. p. 1–32.
4. Perić P, Babić-Naglić D, Curković B, Perić S, Tiljak MK. Clinical and radiographic characteristics of patients with osteoarthritis of knees. *Reumatizam*. 2006;53(1):11–7.
5. van den Bosch MHJ, van Lent Plem, van der Kraan PM. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. Vol. 28, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 532–43.
6. Hashimoto K, Akagi M. The role of oxidation of low-density lipids in pathogenesis of osteoarthritis: A narrative review. Vol. 48, *Journal of International Medical Research*. SAGE Publications Ltd; 2020.
7. Hsu H, Siwiec RM. *Knee Osteoarthritis*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
8. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM i sur. Osteoarthritis. Vol. 2, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2016.
9. Peoples BM, Harrison KD, Renfrow G i sur. Osteoarthritis and Neurological Disorder Diagnoses in Adults: A Meta-Analysis Examining Associations With Parkinson's Disease, Multiple Sclerosis, and Alzheimer's Disease. *Cureus*. 2024 Oct 14;
10. Shumnalieva R, Kotov G, Monov S. Obesity-Related Knee Osteoarthritis—Current Concepts. Vol. 13, *Life*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
11. Sampath SJP, Venkatesan V, Ghosh S, Kotikalapudi N. Obesity, Metabolic Syndrome, and Osteoarthritis—An Updated Review. *Curr Obes Rep*. 2023 Aug 14;12(3):308–31.
12. Wei G, Lu K, Umar M i sur. Risk of metabolic abnormalities in osteoarthritis: a new perspective to understand its pathological mechanisms. Vol. 11, *Bone Research*. Springer Nature; 2023.
13. Chen X, Liu J, Wang G, Sun Y, Ding X, Zhang X. Regulating lipid metabolism in osteoarthritis: a complex area with important future therapeutic potential. *Ann Med*. 2024;56(1).
14. Courties A, Kouki I, Soliman N, Mathieu S, Sellam J. Osteoarthritis year in review 2024: Epidemiology and therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2024 Nov 1;
15. Steinmetz JD, Culbreth GT, Haile LM i sur. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol*. 2023 Sep 1;5(9):e508–22.

16. Koroljević ZD, Jordan K, Ivković J, Bender DV, Perić P. Curcuma as an anti-inflammatory component in treating osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2023 Apr 1;43(4):589–616.
17. Peat G. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis.* 2001 Feb 1;60(2):91–7.
18. Savvari P, Skiadas I, Barmpouni M i sur. Moderate to Severe Osteoarthritis: What is the Economic Burden for Patients and the Health Care System? Insights from the “PONOS” Study. *Cartilage.* 2024 Sep 1;15(3):268–77.
19. McAlindon TE, Snow S, Cooper C, Dieppe PA. Radiographic patterns of osteoarthritis of the knee joint in the community: the importance of the patellofemoral joint. *Ann Rheum Dis.* 1992 Jul 1;51(7):844–9.
20. O’reilly SC, Muir KR, Doherty M, O’reilly SC, Muir KR. Screening for pain in knee osteoarthritis: which question? Vol. 55, *Ann Rheum Dis.* 1996.
21. Grazio S. Osteoarthritis--epidemiology, economics and quality of life. *Reumatizam.* 2005;52(2):21–9.
22. World Health Organization <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>. Osteoarthritis. World Health Organization. 2023.
23. Moseley JB, O’Malley K, Petersen NJ i sur. A Controlled Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine.* 2002 Jul 11;347(2):81–8.
24. Teichtahl AJ, Wluka AE, Wang Y i sur. Occupational activity is associated with knee cartilage morphology in females. *Maturitas.* 2010;66(1):72–6.
25. Dekker J, Van Dijk GM, Veenhof C. Risk factors for functional decline in osteoarthritis of the hip or knee. Vol. 21, *Current Opinion in Rheumatology.* 2009. p. 520–4.
26. Rubin BR. Management of osteoarthritic knee pain. *J Am Osteopath Assoc.* 2005 Sep;105(9 Suppl 4):S23-8.
27. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA i sur. Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Ann Intern Med.* 2000 Oct 17;133(8):635–46.
28. Rusac Kukić S, Rusac S, Buljevac M. Samoprocjena zdravstvenog statusa i nekih aspekata kvalitete života starijih osoba s osteoartritisom koljena. *Journal of applied health sciences.* 2020 Mar 4;6(1):63–76.
29. Duncan R, Peat G, Thomas E, Wood L, Hay E, Croft P. How do pain and function vary with compartmental distribution and severity of radiographic knee osteoarthritis? *Rheumatology.* 2008;47(11):1704–7.
30. Murphy SL, Lyden AK, Phillips K, Clauw DJ, Williams DA. Association between pain, radiographic severity, and centrally-mediated symptoms in women with knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011 Nov;63(11):1543–9.

31. Zakaria ZF, Bakar AA, Hasmoni HM, Rani FA, Kadir SA. Health-related quality of life in patients with knee osteoarthritis attending two primary care clinics in Malaysia: A cross-sectional study. *Asia Pac Fam Med*. 2009;8(1).
32. Hall AJ, Stubbs B, Mamas MA, Myint PK, Smith TO. Association between osteoarthritis and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. Vol. 23, *European Journal of Preventive Cardiology*. SAGE Publications Inc.; 2016. p. 938–46.
33. Krizmanić M, Kolestarić V, Janig H. Cross-cultural validation of a psychological model of “Quality of Life” concept. *Review of psychology*. 1994;Vol. 1 No. 1:29–36.
34. Geng R, Li J, Yu C i sur. Knee osteoarthritis: Current status and research progress in treatment (Review). *Exp Ther Med*. 2023 Aug 25;26(4).
35. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022 Feb 1;30(2):184–95.
36. Alexander PG, McCarron JA, Levine MJ i sur. An In Vivo Lapine Model for Impact-Induced Injury and Osteoarthritic Degeneration of Articular Cartilage. *Cartilage*. 2012 Oct;3(4):323–33.
37. Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? Vol. 24, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. 2010. p. 15–26.
38. Long H, Liu Q, Yin H i sur. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis & Rheumatology*. 2022 Jul 2;74(7):1172–83.
39. Ferre IM, Roof MA, Anoushiravani AA, Wasterlain AS, Lajam CM. Understanding the observed sex discrepancy in the prevalence of osteoarthritis. *JBJS Rev*. 2019 Sep 1;7(9).
40. Hame SL, Alexander RA. Knee osteoarthritis in women. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2013 Jun;6(2):182–7.
41. Shultz SJ, Sander TC, Kirk SE, Perrin DH. Sex differences in knee joint laxity change across the female menstrual cycle. Vol. 45, *J Sports Med Phys Fitness*. 2005.
42. Dennison EM. Osteoarthritis: The importance of hormonal status in midlife women. Vol. 165, *Maturitas*. Elsevier Ireland Ltd; 2022. p. 8–11.
43. Peshkova M, Lychagin A, Lipina M i sur. Gender-Related Aspects in Osteoarthritis Development and Progression: A Review. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
44. Aubourg G, Rice SJ, Bruce-Wootton P, Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. Vol. 30, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2022. p. 636–49.
45. Sandell LJ. Etiology of osteoarthritis: Genetics and synovial joint development. Vol. 8, *Nature Reviews Rheumatology*. 2012. p. 77–89.
46. Valdes AM, Spector TD. The genetic predisposition to osteoarthritis. *IBMS Bonekey*. 2009 May;6(5):181–9.

47. Reyes C, Garcia-Gil M, Elorza JM i sur. Socio-economic status and the risk of developing hand, hip or knee osteoarthritis: A region-wide ecological study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Aug 1;23(8):1323–9.
48. Callahan LF, Cleveland RJ, Shreffler J i sur. Associations of educational attainment, occupation and community poverty with knee osteoarthritis in the Johnston County (North Carolina) osteoarthritis project. *Arthritis Res Ther*. 2011 Oct 19;13(5):R169.
49. Callahan LF, Cleveland RJ, Allen KD, Golightly Y. Racial/Ethnic, Socioeconomic, and Geographic Disparities in the Epidemiology of Knee and Hip Osteoarthritis. Vol. 47, *Rheumatic Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2021. p. 1–20.
50. International Diabetes Federation (IDF). The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome [Internet]. Brussels, Belgium; 2006 [cited 2024 Dec 9]. Available from: <https://idf.org/media/uploads/2023/05/attachments-30.pdf>
51. Swarup S, Ahmed I, Grigorova Y, Zeltser R. Metabolic Syndrome. *StatPearls*. 2025.
52. Wei G, Lu K, Umar M i sur. Risk of metabolic abnormalities in osteoarthritis: a new perspective to understand its pathological mechanisms. Vol. 11, *Bone Research*. Springer Nature; 2023.
53. Puenpatom RA, Victor TW. Increased Prevalence of Metabolic Syndrome in Individuals with Osteoarthritis: An Analysis of NHANES III Data. *Postgrad Med*. 2009 Nov 1;121(6):9–20.
54. Askari A, Ehrampoush E, Homayounfar R i sur. Relationship between metabolic syndrome and osteoarthritis: The Fasa Osteoarthritis Study. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2017 Dec 1;11:S827–32.
55. Šalamon L, Morović-Vergles J, Marasović-Krstulović D i sur. Differences in the prevalence and characteristics of metabolic syndrome in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a multicentric study. *Rheumatol Int*. 2015 Dec 1;35(12):2047–57.
56. Focht BC, Rejeski WJ, Hackshaw K i sur. The Collaborative Lifestyle Intervention Program in Knee Osteoarthritis Patients (CLIP-OA) trial: Design and methods. *Contemp Clin Trials*. 2022 Apr 1;115.
57. Messier SP, Beavers DP, Queen K i sur. Effect of Diet and Exercise on Knee Pain in Patients With Osteoarthritis and Overweight or Obesity. *JAMA*. 2022 Dec 13;328(22):2242.
58. Christensen R, Astrup A, Bliddal H. Weight loss: The treatment of choice for knee osteoarthritis? A randomized trial. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Jan;13(1):20–7.
59. Grazio S, Balen D. Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis. *Lijec Vjesn*. 2009;131(1–2):22–6.
60. Lee R, Kean WF. Obesity and knee osteoarthritis. *Inflammopharmacology*. 2012 Apr 12;20(2):53–8.

61. Perruccio A V., Young JJ, Wilfong JM, Denise Power J, Canizares M, Badley EM. Osteoarthritis year in review 2023: Epidemiology & therapy. Vol. 32, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2024. p. 159–65.
62. Francisco V, Pérez T, Pino J i sur. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. Vol. 36, Journal of Orthopaedic Research. John Wiley and Sons Inc; 2018. p. 594–604.
63. Dong Y, Yan Y, Zhou J, Zhou Q, Wei H. Evidence on risk factors for knee osteoarthritis in middle-older aged: a systematic review and meta analysis. Vol. 18, Journal of Orthopaedic Surgery and Research. BioMed Central Ltd; 2023.
64. Joshua Pragasam Sampath S, Venkatesan V, Ghosh S, Kotikalapudi N. Obesity, Metabolic Syndrome, and Osteoarthritis-An Updated Review. Curr Obes Rep [Internet]. 1234;12:308–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13679-023-00520-5>
65. Lee G, Yang J, Kim S i sur. Enhancement of Intracellular Cholesterol Efflux in Chondrocytes Leading to Alleviation of Osteoarthritis Progression. Arthritis & Rheumatology. 2025 Feb 29;77(2):151–62.
66. Farnaghi S, Prasadani I, Cai G i sur. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidants and statins on cholesterolinduced osteoarthritis. The FASEB Journal. 2017 Jan 13;31(1):356–67.
67. Sengprasert P, Kamenkit O, Tanavalee A, Reantragoon R. The Immunological Facets of Chondrocytes in Osteoarthritis: A Narrative Review. Vol. 51, Journal of Rheumatology. Journal of Rheumatology; 2024. p. 13–24.
68. Su Z, Zong Z, Deng J i sur. Lipid Metabolism in Cartilage Development, Degeneration, and Regeneration. Nutrients. 2022 Sep 25;14(19):3984.
69. Pirahanchi Y, Sinawe H, Dimri M. Biochemistry, LDL Cholesterol. 2024.
70. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2000 Nov;1488(3):189–210.
71. Catar R, Chen L, Zhao H i sur. Native and Oxidized Low-Density Lipoproteins Increase the Expression of the LDL Receptor and the LOX-1 Receptor, Respectively, in Arterial Endothelial Cells. Cells. 2022 Jan 1;11(2).
72. Attie AD. Lipoprotein/Cholesterol Metabolism. Encyclopedia of Physical Science and Technology. 2003;643–60.
73. Poznyak A V., Nikiforov NG, Markin AM i sur. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. Vol. 11, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2021.
74. Wculek SK, Dunphy G, Heras-Murillo I, Mastrangelo A, Sancho D. Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. Vol. 19, Cellular and Molecular Immunology. Springer Nature; 2022. p. 384–408.

75. Warmink K, Vinod P, Korthagen NM, Weinans H, Rios JL. Macrophage-Driven Inflammation in Metabolic Osteoarthritis: Implications for Biomarker and Therapy Development. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
76. De Munter W, Van der Kraan PM, Van den Berg WB, Van Lent Plem. High systemic levels of low-density lipoprotein cholesterol: Fuel to the flames in inflammatory osteoarthritis? Vol. 55, Rheumatology (United Kingdom). Oxford University Press; 2016. p. 16–24.
77. de Munter W, van den Bosch MH, Slöetjes AW i sur. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 May 1;24(5):844–55.
78. de Munter W, Blom AB, Helsen MM, i sur. Cholesterol accumulation caused by low density lipoprotein receptor deficiency or a cholesterol-rich diet results in ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013 Nov 4;15(6).
79. Seo YS, Cho IA, Kim TH i sur. Oxysterol 25-hydroxycholesterol as a metabolic pathophysiological factors of osteoarthritis induces apoptosis in primary rat chondrocytes. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020 May 1;24(3):249–57.
80. Li X, Sun K. Regulation of lipolysis in adipose tissue and clinical significance. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2018. p. 199–210.
81. Courties A, Berenbaum F, Sellam J. The Phenotypic Approach to Osteoarthritis: A Look at Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis. Vol. 86, Joint Bone Spine. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 725–30.
82. Shawl M, Geetha T, Burnett D, Babu JR. Omega-3 Supplementation and Its Effects on Osteoarthritis. Vol. 16, *Nutrients*. 2024.
83. Sibille KT, King C, Garrett TJ i sur. Omega-6:Omega-3 PUFA Ratio, Pain, Functioning, and Distress in Adults With Knee Pain. *Clin J Pain*. 2018 Feb;34(2):182–9.
84. Vincent TL. OA synovial fluid: biological insights into a whole-joint disease. Vol. 30, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2022. p. 765–6.
85. James MJ, van Reyk D, Rye KA i sur. Low density lipoprotein of synovial fluid in inflammatory joint disease is mildly oxidized. *Lipids*. 1998 Nov;33(11):1115–21.
86. Nishimura S, Akagi M, Yoshida K i sur. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-κB. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jul;12(7):568–76.
87. Zhang K, Ji Y, Dai H i sur. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein A1 in Synovial Fluid: Potential Predictors of Disease Severity of Primary Knee Osteoarthritis. *Cartilage*. 2021 Dec 1;13(1):1465S-1473S.

88. Wu X, Fan X, Crawford R, Xiao Y, Prasad I. The Metabolic Landscape in Osteoarthritis. Vol. 13, Aging and Disease. International Society on Aging and Disease; 2022. p. 1166–82.
89. Sellam J, Berenbaum F. Is osteoarthritis a metabolic disease? Vol. 80, Joint Bone Spine. Elsevier Masson SAS; 2013. p. 568–73.
90. Li Q, Wen Y, Wang L i sur. Hyperglycemia-induced accumulation of advanced glycosylation end products in fibroblast-like synoviocytes promotes knee osteoarthritis. *Exp Mol Med*. 2021 Nov 1;53(11):1735–47.
91. Zhang W, Randell EW, Sun G i sur. Hyperglycemia-related advanced glycation end-products is associated with the altered phosphatidylcholine metabolism in osteoarthritis patients with diabetes. *PLoS One*. 2017 Sep 1;12(9).
92. He CP, Chen C, Jiang XC i sur. The role of AGEs in pathogenesis of cartilage destruction in osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2022 May 1;11(5):292–300.
93. Ching K, Houard X, Berenbaum F, Wen C. Hypertension meets osteoarthritis — revisiting the vascular aetiology hypothesis. Vol. 17, Nature Reviews Rheumatology. Nature Research; 2021. p. 533–49.
94. Morović-Vergles J, Šalamon L, Marasović-Krstulović D i sur. Is the prevalence of arterial hypertension in rheumatoid arthritis and osteoarthritis associated with disease? *Rheumatol Int*. 2013 May;33(5):1185–92.
95. Yeater TD, Cruz CJ, Cruz-Almeida Y, Allen KD. Autonomic Nervous System Dysregulation and Osteoarthritis Pain: Mechanisms, Measurement, and Future Outlook. Vol. 24, Current Rheumatology Reports. Springer; 2022. p. 175–83.
96. Yeater TD, Griffith JL, Cruz CJ, Patterson FM, Aldrich JL, Allen KD. Hypertension contributes to exacerbated osteoarthritis pathophysiology in rats in a sex-dependent manner. *Arthritis Res Ther*. 2023 Dec 1;25(1).
97. Smith SM, Cooper-DeHoff RM. Fixed-Dose Combination Amlodipine/Celecoxib (Consensi) for Hypertension and Osteoarthritis. Vol. 132, American Journal of Medicine. Elsevier Inc.; 2019. p. 172–4.
98. Guo Z, Di J, Zhang Z i sur. Antihypertensive drug-associated adverse events in osteoarthritis: a study of a large real-world sample based on the FAERS database. *Front Pharmacol*. 2024;15:1404427.
99. Wen CY, Chen Y, Tang HL i sur. Bone loss at subchondral plate in knee osteoarthritis patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Nov;21(11):1716–23.
100. Yang ZJ, Liu Y, Liu YL i sur. Osteoarthritis and hypertension: observational and Mendelian randomization analyses. *Arthritis Res Ther*. 2024 Dec 1;26(1).
101. Felson DT, Zhang Y. Smoking and osteoarthritis: A review of the evidence and its implications. Vol. 23, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2015. p. 331–3.

102. Xiao Q, Dong S, Tan Y i sur. The causal impact of smoking behavior on osteoarthritis: a Mendelian randomization analysis. *Front Public Health*. 2025 Jan 23;13.
103. Kang K, Shin JS, Lee J i sur. Association between direct and indirect smoking and osteoarthritis prevalence in Koreans: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2016 Feb 18;6(2):e010062.
104. Johnsen MB, Pihl K, Nissen N i sur. The association between smoking and knee osteoarthritis in a cohort of Danish patients undergoing knee arthroscopy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019 Dec 1;20(1):141.
105. Szilagyi IA, Waarsing JH, Schiphof D, Van Meurs JBJ, Bierma-Zeinstra SMA. Towards sex-specific osteoarthritis risk models: Evaluation of risk factors for knee osteoarthritis in males and females. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2022 Feb 1;61(2):648–57.
106. Zhu S, Ji L, He Z i sur. Association of smoking and osteoarthritis in US (NHANES 1999–2018). *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
107. Primorac D, Molnar V, Rod E i sur. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 26;11(8):854.
108. Coaccioli S, Sarzi-Puttini P, Zis P, Rinonapoli G, Varrassi G. Osteoarthritis: New Insight on Its Pathophysiology. Vol. 11, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2022.
109. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol*. 2015 Dec 18;3(4):177–92.
110. Liu XH, Ding JY, Zhu ZH i sur. Recent advances in enzyme-related biomaterials for arthritis treatment. *Front Chem*. 2022 Aug 16;10.
111. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. Vol. 18, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2022. p. 258–75.
112. Lambert C, Zappia J, Sanchez C, Florin A, Dubuc JE, Henrotin Y. The Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) as Potential Targets to Treat Osteoarthritis: Perspectives From a Review of the Literature. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jan 18;7.
113. Yao Q, Wu X, Tao C i sur. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2023 Feb 3;8(1):56. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01330-w>
114. Shi X, Mai Y, Fang X i sur. Bone marrow lesions in osteoarthritis: From basic science to clinical implications. *Bone Rep*. 2023 Jun 1;18.
115. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Vol. 51, *Bone*. 2012. p. 249–57.
116. Mukherjee A, Das B. The role of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in the progression of osteoarthritis. Vol. 13, *Biomaterials and Biosystems*. Elsevier Ltd; 2024.

117. Ghouri A, Muzumdar S, Barr AJ i sur. The relationship between meniscal pathologies, cartilage loss, joint replacement and pain in knee osteoarthritis: a systematic review. Vol. 30, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2022. p. 1287–327.
118. Finnson KW, Parker WL, Chi Y i sur. Endoglin differentially regulates TGF- β -induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Nov;18(11):1518–27.
119. Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P. Elevated Circulating and Synovial Fluid Endoglin Are Associated with Primary Knee Osteoarthritis Severity. *Arch Med Res*. 2009 Oct;40(7):590–4.
120. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF- β receptor function in the endothelium. Vol. 65, *Cardiovascular Research*. 2005. p. 599–608.
121. Hunter DJ, Guermazi A, Roemer F, Zhang Y, Neogi T. Structural correlates of pain in joints with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Sep;21(9):1170–8.
122. Roelofs AJ, Kania K, Rafipay AJ i sur. Identification of the skeletal progenitor cells forming osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2020 Dec 1;79(12):1625–34.
123. Li G, Yin J, Gao J i sur. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):223.
124. Hu W, Chen Y, Dou C, Dong S. Microenvironment in subchondral bone: Predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. Vol. 80, *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group; 2021. p. 413–22.
125. Uhalte EC, Wilkinson JM, Southam L, Zeggini E. Pathways to understanding the genomic aetiology of osteoarthritis. Vol. 26, *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2017. p. R193–201.
126. MacDonald L, Elmesmari A, Somma D i sur. Synovial tissue myeloid dendritic cell subsets exhibit distinct tissue-niche localization and function in health and rheumatoid arthritis. *Immunity*. 2024 Dec;57(12):2843–2862.e12.
127. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2019. p. 1–68.
128. Alahdal M, Zhang H, Huang R i sur. Potential efficacy of dendritic cell immunomodulation in the treatment of osteoarthritis. Vol. 60, *Rheumatology (United Kingdom)*. Oxford University Press; 2021. p. 507–17.
129. Panichi V, Costantini S, Grasso M, Arciola CR, Dolzani P. Innate Immunity and Synovitis: Key Players in Osteoarthritis Progression. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
130. Xiaoqiang E, Cao Y, Meng H i sur. Dendritic cells of synovium in experimental model of osteoarthritis of rabbits. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012;30(1):23–32.

131. Lee M, Du H, Winer DA, Clemente-Casares X, Tsai S. Mechanosensing in macrophages and dendritic cells in steady-state and disease. Vol. 10, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
132. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.
133. Cheng J, Li M, Bai R. The Wnt signaling cascade in the pathogenesis of osteoarthritis and related promising treatment strategies. Vol. 13, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
134. Wang Y, Fan X, Xing L, Tian F. Wnt signaling: A promising target for osteoarthritis therapy. Vol. 17, *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd.; 2019.
135. Zeng D, Umar M, Zhu Z i sur. Development of novel osteoarthritis therapy by targeting AMPK- β -catenin-Runx2 signaling. *Genes Dis*. 2024 Jan;101247.
136. Terkeltaub R, Yang B, Lotz M, Liu-Bryan R. Chondrocyte AMP-activated protein kinase activity suppresses matrix degradation responses to proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1928–37.
137. Petursson F, Husa M, June R, Lotz M, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Linked decreases in liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase activity modulate matrix catabolic responses to biomechanical injury in chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jul 25;15(4):R77.
138. Chen J, Long F. MTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Res*. 2018 Dec 1;6(1).
139. Pal B, Endisha H, Zhang Y, Kapoor M. mTOR: A Potential Therapeutic Target in Osteoarthritis? Vol. 15, *Drugs in R and D*. Springer International Publishing; 2015. p. 27–36.
140. Karonitsch T, Kandasamy RK, Kartnig F i sur. mTOR Senses Environmental Cues to Shape the Fibroblast-like Synoviocyte Response to Inflammation. *Cell Rep*. 2018 May 15;23(7):2157–67.
141. Guo H, Huang J, Liang Y, Wang D, Zhang H. Focusing on the hypoxia-inducible factor pathway: role, regulation, and therapy for osteoarthritis. Vol. 27, *European Journal of Medical Research*. BioMed Central Ltd; 2022.
142. Zhang XA, Kong H. Mechanism of HIFs in osteoarthritis. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
143. Wu M, Wu S, Chen W, Li YP. The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. Vol. 34, *Cell Research*. Springer Nature; 2024. p. 101–23.
144. Thielen NGM, Van der Kraan PM, Van Caam APM. TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
145. Huang Y, Liao J, Vlashi R, Chen G. Focal adhesion kinase (FAK): its structure, characteristics, and signaling in skeletal system. *Cell Signal*. 2023 Nov;111:110852.

146. Chen S, He T, Zhong Y i sur. Roles of focal adhesion proteins in skeleton and diseases. Vol. 13, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences; 2023. p. 998–1013.
147. Xie Y, Zinkle A, Chen L, Mohammadi M. Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair. Vol. 16, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2020. p. 547–64.
148. Li HZ, Zhang JL, Yuan DL i sur. Role of signaling pathways in age-related orthopedic diseases: focus on the fibroblast growth factor family. Vol. 11, *Military Medical Research*. BioMed Central Ltd; 2024.
149. Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. Vol. 43, *Molecules and Cells*. Elsevier B.V.; 2020. p. 168–75.
150. Chen D, Kim DJ, Shen J, Zou Z, O’Keefe RJ. Runx2 plays a central role in Osteoarthritis development. Vol. 23, *Journal of Orthopaedic Translation*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd; 2020. p. 132–9.
151. Catheline SE, Hoak D, Chang M i sur. Chondrocyte-Specific RUNX2 Overexpression Accelerates Post-traumatic Osteoarthritis Progression in Adult Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2019 Sep 1;34(9):1676–89.
152. Liao L, Zhang S, Gu J i sur. Deletion of Runx2 in Articular Chondrocytes Decelerates the Progression of DMM-Induced Osteoarthritis in Adult Mice. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
153. Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X i sur. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. Vol. 9, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2024.
154. Choi MC, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. NF- κ b signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction. *Cells*. 2019 Jul 1;8(7).
155. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Vol. 2, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2017.
156. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. Vol. 180, *Cell*. Cell Press; 2020. p. 1044–66.
157. Rayees S, Rochford I, Joshi JC, Joshi B, Banerjee S, Mehta D. Macrophage TLR4 and PAR2 Signaling: Role in Regulating Vascular Inflammatory Injury and Repair. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
158. Kim HJ, Kim H, Lee JH, Hwangbo C. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. Vol. 20, *Immunity and Ageing*. BioMed Central Ltd; 2023.
159. Kawai T, Ikegawa M, Ori D, Akira S. Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity. *Immunity*. 2024 Apr;57(4):649–73.
160. Zhang Y, Bliska JB. Role of toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect Immun*. 2003 Mar 1;71(3):1513–9.

161. Charlier E, Relic B, Deroyer C i sur. Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2016.
162. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. Vol. 135, Biochimie. Elsevier B.V.; 2017. p. 111–25.
163. Bartels YL, Van Lent Plem, Van Der Kraan PM, Blom AB, Bongers KM, Van Den Bosch MHJ. Inhibition of TLR4 signalling to dampen joint inflammation in osteoarthritis. Vol. 63, Rheumatology (United Kingdom). Oxford University Press; 2024. p. 608–18.
164. Oda M, Yamamoto H, Kawakami T. Maintenance of homeostasis by TLR4 ligands. Vol. 15, Frontiers in Immunology. Frontiers Media SA; 2024.
165. Hu C, Yang J, Qi Z i sur. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. Vol. 3, MedComm. John Wiley and Sons Inc; 2022.
166. Tukaj S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: Insights into autoimmunity. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–13.
167. Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D i sur. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. Cell Stress Chaperones. 2018 May 1;23(3):373–84.
168. Garg A, Kumari B, Kumar M. Emerging Role of HSP70 in Human Diseases. In 2018. p. 291–304.
169. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Vol. 78, Cellular and Molecular Life Sciences. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1233–61.
170. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis-finding targets for candidate DMOADs. Vol. 11, Nature Reviews Rheumatology. Nature Publishing Group; 2015. p. 159–70.
171. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. Vol. 11, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2020.
172. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Vol. 496, Nature. 2013. p. 445–55.
173. Mamilos A, Winter L, Schmitt VH i sur. Macrophages: From Simple Phagocyte to an Integrative Regulatory Cell for Inflammation and Tissue Regeneration—A Review of the Literature. Vol. 12, Cells. MDPI; 2023.
174. Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases. Vol. 9, Journal of Inflammation Research. Dove Medical Press Ltd; 2016. p. 1–11.
175. Bied M, Ho WW, Ginhoux F, Blériot C. Roles of macrophages in tumor development: a spatiotemporal perspective. Cell Mol Immunol. 2023 Jul 10;20(9):983–92.

176. Jenkins SJ, Allen JE. The expanding world of tissue-resident macrophages. Vol. 51, *European Journal of Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1882–96.
177. Kozloski GA. Macrophage Markers. *Materials and Methods*. 2019 Apr 23;9.
178. Mass E, Nimmerjahn F, Kierdorf K, Schlitzer A. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. Vol. 23, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2023. p. 563–79.
179. Mass E, Ballesteros I, Farlik M i sur. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* (1979). 2016 Sep 9;353(6304).
180. Wu CL, Harasymowicz NS, Klimak MA, Collins KH, Guilak F. The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair. Vol. 28, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 544–54.
181. Wu Y, Hirschi KK. Tissue-Resident Macrophage Development and Function. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
182. Uccellini MB, Aslam S, Liu STH, Alam F, García-Sastre A. Development of a macrophage-based adcc assay. *Vaccines* (Basel). 2021 Jun 1;9(6).
183. Sheu KM, Hoffmann A. Functional Hallmarks of Healthy Macrophage Responses: Their Regulatory Basis and Disease Relevance. *Annu Rev Immunol*. 2022 Apr 26;40(1):295–321.
184. Chin DS, Lim CSY, Nordin F, Arifin N, Jun TG. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Through Natural Killer (NK) Cells: Unlocking NK Cells for Future Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2022 Mar;23(4):552–78.
185. Zahavi D, AlDeghaither D, O’Connell A, Weiner LM. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: A strategy for improving antibody-based immunotherapy. Vol. 1, *Antibody Therapeutics*. Oxford University Press; 2018. p. 7–12.
186. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology*. 2008. p. 34–47.
187. Zhang M, Wen B, Anton OM i sur. IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Nov 13;115(46):E10915–24.
188. Coënon L, Villalba M. From CD16a Biology to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Improvement. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
189. Chu Z, Sun C, Sun L i sur. Primed macrophages directly and specifically reject allografts. *Cell Mol Immunol*. 2020 Mar 1;17(3):237–46.
190. Sankar J, Arora S, Joshi G, Kumar R. Pore-forming proteins and their role in cancer and inflammation: Mechanistic insights and plausible druggable targets. *Chem Biol Interact*. 2022 Oct;366:110127.
191. Rudd-Schmidt JA, Hodel AW, Noori T i sur. Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1).

192. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
193. Pandey S, Kant S, Khawary M, Tripathi D. Macrophages in Microbial Pathogenesis: Commonalities of Defense Evasion Mechanisms. Vol. 90, *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology; 2022.
194. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
195. Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*. 2022 Apr 1;8(2).
196. Roa-Vidal N, Rodríguez-Aponte AS, Lasalde-Dominicci JA, Capó-Vélez CM, Delgado-Vélez M. Cholinergic Polarization of Human Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 29;24(21):15732.
197. Francisco S, Billod JM, Merino J i sur. Induction of TLR4/TLR2 Interaction and Heterodimer Formation by Low Endotoxic Atypical LPS. *Front Immunol*. 2022 Jan 24;12.
198. Vella AT, McAleer JP. Understanding How Lipopolysaccharide Impacts CD4 T-Cell Immunity. *Crit Rev Immunol*. 2008;28(4):281–99.
199. Cummings RD. The mannose receptor ligands and the macrophage glycome. *Curr Opin Struct Biol*. 2022 Aug;75:102394.
200. Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infect Immun*. 1999 Feb;67(2):469–77.
201. Skorstengaard K, Jensen Ms, Sahl P, Petersen Te, Magnusson S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem*. 1986;161(2):441–53.
202. East L. The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2002 Sep 19;1572(2–3):364–86.
203. Paurević M, Šrajer Gajdošik M, Ribić R. Mannose Ligands for Mannose Receptor Targeting. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
204. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Apr 27;15(4):203–16.
205. Jain A, Pasare C. Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *The Journal of Immunology*. 2017 May 15;198(10):3791–800.
206. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. Vol. 117, *Journal of Clinical Investigation*. 2007. p. 1119–27.
207. Mir MA. Concept of Reverse Costimulation and Its Role in Diseases. In: *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases*. Elsevier; 2015. p. 45–81.

208. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 433–48.
209. Wu B, Wan Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. Vol. 80, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
210. Zhang S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. Vol. 155, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 24–35.
211. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 121–33.
212. Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L, Stahl PD. From Pattern Recognition Receptor to Regulator of Homeostasis: The Double-Faced Macrophage Mannose Receptor. Vol. 24, *Critical ReviewsTM in Immunology*. 2004.
213. Chieppa M, Bianchi G, Doni A i sur. Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program 1. Vol. 171, *The Journal of Immunology*. 2003.
214. Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S i sur. Cytokines, implantation and early abortion: Re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. Vol. 50, *American Journal of Reproductive Immunology*. 2003. p. 177–86.
215. Laskarin G, Medancic SS, Redzovic A, Duric D, Rukavina D. Specific decidual CD14+ cells hamper cognate NK cell proliferation and cytolytic mediator expression after mucin 1 treatment in vitro. *J Reprod Immunol*. 2012 Sep;95(1–2):36–45.
216. Laskarin G, Redzovic A, Vlastelic I i sur. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) is a natural ligand for the C-type lectin-like domain that induces anti-inflammatory orientation of early pregnancy decidual CD1a+ dendritic cells. *J Reprod Immunol*. 2011 Jan;88(1):12–23.
217. Kandahari AM, Yang X, Dighe AS, Pan D, Cui Q. Recognition of Immune Response for the Early Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. Vol. 2015, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
218. Thomson A, Hilken CMU. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
219. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*. 2012 Mar 1;122(3):787–95.
220. Anand N, Peh KH, Kolesar JM. Macrophage Repolarization as a Therapeutic Strategy for Osteosarcoma. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
221. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2014.

222. Liu Y, Xu R, Gu H i sur. Metabolic reprogramming in macrophage responses. Vol. 9, Biomarker Research. BioMed Central Ltd; 2021.
223. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol.* 2019 Jul 3;10.
224. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. Vol. 33, *European Heart Journal.* 2012.
225. Rahat MA, Hemmerlein B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front Physiol.* 2013;4.
226. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. Nitric oxide: A key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. Vol. 10, *Cell Death and Differentiation.* 2003. p. 418–30.
227. Liberale L, Dallegri F, Montecucco F, Carbone F. Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. Vol. 117, *Thrombosis and Haemostasis.* Schattauer GmbH; 2017. p. 7–18.
228. Cutolo M, Campitiello R, Gotelli E, Soldano S. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Front Immunol.* 2022 May 19;13.
229. Gharavi AT, Hanjani NA, Movahed E, Doroudian M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. Vol. 27, *Cellular and Molecular Biology Letters.* BioMed Central Ltd; 2022.
230. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10:792.
231. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology.* 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
232. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R i sur. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? Vol. 137, *Clinical Science.* Portland Press Ltd; 2023. p. 1067–93.
233. D Foey A. Macrophage Polarisation: A collaboration of Differentiation, Activation and Pre-Programming? *J Clin Cell Immunol.* 2015;06(01).
234. Alivernini S, MacDonald L, Elmesmari A i sur. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med [Internet].* 2020 Aug;26(8):1295–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32601335>
235. Chen Y, Jiang W, Yong H i sur. Macrophages in osteoarthritis: pathophysiology and therapeutics. *Am J Transl Res.* 2020;12(1):261–8.
236. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S i sur. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Vol. 116, *Blood.* American Society of Hematology; 2010.
237. Leung YY, Huebner JL, Haaland B, Wong SBS, Kraus VB. Synovial fluid pro-inflammatory profile differs according to the characteristics of knee pain. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017 Sep 1;25(9):1420–7.

238. Hofmann S, Grasberger H, Jung P i sur. The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. *Eur J Med Res*. 2002 Apr 30;7(4):171–6.
239. Zhang Y, Liu D, Vithran DTA i sur. CC chemokines and receptors in osteoarthritis: new insights and potential targets. Vol. 25, *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central Ltd; 2023.
240. Rodriguez-Merchan EC. The Current Role of Disease-modifying Osteoarthritis Drugs. *Arch Bone Jt Surg* [Internet]. 2023;11(1):11–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36793668>
241. Wenham CYJ, Conaghan PG. The role of synovitis in osteoarthritis. Vol. 2, *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2010. p. 349–59.
242. Han SA, Lee S, Seong SC, Lee MC. Effects of CD14 macrophages and proinflammatory cytokines on chondrogenesis in osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(19–20):2680–91.
243. Duan Y, Gong K, Xu S, Zhang F, Meng X, Han J. Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Aug 2;7(1):265.
244. Zampelas A, Magriplis E. New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy? *Nutrients*. 2019 Jul 18;11(7):1645.
245. Wadhera RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP, Foody JM. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J Clin Lipidol*. 2016 May;10(3):472–89.
246. Groh L, Keating ST, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. Vol. 40, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2018. p. 203–14.
247. Scanzello CR. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. Vol. 29, *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 79–85.
248. Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. Vol. 1840, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2014. p. 809–17.
249. Villalvilla A, Larrañaga-Vera A, Lamuedra A i sur. Modulation of the Inflammatory Process by Hypercholesterolemia in Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Sep 25;7.
250. Patel RP, Diczfalusy U, Dzeletovic S, Wilson MT, Darley-USmar VM. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J Lipid Res*. 1996 Nov;37(11):2361–71.
251. Urano Y, Noguchi N. Enzymatically Formed Oxysterols and Cell Death. In 2024. p. 193–211.
252. Anderson A, Campo A, Fulton E, Corwin A, Jerome WG, O'Connor MS. 7-Ketocholesterol in disease and aging. Vol. 29, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2020.

253. Helmschrodt C, Becker S, Schröter J i sur. Fast LC–MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. *Clinica Chimica Acta*. 2013 Oct;425:3–8.
254. Ravi S, Duraisamy P, Krishnan M i sur. An insight on 7- ketocholesterol mediated inflammation in atherosclerosis and potential therapeutics. Vol. 172, *Steroids*. Elsevier Inc.; 2021.
255. Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C i sur. 7-Ketocholesterol-induced apoptosis. *FEBS J*. 2005 Jun 14;272(12):3093–104.
256. Han JH, Kim YJ, Han ES, Lee CS. Prevention of 7-ketocholesterol-induced mitochondrial damage and cell death by calmodulin inhibition. *Brain Res*. 2007 Mar 16;1137(1):11–9.
257. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V i sur. NAD(P)H Oxidase Nox-4 Mediates 7-Ketocholesterol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Mol Cell Biol*. 2004 Dec 1;24(24):10703–17.
258. Mahalakshmi K, Parimalanandhini D, Sangeetha R i sur. Influential role of 7-Ketocholesterol in the progression of Alzheimer’s disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2021 Oct;156:106582.
259. Testa G, Rossin D, Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie*. 2018 Oct;153:220–31.
260. Shimozawa M, Naito Y, Manabe H i sur. 7-ketocholesterol enhances the expression of adhesion molecules on human aortic endothelial cells by increasing the production of reactive oxygen species. *Redox Report*. 2004;9(6):370–5.
261. Tani M, Kamata Y, Deushi M, Osaka M, Yoshida M. 7-Ketocholesterol enhances leukocyte adhesion to endothelial cells via p38MAPK pathway. *PLoS One*. 2018 Jul 1;13(7).
262. Luquain-Costaz C, Delton I. Oxysterols in Vascular Cells and Role in Atherosclerosis. In 2024. p. 213–29.
263. Shibata N, Glass CK. Macrophages, oxysterols and atherosclerosis. Vol. 74, *Circulation Journal*. 2010. p. 2045–51.
264. Zmysłowski A, Szterk A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. Vol. 16, *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd.; 2017.
265. Gargiulo S, Gamba P, Testa G, Leonarduzzi G, Poli G. The role of oxysterols in vascular ageing. Vol. 594, *Journal of Physiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 2095–113.
266. Prunet C, Montange T, Vêjux A i sur. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry Part A*. 2006 May;69(5):359–73.

267. Larrayoz IM, Huang JD, Lee JW, Pascual I, Rodríguez IR. 7-Ketocholesterol-Induced inflammation: Involvement of multiple kinase signaling pathways via NFκB but independently of reactive oxygen species formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Oct;51(10):4942–55.
268. Buttari B, Segoni L, Profumo E i sur. 7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2 macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(1):130–7.
269. Leonarduzzi G, Gamba P, Sottero B i sur. Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. *Free Radic Biol Med*. 2005 Nov;39(9):1152–61.
270. Shoeb M, Ansari N, Srivastava S, Ramana K. 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases. *Curr Med Chem*. 2013 Dec 31;21(2):230–7.
271. Shi Q, Abusarah J, Zaouter C i sur. New evidence implicating 4-hydroxynonenal in the pathogenesis of osteoarthritis in vivo. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;66(9):2461–71.
272. Geib T, Iacob C, Jribi R, Fernandes J, Benderdour M, Sleno L. Identification of 4-hydroxynonenal-modified proteins in human osteoarthritic chondrocytes. *J Proteomics*. 2021 Feb 10;232.
273. Csala M, Kardon T, Legeza B i sur. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. Vol. 1852, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier; 2015. p. 826–38.
274. Munno M, Mallia A, Greco A, Modafferi G, Banfi C, Eligini S. Radical Oxygen Species, Oxidized Low-Density Lipoproteins, and Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1: A Vicious Circle in Atherosclerotic Process. *Antioxidants*. 2024 May 9;13(5):583.
275. Li Y, Zhao T, Li J i sur. Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. Vol. 2022, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2022.
276. Sharma S, Sharma P, Bailey T i sur. Electrophilic Aldehyde 4-Hydroxy-2-Nonenal Mediated Signaling and Mitochondrial Dysfunction. *Biomolecules*. 2022 Oct 25;12(11):1555.
277. Abusarah J, Bentz M, Benabdoune H i sur. An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis. Vol. 66, *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 637–51.
278. Morquette B, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: New evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan 29;54(1):271–81.
279. Shi Q, Vaillancourt F, Côté V i sur. Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal. *Arthritis Res Ther*. 2006 Oct 16;8(6).

280. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q i sur. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(5):R107.
281. Kan S, Duan M, Liu Y, Wang C, Xie J. Role of Mitochondria in Physiology of Chondrocytes and Diseases of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. Vol. 13, *Cartilage*. SAGE Publications Inc.; 2021. p. 1102S-1121S.
282. Arra M, Swarnkar G, Ke K i sur. LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
283. Kumar V, Butcher SJ, Öörni K i sur. Three-dimensional cryoEM reconstruction of native LDL particles to 16Å resolution at physiological body temperature. *PLoS One*. 2011;6(5).
284. Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1381–478.
285. Altman R, Asch E, Bloch D i sur. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986 Aug;29(8):1039–49.
286. American Heart Association. American Heart Association: Classes of heart failure. American Heart Association. <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/what-is-heart-failure/classes-of-heart-failure>. 2017.
287. Official Journal of the International Society of Nephrology KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease [Internet]. Available from: www.publicationethics.org
288. Karvellas CJ, Bajaj JS, Kamath PS i sur. AASLD Practice Guidance on Acute-on-chronic liver failure and the management of critically ill patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2024 Jun 1;79(6):1463–502.
289. World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191.
290. Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;242–54.
291. Laskarin G, Persic V, Ruzic A i sur. Perforin-mediated cytotoxicity in non-ST elevation myocardial infarction. *Scand J Immunol*. 2011 Aug;74(2):195–204.
292. Gulic T, Laskarin G, Glavan L, Grubić Kezele T, Haller H, Rukavina D. Human Decidual CD1a+ Dendritic Cells Undergo Functional Maturation Program Mediated by Gp96. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3).
293. Laskarin G, Redzovic A, Vukelic P i sur. Phenotype of NK Cells and Cytotoxic/Apoptotic Mediators Expression in Ectopic Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010 Nov;64(5):347–58.
294. Chang MC, Chen YJ, Liou EJW i sur. 7-Ketocholesterol induces ATM/ATR, Chk1/Chk2, PI3K/Akt signalings, cytotoxicity and IL-8 production in endothelial cells. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(46):74473–83.

295. Donaldson JG. Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol.* 2015 Dec 1;69(1):4.3.1-4.3.7.
296. Persic V, Ruzic A, Miletic B i sur. Granulysin expression in lymphocytes that populate the peripheral blood and the myocardium after an acute coronary event. *Scand J Immunol.* 2012 Feb;75(2):231–42.
297. Drvar V, Ćurko-Cofek B, Karleuša L i sur. Granulysin expression and granulysin-mediated apoptosis in the peripheral blood of osteoarthritis patients. *Biomed Rep.* 2022 May;16(5):44.
298. Kabakov AE, Gabai VL. Cell death and survival assays. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2018. p. 107–27.
299. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis. *Medical Clinics of North America.* 2020 Mar;104(2):293–311.
300. Blanco FJ, Silva-Díaz M, Quevedo Vila V i sur. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study*. *Reumatología Clínica (English Edition).* 2021 Oct;17(8):461–70.
301. Lindblad S, Hedfors E. Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1987 Oct 13;30(10):1081–8.
302. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Vol. 2014, *Mediators of Inflammation.* Hindawi Publishing Corporation; 2014.
303. van der Kraan PM. The Interaction between Joint Inflammation and Cartilage Repair. *Tissue Eng Regen Med.* 2019 Aug 26;16(4):327–34.
304. Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 29;24(7):6405.
305. Chou CH, Jain V, Gibson J i sur. Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Sci Rep.* 2020 Jul 2;10(1):10868.
306. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q i sur. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. Vol. 8, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2023.
307. Grieshaber-Bouyer R, Kämmerer T, Rosshirt N i sur. Divergent Mononuclear Cell Participation and Cytokine Release Profiles Define Hip and Knee Osteoarthritis. *J Clin Med.* 2019 Oct 5;8(10):1631.
308. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993 Mar 15;81(6):1607–13.
309. Betjes MGH, Haks MC, Tuk CW, Beelen RHJ. Monoclonal Antibody EBM11 (Anti-CD68) Discriminates between Dendritic Cells and Macrophages after Short-Term Culture. *Immunobiology.* 1991 Sep;183(1–2):79–87.

310. Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 2000 Jan 1;67(1):104–8.
311. van der Kooij MA, von der Mark EM, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJC, Morand OH. Human Monocyte–Derived Macrophages Express an approximately 120-kD Ox-LDL Binding Protein With Strong Identity to CD68. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):3107–16.
312. Amanzada A, Malik IA, Blaschke M i sur. Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(4):561–70.
313. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A i sur. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand J Immunol.* 2008 May 8;67(5):453–63.
314. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation.* 2017 Jan 21;97(1):4–13.
315. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Vol. 327, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2010. p. 656–61.
316. Leong AS, Cooper K, Leong FJ. *Manual of Diagnostic Cytology* (2 ed.). 2 ed. Greenwich Medical Media, Ltd; 2003. 135–136 p.
317. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996 Dec 10;93(25):14833–8.
318. Dai L, Lamb B~ DJ, Leake DS i sur. Evidence for Oxidised Low Density Lipoprotein in Synovial Fluid from Rheumatoid Arthritis Patients. Vol. 32, *Free Rad. Res.*
319. Winyard PG, Tatzber F, Esterbauer H, Kus ML, Blake DR, Morris CJ. Presence of foam cells containing oxidised low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. Vol. 52, *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1993.
320. Siegal FP, Lopez C, Fitzgerald PA i sur. Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *Journal of Clinical Investigation.* 1986 Jul 1;78(1):115–23.
321. Mcinnes IB, Leung BP, Liew FY. Cell-cell interactions in synovitis Interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res.* 2000;2:374–8.
322. Liu MF, Kohsaka H, Sakurai H i sur. The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 1996 Jan 12;39(1):110–4.
323. Bai LK, Su YZ, Wang XX i sur. Synovial Macrophages: Past Life, Current Situation, and Application in Inflammatory Arthritis. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.

324. Murray RZ, Stow JL. Cytokine secretion in macrophages: SNAREs, Rabs, and membrane trafficking. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2014.
325. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: Implications for its therapeutic use. Vol. 14, *Microbes and Infection*. 2012. p. 247–61.
326. Wang X, Zhao XY. Transcription Factors Associated With IL-15 Cytokine Signaling During NK Cell Development. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
327. Choi YH, Lim EJ, Kim SW, Moon YW, Park KS, An HJ. IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *J Immunother Cancer*. 2019 Jul 5;7(1).
328. Chen S, Zhu H, Jounaidi Y. Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. Vol. 9, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2024.
329. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5):1–20.
330. Molnar V, Matišić VM, Kodvanj I i sur. Molecular Sciences Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. 2021 [cited 2024 Aug 15]; Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22179208>
331. Evers TMJ, Sheikhhassani V, Haks MC, Storm C, Ottenhoff THM, Mashaghi A. Single-cell analysis reveals chemokine-mediated differential regulation of monocyte mechanics. *iScience*. 2022 Jan;25(1):103555.
332. Kaushansky N, Bakos E, Becker-Herman S, Shachar I, Ben-Nun A. Circulating Picomolar Levels of CCL2 Downregulate Ongoing Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Induction of Regulatory Mechanisms. *The Journal of Immunology*. 2019 Oct 1;203(7):1857–66.
333. Sozio F, Schioppa T, Laffranchi M i sur. CCRL2 Expression by Specialized Lung Capillary Endothelial Cells Controls NK-cell Homing in Lung Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2023 Sep 1;11(9):1280–95.
334. Raghu H, Lepus CM, Wang Q i sur. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 May;76(5):914–22.
335. Zhao X, Gu M, Xu X i sur. CCL3/CCR1 mediates CD14+CD16– circulating monocyte recruitment in knee osteoarthritis progression. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020 May;28(5):613–25.
336. Yu D, Zhang S, Ma C i sur. CCL3 in the bone marrow microenvironment causes bone loss and bone marrow adiposity in aged mice. *JCI Insight*. 2023 Jan 10;8(1).
337. Wan H, Qian TY, Hu XJ i sur. Correlation of Serum CCL3/MIP-1 α Levels with Disease Severity in Postmenopausal Osteoporotic Females. *Balkan Med J*. 2018 Jul 24;35(4):320–5.

338. Luo H, Li L, Han S, Liu T. The role of monocyte/macrophage chemokines in pathogenesis of osteoarthritis: A review. Vol. 51, *International Journal of Immunogenetics*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 130–42.
339. Xu Y kun, Ke Y, Wang B, Lin J Hao. The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis. *Biol Res*. 2015 Dec 17;48(1):64.
340. Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Oct;10(10):799–807.
341. Scotece M, Pérez T, Conde J i sur. Adipokines induce pro-inflammatory factors in activated Cd4+ T cells from osteoarthritis patient. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017 Jun;35(6):1299–303.
342. Dapunt U, Maurer S, Giese T, Gaida MM, Hänsch GM. The macrophage inflammatory proteins MIP1 (CCL3) and MIP2 (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: Linking inflammation to bone degradation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
343. Alrumaihi F. The Multi-Functional Roles of CCR7 in Human Immunology and as a Promising Therapeutic Target for Cancer Therapeutics. Vol. 9, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2022.
344. Li J, Xiao C, Li C, He J. Tissue-resident immune cells: from defining characteristics to roles in diseases. Vol. 10, *Signal transduction and targeted therapy*. 2025. p. 12.
345. Ren G, Al-Jezani N, Railton P, Powell JN, Krawetz RJ. CCL22 induces pro-inflammatory changes in fibroblast-like synoviocytes. *iScience*. 2021 Jan;24(1):101943.
346. Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(2):105–14.
347. Ren G, Whittaker JL, Leonard C i sur. CCL22 is a biomarker of cartilage injury and plays a functional role in chondrocyte apoptosis. *Cytokine*. 2019 Mar 1;115:32–44.
348. Achuthan A, Cook AD, Lee MC i sur. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Aug 15;126(9):3453–66.
349. Mantovani A, Garlanda C, Locati M i sur. Regulatory pathways in inflammation. *Autoimmun Rev*. 2007 Nov;7(1):8–11.
350. Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A i sur. Review: Structure–function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. *Mol Immunol*. 2013 Aug;55(1):87–93.
351. Seneviratne AN, Sivagurunathan B, Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 2012 Jan;413(1–2):3–14.
352. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677–86.

353. Bowdish DME, Loffredo MS, Mukhopadhyay S, Mantovani A, Gordon S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. *Microbes Infect.* 2007 Nov;9(14–15):1680–7.
354. Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004 Apr 20;101(16):6128–33.
355. Pawaria S, Binder RJ. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun.* 2011 Nov 1;2(1):521.
356. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol.* 2000 Aug;1(2):151–5.
357. Nayak DA, Sedlacek AL, Cillo AR, Watkins SC, Binder RJ. CD91 and Its Ligand gp96 Confer Cross-Priming Capabilities to Multiple APCs during Immune Responses to Nascent, Emerging Tumors. *Cancer Immunol Res.* 2024 Dec 3;12(12):1663–76.
358. Costales P, Castellano J, Revuelta-López E i sur. Lipopolysaccharide downregulates CD91/low-density lipoprotein receptor-related protein 1 expression through SREBP-1 overexpression in human macrophages. *Atherosclerosis.* 2013 Mar;227(1):79–88.
359. Ngarmukos S, Scaramuzza S, Theerawattanapong N, Tanavalee A, Honsawek S. Circulating and Synovial Fluid Heat Shock Protein 70 Are Correlated with Severity in Knee Osteoarthritis. *Cartilage.* 2020 Jul 1;11(3):323–8.
360. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. Vol. 20, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2019. p. 665–80.
361. Schick C, Arbogast M, Lowka K, Rzepka R, Melchers I. Continuous Enhanced Expression of Hsc70 but Not Hsp70 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):88–93.
362. Asea A, Rehli M, Kabingu E i sur. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Apr 26;277(17):15028–34.
363. Pustynnikov S, Sagar D, Jain P, Khan ZK. Targeting the C-type Lectins-Mediated Host-Pathogen Interactions with Dextran. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2014 Aug 18;17(3):371.
364. Song Q, Zhang Y, Zhou M i sur. The Culture Dish Surface Influences the Phenotype and Dissociation Strategy in Distinct Mouse Macrophage Populations. *Front Immunol.* 2022 Jul 6;13.
365. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013 Oct 22;110(43):17253–8.
366. Scanzello CR, Umoh E, Pessler F i sur. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 Aug;17(8):1040–8.

367. Allavena P, Giardina G, Bianchi G, Mantovani A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukoc Biol.* 1997 Jun 1;61(6):729–35.
368. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K i sur. Preferential accumulation of activated Th1 cells not only in rheumatoid arthritis but also in osteoarthritis joints. *Journal of Rheumatology.* 2011 Aug;38(8):1569–75.
369. Kambara K, Ohashi W, Tomita K i sur. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. *American Journal of Pathology.* 2015 Jan 1;185(1):162–71.
370. Smith TD, Tse MJ, Read EL, Liu WF. Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integrative Biology (United Kingdom).* 2016 Sep 1;8(9):946–55.
371. Pessanha AP, Martins RAP, Mattos-Guaraldi AL, Vianna A, Moreira LO. Arginase-1 expression in granulomas of tuberculosis patients: Figure 1. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):265–8.
372. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G i sur. Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis. *PLoS One.* 2010 Jan 25;5(1):e8852.
373. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology.* 2008. p. 958–69.
374. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010 Oct 20;11(10):889–96.
375. Gomazkov OA. The molecular and physiological aspects of endothelial dysfunction. The role of endogenous chemical regulators. *Usp Fiziol Nauk.* 2000;31(4):48–62.
376. Araos P, Figueroa S, Amador CA. The Role of Neutrophils in Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 12;21(22):8536.
377. Xie Y, Chen H, Qu P, Qiao X, Guo L, Liu L. Novel insight on the role of Macrophages in atherosclerosis: Focus on polarization, apoptosis and efferocytosis. Vol. 113, *International Immunopharmacology.* Elsevier B.V.; 2022.
378. von Ehr A, Bode C, Hilgendorf I. Macrophages in Atheromatous Plaque Developmental Stages. Vol. 9, *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* Frontiers Media S.A.; 2022.
379. Farahi L, Sinha SK, Lusis AJ. Roles of Macrophages in Atherogenesis. *Front Pharmacol [Internet].* 2021 Nov 26;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.785220/full>
380. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. Vol. 5, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Research Foundation; 2014.
381. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr;9(4):259–70.

382. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007 Jan 2;117(1):175–84.
383. Zhou K, Yang C, Shi K i sur. Activated macrophage membrane-coated nanoparticles relieve osteoarthritis-induced synovitis and joint damage. *Biomaterials*. 2023 Apr;295:122036.
384. Porta C, Rimoldi M, Raes G i sur. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Sep;106(35):14978–83.
385. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Vol. 32, *Immunity*. 2010. p. 593–604.
386. Wang Y, Wang J, Zheng W i sur. Identification of an IL-1 receptor mutation driving autoinflammation directs IL-1-targeted drug design. *Immunity*. 2023 Jul;56(7):1485-1501.e7.
387. Lang D, Knop J, Wesche H i sur. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6871–7.
388. Mobasheri A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. Vol. 59, *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*. Elsevier Masson SAS; 2016. p. 333–9.
389. Lin P, Ji HH, Li YJ, Guo SD. Macrophage Plasticity and Atherosclerosis Therapy. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 May 7;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.679797/full>
390. Zeibig S, Li Z, Wagner S i sur. Effect of the oxLDL Binding Protein Fc-CD68 on Plaque Extension and Vulnerability in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2011 Mar 18;108(6):695–703.
391. Johnson JL, Newby AC. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol*. 2009 Oct;20(5):370–8.
392. Kim YS, Park ZY, Kim SY, Jeong E, Lee JY. Alteration of Toll-like receptor 4 activation by 4-hydroxy-2-nonenal mediated by the suppression of receptor homodimerization. *Chem Biol Interact*. 2009 Nov;182(1):59–66.
393. Zhang X, Hou L, Guo Z i sur. Lipid peroxidation in osteoarthritis: focusing on 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and ferroptosis. *Cell Death Discov*. 2023 Aug 29;9(1):320.
394. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Facchini A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2003 Feb;30(2):345–7.
395. Wang CC, Wang CT, Chou WC, Kao CL, Tsai KL. Hyaluronic acid injection reduces inflammatory and apoptotic markers through modulation of AKT by repressing the oxidative status of neutrophils from osteoarthritic synovial fluid. *Int J Biol Macromol*. 2020 Dec;165:2765–72.

396. Wang Y, Wang W, Yang H, Shao D, Zhao X, Zhang G. Intraperitoneal injection of 4-hydroxynonenal (4-HNE), a lipid peroxidation product, exacerbates colonic inflammation through activation of Toll-like receptor 4 signaling. *Free Radic Biol Med*. 2019 Feb;131:237–42.
397. Brandum EP, Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM. Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 3;22(15):8340.
398. Van Raemdonck K, Umar S, Palasiewicz K i sur. CCL21/CCR7 signaling in macrophages promotes joint inflammation and Th17-mediated osteoclast formation in rheumatoid arthritis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020 Apr 24;77(7):1387–99.
399. Han L, Zhang L. CCL21/CCR7 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2023 Aug;121:110431.
400. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression 1. 2006.
401. Ernst O, Vayttaden SJ, Fraser IDC. Measurement of NF- κ B activation in TLR-activated macrophages. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2018. p. 67–78.
402. Mussbacher M, Derler M, Basilio J, Schmid JA. NF- κ B in monocytes and macrophages – an inflammatory master regulator in multitasked immune cells. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
403. Sae-jung T, Leearamwat N, Chaiseema N i sur. The infrapatellar fat pad produces interleukin-6-secreting T cells in response to a proteoglycan aggrecan peptide and provides dominant soluble mediators different from that present in synovial fluid. *Int J Rheum Dis*. 2021 Jun 18;24(6):834–46.
404. Laskarin G, Persic V, Kukic SR i sur. Can pain intensity in osteoarthritis joint be indicator of the impairment of endothelial function? *Med Hypotheses*. 2016 Sep;94:15–9.
405. Gulan G, Ravlic-Gulan J, Strbo N i sur. Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003 Apr;30(4):660–70.
406. Griffiths GM, Alpert S, Lambert E, McGuire J, Weissman IL. Perforin and granzyme A expression identifying cytolytic lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992 Jan 15;89(2):549–53.
407. Rukavina D, Rubeša G, Gudelj L, Haller H, Podack Er. Characteristics of Perforin Expressing Lymphocytes Within the First Trimester Decidua of Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1995 May 9;33(5):394–404.
408. Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*. 2007 Jan;108(1):10–9.
409. Clayberger C, Finn MW, Wang T i sur. 15 kDa Granulysin Causes Differentiation of Monocytes to Dendritic Cells but Lacks Cytotoxic Activity. *The Journal of Immunology*. 2012 Jun 15;188(12):6119–26.

410. Veljkovic Vujaklija D, Dominovic M, Gulic T i sur. Granulysin expression and the interplay of granulysin and perforin at the maternal–fetal interface. *J Reprod Immunol*. 2013 Apr;97(2):186–96.
411. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu S chen, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a Cytolytic Molecule, Is Also a Chemoattractant and Proinflammatory Activator. *The Journal of Immunology*. 2005 May 1;174(9):5243–8.
412. Barman H, Walch M, Latinovic-Golic S i sur. Cholesterol in Negatively Charged Lipid Bilayers Modulates the Effect of the Antimicrobial Protein Granulysin. *Journal of Membrane Biology*. 2006 Jul 6;212(1):29–39.
413. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R i sur. An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. *Science (1979)*. 1998 Oct 2;282(5386):121–5.
414. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U. Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol*. 2007 Dec 27;8(1):9.
415. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 2009 Feb 1;6(1):15–25.
416. Kaspar AA, Okada S, Kumar J i sur. Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *The Journal of Immunology*. 2001 Jul 1;167(1):350–6.
417. Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, Krensky AM. Intracellular Mediators of Granulysin-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology*. 2003 Sep 1;171(5):2556–62.
418. Pardo J, Pérez-Galán P, Gamen S i sur. A Role of the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor in Granulysin-Induced Apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2001 Aug 1;167(3):1222–9.
419. Takamori Y, Ogawa K, Nagata K, Takano S, Nakamura M. Granulysin induces cell death with nuclear accumulation. *J Med Dent Sci*. 2005 Mar;52(1):1–7.
420. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q i sur. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct 19;12(10):580–92.
421. Griffin TM, Scanzello CR. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37 Suppl 120(5):57–63.
422. Berenbaum F, Walker C. Osteoarthritis and inflammation: a serious disease with overlapping phenotypic patterns. *Postgrad Med*. 2020 May 18;132(4):377–84.
423. Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K i sur. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol*. 2003 Jul 13;33(7):1925–33.
424. Kehler T, Laskarin G, Massari D i sur. Possible role of granulysin in pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses*. 2015 Dec 1;85(6):850–3.

425. Koh SM, Chan CK, Teo SH i sur. Elevated plasma and synovial fluid interleukin-8 and interleukin-18 may be associated with the pathogenesis of knee osteoarthritis. *Knee*. 2020 Jan;27(1):26–35.
426. Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*. 2009 Mar 18;73(3):193–8.
427. Belizário JE, Neyra JM, Setúbal Destro Rodrigues MF. When and how NK cell-induced programmed cell death benefits immunological protection against intracellular pathogen infection. *Innate Immun*. 2018 Nov 20;24(8):452–65.
428. Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2020 Feb 12;38(2):253–7.
429. Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Front Immunol*. 2019 Nov 12;10.
430. Liu X, Lieberman J. Knocking 'em Dead: Pore-Forming Proteins in Immune Defense. *Annu Rev Immunol*. 2020 Apr 26;38(1):455–85.
431. Saini R V., Wilson C, Finn MW, Wang T, Krensky AM, Clayberger C. Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells. *The Journal of Immunology*. 2011 Mar 15;186(6):3497–504.
432. Biassoni R, Ugolotti E, De Maria A. NK Cell Receptors and Their Interactions with MHC. *Curr Pharm Des*. 2009 Oct 1;15(28):3301–10.
433. Courties A, Sellam J, Berenbaum F. Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017 Mar;29(2):214–22.
434. Coskun Benlidayi I. Diet in osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2021 Sep 16;41(9):1699–700.
435. Deveza LA, Melo L, Yamato TP, Mills K, Ravi V, Hunter DJ. Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Dec;25(12):1926–41.
436. Laitner MH, Erickson LC, Ortman E. Understanding the Impact of Sex and Gender in Osteoarthritis: Assessing Research Gaps and Unmet Needs. *J Womens Health*. 2021 May 1;30(5):634–41.
437. Hughes SM, Pandey U, Johnston C, Marrazzo J, Hladik F, Micks E. Impact of the menstrual cycle and ethinyl estradiol/etonogestrel contraceptive vaginal ring on granulysin and other mucosal immune mediators. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2021 Aug 16;86(2).
438. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004 Nov;294(1–2):15–22.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Građa LDL molekule.

Slika 2. Patogenetske promjene u koljenu s osteoartritisom.

Slika 3. Mehanizam aktivacije TLR4 te posljedična kaskadna aktivacija unutarstaničnih signalnih puteva.

Slika 4. Mehanizam zaštite citotoksičnih limfocita od djelovanja izlučenog perforina.

Slika 5. Tri ključna signala u aktivaciji stanici T limfocita posredstvom antigen predočnim stanicama.

Slika 6. Interakcija patogena s antigen prezentirajućim stanicama određuje diferencijaciju pomoćničkih limfocita T (TH) odnosno tip imunološkog odgovora.

Slika 7. Polarizacija makrofaga.

Slika 8. Usmjeravanje sazrijevanja monocita i polarizacije makrofaga određuje izvršne funkcije tkivnih makrofaga u zdravlju i bolesti.

Slika 9. Mehanizam nastajanja i učinak oksisterola.

Slika 10. Klasični put aktivacije makrofaga (M1) vezanjem 7-KC-a na TLR4.

Slika 11. Mehanizam djelovanja 4-hidroksinonenala (4-HNE) na unutarstanični prijenos signala i uloga u razvoju bolesti.

Slika 12. Učinak 4-hidroksinonenala (4-HNE) na zglobne strukture u patogenezi OA-a.

Slika 13. Izražaj CD68 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 14. Izražaj CD68 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 15. Izražaj CD3+ i CD56+ limfocita u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 16. Tkivni međuodnos CD68+ stanica s CD3+ limfocitima u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 17. Tkivni međuodnos CD68+ stanica s CD56+ limfocitima u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 18. Izražaj receptora za prepoznavanje uzoraka CD91 i TLR4 na CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 19. Učestalost izražaja receptora za prepoznavanje uzoraka CD91, CD206, CD209 i TLR4 na CD68+ stanicama u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Slika 20. Učestalost izražaja HLA-DR i kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na CD68+ stanicama iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Slika 21. Izražaj signalne molekule CD14 na CD68+ stanicama u suspenziji svježe izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Slika 22. Izražaj CD14 molekule za prijenos signala na CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 23. Izražaj Hsp70 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 24. Učestalost izražaja Hsp70 u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 25. Učestalost izražaja citotoksičkog receptora CD16 (A) te citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina (B) na/ u CD68+ stanicama iz svježe izdvojene suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena protočnom citometrijom.

Slika 26. Izražaj GNLY-a u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 27. Učestalost izražaja proupalnih kemokina CCL2 i CCL3 (A), protuupalnih kemokina CCL22 i CCL17 (B) te proupalnih monokina IL-15, IFN- γ i TNF- α (C) u CD68+ stanicama.

Slika 28. Izražaj CCL2 i CCL3 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 29. Učestalost izražaja i međuodnos M2 biljega arginaze-1 i M1 biljega iNOS u svježe izdvojenoj suspenziji mononuklearnih stanica sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Slika 30. Izražaj M1 biljega iNOS i M2 biljega arginaza-1 u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 31. Izražaj iNOS i arginaze-1 u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 32. Izražaj APAF-1 i NF- κ B u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 33. Izražaj APAF-1 u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 34. Izražaj NF- κ B u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 35. Izražaj LXR-a u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 36. Izražaj LXR u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 37. Izražaj 4-HNE u sinovijskoj membrani bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 38. Izražaj 4-HNE u CD68+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena prikazan metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 39. Smrtnost CD68+ stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA koljena.

Slika 40. Utjecaj 7-KC-a na izražaj TLR4 na CD68+ stanicama.

Slika 41. Pinoendocitoza FITC-dekstrana u ograđene CD68+ stanice iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 42. Izražaj receptora za prepoznavanje obrazaca CD206 (A) i CD91 (B) na CD68+ stanicama iz suspenzije mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 43. Izražaj receptora za kemokine CCR5 (A) i CCR7 (B) na CD68+ stanicama.

Slika 44. Izražaj receptora mamilica za proupalne kemokine D6 (A) i za IL-1R vrste II (B) na CD68+ stanicama.

Slika 45. Izražaj HLA-DR (A) i kostimulacijskih receptora CD80 (B) i CD86 (C) na CD68+ stanicama.

Slika 46. Izražaj arginaza-1 (A) i iNOS (B) biljega u CD68+ stanicama.

Slika 47. Odnos izražaja arginaze-1 i iNOS-a u CD68+ stanicama sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Slika 48. Izražaj proupalnih kemokina CCL2 (A) i CCL3 (B) u CD68+ stanicama.

Slika 49. Izražaj protuupalnih kemokina CCL22 (A) i CCL17 (B) u CD68+ stanicama.

Slika 50. Izražaj IFN- γ (A), IL-17 (B) i IL-15 (C) u CD68+ stanicama.

Slika 51. Izražaj TLR4 na CD68+ stanicama po stimulaciji s Hsp70.

Slika 52. Imunocitokemijsko obilježavanje GNLY-a u limfocitima periferne krvi.

Slika 53. Izražaj GNLY-a u limfocitima periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena i zdravim kontrolama.

Slika 54. Konfokalna laserska mikroskopija GNLY-a i LAMP 1 u limfocitima bolesnika s ranim OA-om koljena (A) i kontrolom (B).

Slika 55. Udio GNLY+ stanica u subpopulacijama limfocita periferne krvi.

Slika 56. Analiza apoptoze posredovane GNLY-om u stanicama prirodnim ubojicama periferne krvi.

Slika 57. Izražaj citotoksičnih medijatora GNLY-a i perforina u CD56+ stanicama u sinovijskoj membrani zrelog OA-a koljena metodom dvostruke imunofluorescencije.

Slika 58. Raspodjela GNLY-a u subpopulacijama limfocita periferne krvi.

Slika 59. Usporedba unutarstaničnog izražaja IFN- γ i IL-4 u CD3-CD56+ stanicama NK, CD3+CD56 limfocitima T i CD3+CD56+ stanicama NKT u bolesnika s ranim OA-om koljena i zdravom kontrolom.

Popis tablica

Tablica 1. Protutijela korištena za imunohistokemijsko obilježavanje tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Tablica 2. Protutijela korištena za imunofluorescenciju tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Tablica 3. Kombinacija protutijela korištenih za imunofluorescenciju tkivnih rezova sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Tablica 4. Protutijela korištena za simultano obilježavanje površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Tablica 5. Kombinacije protutijela korištene za simultano obilježavanje površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Tablica 6. Specifikacija protutijela korištenih u obilježavanju površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama sinovijske membrane zrelog OA-a koljena.

Tablica 7. Kombinacije protutijela korištene za simultano obilježavanje unutarstaničnih i površinskih biljega izdvojenih mononuklearnih stanica sinovijske membrane bolesnika sa zrelim OA-om koljena.

Tablica 8. Specifikacija protutijela korištenih u obilježavanju površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.

Tablica 9. Trostruko obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena u izdvojenim mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika s ranim OA-om koljena.

Popis pokrata

4-HNE	4- hidrokisnonenal
7-KC	7- ketokolesterol, od eng. 7-ketocholesterol
ADAMTS	Dezintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina, od eng. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ADCC	Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima, od eng. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AF	od eng. Alexa Fluor
Ag	Antigen
AGE	Uznapredovali produkti glikacije, od eng. Advanced Glycation End-products
AMP	Adenozin- monofosfat
AMPK	Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza, od eng. Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase
AP-1	Aktivacijski protein-1, od eng. Activating Potein-1
APAF-1	Čimbenik aktivacije apoptotičke proteaze 1, od engl. Apoptotic Protease Activating Factor -1
ATP	Adenozin- trifosfat
Bax	od eng. BCL2 associated X protein
Bcl-2	od eng. B-cell lymphoma 2
BMI	Indeks tjelesne mase, od eng. Body Mass Indeks
BMP	Koštani morfogogenetski protein, od eng. Bone Morphogenetic Proteins
CCL	CC kemokinski ligand, od eng. C-C Motif Chemokine Ligand
CCR	CC kemokinski receptor, od eng. CC- chemokine Receptor
CD	Klaster diferencijacije, od eng. Cluster of Differentiation
cDC	Klasična dendritička stanica, od eng. Classical Dendritic Cells
COX	Ciklooksigenaza, od eng. Cyclooxygenase
CXCR	CXC kemokinski receptor, od eng. C-X-C chemokine Receptor
DAB	3,3-diaminobenzidin
DAMP	Molekulski obrasci povezani s oštećenjem, od eng. Damage- Associated Molecular Patterns
DAPI	4,6-diamidin-2-fenilindol, od eng. 4,6-diamidino-2-phenylindole

DC	Dendritička stanica, od eng. Dendritic Cells
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina, od eng. Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina, od eng. Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzimatska imunokemijska metoda, od eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Kinaza 1 i 2 nadzirana izvanstaničnim signalom, od eng. Extracellular Signal-Related Kinases 1 and 2
FA	od eng. Focal Adhesion
FBS	Govedi fetalni serum, od eng. Fetal Bovine Serum
FcyR	Receptor za Fc fragment imunoglobulina G, od eng. Fc-gamma Receptors
FDA	Američka uprava za hranu i lijekove, od eng. Food and Drug Administration
FGF	Čimbenik rasta fibroblasta, od eng. Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein izotiocijanat, od eng. Fluorescein Isothiocyanate
FSC	od eng. Forward scatter
GAM- FITC	Kozji protu-mišji Ig obilježen s FITC-om, od eng. Goat anti-Mouse conjugated with Fluorescein Isothiocyanate
GAR-FITC	Kozji protu-zečji Ig obilježen s FITC-om, od eng. Goat anti-Rabbit conjugated with Fluorescein Isothiocyanate
GATA	od eng. GATA Binding Protein
GBD	Globani teret bolesti, od eng. Global Burden of Disease
GLUT	Glukozni transportni receptor, od eng. Glucose Transporter
GM-CSF	Čimbenik rasta granulocitno- makrofagnih kolonija, od eng. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GNLY	Granulizin
Hsc	Konstitucijski protein toplinskog stresa, od eng. Constitutive Heat Shock Protein
HDL	Lipoprotein visoke gustoće, od eng. High-Density Lipoprotein
HIF	Inducibilni čimbenik hipoksije, od eng. Hypoxia-Inducible Factors
HLA-DR	Humani leukocitni antigen-DR, od eng. Human Leukocyte Antigen-DR
HMGP1	Protein visoke pokretljivosti skupine 1, od eng. High-Mobility Groupe Box protein 1
hsCRP	Visoko osjetljiv C- reaktivni protein, od eng. high-sensitivity C-Reactive Protein

Hsp	Protein toplinskog stresa, od eng. Heat Shock Protein
ICAM-1	Unutarstanična adhezijska molekula-1, od eng. Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 receptor
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovog oksida, od eng. inducible Nitric Oxide Synthase
IRF3	Čimbenik 3 transkripcije interferona, od eng. Interferon Regulatory Transcription Factor 3
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza, od eng. c-Jun N-terminal Kinase
JNK1/2	c-Jun N-terminalna kinaza 1 i 2, od eng. c-Jun N-terminal Kinase 1 and 2
LAMP	Membranski protein povezan s lizosomom, od eng. Lysosomal membrane protein
LDL	Lipoprotein niske gustoće, od eng. Low-Density Lipoprotein
LDL-R	Receptor za LDL, od eng. Low-Density Lipoprotein Receptor
LOX-1	Oksidirani LDL receptor-1 sličan lektinu, od eng. Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1
LPS	Lipopolisaharid
LXR	Jetreni X receptor, od eng. Liver X Receptor
MCP-1	Monocitni kemoatraktantni protein-1, od eng. Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD2	Mijeloidni čimbenik diferencijacije 2, od eng. Myeloid Differentiation Factor 2
MFI	Srednji intenzitet fluorescencije, od engl. Mean Fluorescence Intensity
MHC	Glavni kompleks histokompatibilnosti, od eng. Major Histocompatibility Complex
MMP	Matriks metaloproteinaza, od eng. Matrix Metalloproteinase
mPt	Monoklonsko protutijelo
mTOR	od eng. Mammalian Target of Rapamycin
MyD88	od eng. Myeloid Differentiation primary response 88
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat, od eng. Nicotinamide- Adenine-Dinucleotide Phosphate

NF- κ B	Nuklearni čimbenik kapa B, od eng. Nuclear Factor kappa B
NK stanice	Stanice prirodne ubojice, od eng. Natural Killer Cells
NKT stanice	od eng. Natural Killer T- lymphocytes
NLR	Receptori slični NOD-u, od eng. NOD- like Receptors
NO	Dušikov oksid
NOS	Sintaza dušikovog oksida, od eng. Nitric Oxide Synthases
OA	Osteoartritis
oxLDL	Oksidirani lipoprotein niske gustoće, od eng. Oxidized Low-Density Lipoprotein
p38 MAPK	p38 protein kinaza aktivirana mitogenom, od eng. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PAMP	Molekulski obrazaci povezani s patogenom, od eng. Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Fiziološka otopina puferirana fosfatom, od eng. Phosphate Buffered Saline
pDC	Plazmocitoidna dendritička stanica, od eng. Plasmacytoid Dendritic Cells
PE	Fikoeritrin, od eng. Phycoerythrin
PE-Cy5	Fikoeritrin-cianin5, od eng. Phycoerythrin- Cyanin5
PI	Propidij jodid
PPAR	Receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma, od eng. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
pPt	Poliklonsko protutijelo
PRR	Receptori za prepoznavanje obrazaca, od eng. Pattern Recognition Receptors
Pt	Protutijelo
RA	Reumatoidni artritis
RAGE	Receptori za vezanje konačnih proizvoda glikacije, od eng. Receptor for Advanced Glycation End-products
ROR α	Orphan receptor alfa povezan s retinoičnom kiselinom, od eng. Retinoic Acid-Related Orphan Rreceptor α
ROR γ t	Orphan receptor γ t povezan s retinoičnom kiselinom, od eng. Retinoic Acid-Related Orphan Receptor- γ t
ROS	Reaktivne vrste kisika, od eng. Reactive Oxygen Species
Runx2	od eng. Runt-related transcription factor 2

SmMNs	Mononuklearne stanice sinovijske membrane
SSC	od eng. Side scatter
STAT	od eng. Signal Transducer and Activator of Transcription
TAM	Tumorom povezani makrofagi, od eng. Tumor-Associated Macrophages
T-bet	od eng. T-box expressed in T cells
TBS	Tris puferizirana fiziološka otopina, od eng. Tris Buffer Saline
TCR	Receptori limfocita T, od eng. T cell receptors
Tfh	Folikularni pomoćnički limfociti T, od eng. Follicular helper T cells
TGF- β	Transformirajući čimbenik rasta beta, od eng. Transforming Growth Factor- beta
Th1	Pomoćnički limfociti T tipa 1, od eng. T helper type 1
Th17	Pomoćnički limfociti T tipa 17, od eng. T helper type 17
Th2	Pomoćnički limfociti T tipa 2, od eng. T helper type 1
TIMP	Tkivni inhibitori metaloproteinaza, od eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TIR	Toll/interleukin-1 receptor, od eng. Toll/Interleukin-1 Receptor
TLR	Receptor sličan Toll-u, od eng. Toll-like receptor
TNF	Čimbenik nekroze tumora, od eng. Tumor Necrosis Factor
TNF- α	Čimbenik nekroze tumora- alfa, od eng. Tumor Necrosis Factor- alpha
Treg	Regulacijski limfociti T, od eng. Regulatory T cells
VCAM-1	Vaskularna stanična adhezijska molekula-1, od eng. Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vaskularni endotelni čimbenik rasta, od eng. Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	od eng. Wingless-like

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Vedrana Drvar

Datum i mjesto rođenja: 19. siječanj 1984., Rijeka, Hrvatska

Školovanje:

1990. – 1998. Osnovna škola Skrad, Skrad

1998. – 2002. Srednja škola Delnice, smjer Opća gimnazija, Delnice

2002. – 2008. Farmaceusko- biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

2019. - Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo, smjer Biomedicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Radno iskustvo:

2008. – 2009. Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka – mag. med. biochem.- pripravnik

2009. – 2015. Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka – mag. med. biochem.

2015. - Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka – mag. med. biochem., specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine

Akademski naslovi:

2023. - Naslovni asistent, Katedra za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Članstva:

Od 2009. Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Zagreb

Od 2009. Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Zagreb

Od 2014. član Radne skupine za izradu smjernica u laboratorijskoj dijagnostici autoimunih bolesti, Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

2013. – 2015. član organizacijskog odbora 8. Kongresa Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (Rijeka, 22. – 26. rujan 2015.)

2014. – 2018. član Povjerenstva za odličja, Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

Od 2018. član Europskog registara specijalista laboratorijske medicine (Europska federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu)

Od 2018. član EASI (The European Autoimmunity Standardisation Initiative) tim Hrvatska

Od 2019. Hrvatsko imunološko društvo, Rijeka

Od 2020. Hrvatsko društvo fiziologa, Zagreb

Od 2019. – 2023. suradnica – doktorandica na projektu prof. dr. sc. Gordane Laškarin pod nazivom „Aktivacija makrofaga u bolesnika s osteoartritisom“ (financijska potpora Sveučilišta u Rijeci Uni-ri-biomed-18-110).

Od 2024. - suradnica na projektu doc. dr. sc. Božene Ćurko-Cofek pod nazivom „Imunometabolička uloga biogenih lipida u osteoartritisu“ (financijska potpora Sveučilišta u Rijeci uniri-iskusni-biomed-23-268).

Sudjelovanje na domaćim i međunarodnim stručnim skupovima:

- IXth EFCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry: New trends in classification, diagnosis and management of thyroid diseases; Dubrovnik, Hrvatska, 24.-25.10.2009.
- 21. Simpozij hrvatskog društva medicinskih biokemičara: Laboratorijska dijagnostika u transplantacijskoj medicini, Zagreb, Hrvatska, 14.5.2010.
- Simpozij- Abbott Diagnostics; Beli Manastir, Hrvatska 12.6.2010.
- 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Istanbul, Turkey, 22-26.6.2014.
- 8. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM), Rijeka, Hrvatska, 22.-26. rujan 2015. - član organizacijskog odbora
- 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Germany, 4-10.4.2016.
- 2th Rijeka Forum on Neurodegenerative Diseases, THE CROATIAN ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS, The Department of Biomedical Sciences in Rijeka, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Hrvatska, 17. listopada 2018.
- 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal 16.-20.5. 2018.
- Advances in Rheumatoid Arthritis Diagnostics, 2019 EliA Symposium, Freiburg, Germany, 26.4.2019.
- Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Rovinj, Hrvatska, 11-12.10.2019.
- Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, online meeting, 1-2.10.2020.
- Covid-19 Messages I: Advancement in virology research- an opportunity to improve international impact of the University of Rijeka, virtual meeting, 24.11.2020.
- 8th International symposium “Health for all?!” , virtual meeting, 10.12.2020.
- 4th Rijeka Forum on Neurodegenerative Diseases – Neurodegenerative diseases and Covid-19 pandemic, virtual meeting, 10.-11.12.2020.
- 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society, Zagreb, Hrvatska, 7.-8.10.2021.
- 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 19-20, 2022.
- EULAR European Congress of Rheumatology, Copenhagen, Denmark, 1.- 4.6.2022.
- 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian physiological Society, NP Plitvička jezera, Croatia, 22.-24.9.2022.
- Upalne reumatske bolesti/ idiopatske upalne miopatije u organizaciji Hrvatskog

reumatološkog društva i Hrvatskog liječničkog zbora. Webinar, 23.2.2023.

- Physiology in Focus 2023 (SPS-FEPS 2023), Tallinn, Estonia, 14.-16.9.2023.
- 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 16-18, 2024.

Sudjelovanje na tečajevima trajne edukacije:

- Tečaj HKMB: „Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju“, Zagreb, 9. travnja 2011.
- Tečaj HKMB: „Predanalitička faza laboratorijskog rada“, Zagreb, 5. studenoga 2011.
- Tečaj HKMB: „Likvorska dijagnostika“, Zagreb, 5. svibnja 2012.
- Tečaj HKMB: „Laboratorijska dijagnostika kronične bubrežne bolesti“, Zagreb, 27. travnja 2013.
- Tečaj HKMB: „Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamopatija“, Zagreb, 15. ožujka 2014.
- Tečaj HKMB: „Multidisciplinarni pristup u dijagnostici, liječenju i praćenju bolesnika s rakom jajnika; potencijal HE4 i Roma indeksa“, Zagreb, 18. ožujka 2017.
- Serološka dijagnostika neuroloških bolesti, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Rijeka, Rijeka, Hrvatska, 5. lipnja 2018.
- Tečaj HKMB: „Pametni alati u suvremenom medicinsko-biokemijskom laboratoriju“, Zagreb, 2. ožujka 2024.

Popis kongresnih priopćenja – posterski sažeci:

- Hrabrić Vlah S, **Drvar V**. Validacija metode visoko osjetljivog TnT u serumu na analizatorima Cobas E601 i E411. Simpozij Lokus 2013. PO17.
- Hrabrić Vlah S, **Drvar V**, Bilić-Zulle L. Upućenost bolesnika o predanalitičkim čimbenicima koji utječu na mjerenje koncentracije PSA – presječno anketno istraživanje. Lokus simpozij; 2014. PO8.
- **Drvar V**, Hrabrić Vlah S, Bulat Kardum Lj, Bilić-Zulle L. Diagnostic value of tumor markers: CEA, CYFRA 21-1 and NSE in pleural effusion. Clin Chem Lab Med 2014;52(Special Suppl):S1706.
- Šupak Smolčić V, **Drvar V**, Hrabrić Vlah S, Bilić-Zulle L. The issue of rational ordering of high sensitive cardiac troponin T test in outpatients' emergency room. Clin Chem Lab Med 2014;52(Special Suppl):S1142.
- Đerek L, Tešija Kuna A, Kozmar A, **Drvar V**. Uvid u određivanje antinuklearnih antitijela (ANA) u Hrvatskoj - rezultati ankete radne grupe Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) za laboratorijsku dijagnostiku autoimunih bolesti. Biochemia Medica 2015; 25(Supp 1):C01
- **Drvar V**, Đerek L, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Detection of ANCA in patients suspected for diagnosis of systemic vasculitis using different types of assays. 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, 2016. EP07
- Đerek L, **Drvar V**, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Precision verification of ANCA immunodot assay. 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, 2016.

- Aralica M, Hrabric Vlah S, **Drvar V**. Kratka verifikacija komercijalnog HPLC testa za određivanje koncentracije 25-hidroksi vitamina D u serumu. *Biochemia Medica* 2018;28(Supp 1):S174
- **Drvar V**, Grubišić K, Bilić- Zulle L. Short method verification of anti- citrullinated peptid antibodies (anti-CCP) on IDS-iSYS analyser. 11th International Congress on autoimmunity, Lisbon, 2018. P073
- Gugo K, Juričić G, **Drvar V**. Comparisin study of four different methods for proteinase 3 and myeloperoxidase antibody detection.; Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity, 2019. Volume 12-2019.
- **Drvar V**, Ćurko-Cofek B, Legović D, Šantić V, Rukavina D, Kehler T, Laškarin G. Activation status, Toll like receptor 4 and CD91 expression of synovial tissue macrophages in patients with mature osteoarthritis. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Rovinj, 2019. P33
- Ćurko-Cofek B, Legović D, Šantić V, Rukavina D, **Drvar V**, Kehler T, Peršić V, Laškarin G. The presence NKG2A, NKG2C and NKG2D potential receptors for HSP70 in synovial tissue of patients with osteoarthritis. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Rovinj 2019. P03
- Ćurko-Cofek B, Legović D, Šantić V, Rukavina D, **Drvar V**, Kehler T, Peršić V, Laškarin G. C-type lectin receptor expressions in mature synovial tissue of patients with osteoarthritis. 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Osijek, 2019.
- Legović D, Šantić V, Rukavina D, Kehler T, Ćurko-Cofek B, **Drvar V**, Peršić V, Laškarin G. Interaction of macrophages and NK cells in mature synovial tissue of patients with knee osteoarthritis. *Reumatizam* 2019; Volumen 66 (Suppl 1).
- **Drvar V**, Ćurko-Cofek B, Legović D, Šantić V, Kehler T, Rogoznica M, Rukavina D, Laškarin G. 4-hidroxy 2-neonenal in pathogenesis of osteoarthritis. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, online meeting, 1-2.10.2020.
- Ćurko-Cofek B, **Drvar V**, Rogoznica M, Legović D, Šantić V, Kehler T, Laškarin G. M2 polarized synovial macrophages from patients with osteoarthritis keep plasticity and are able to initiate the LPS- mediated maturation program in vitro. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, online meeting, 1-2.10.2020.
- **Drvar V**, Ćurko-Cofek B, Legović D, Šantić V, Rukavina D, Kehler T, Laškarin G. 7-ketocholesterol binds toll-like receptor 4 on synovial tissue macrophages of patients with osteoarthritis and supports domination of M1 chemokine production. Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021. Trogir, Hrvatska, 2021. str. 55-55 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
- **Drvar V**, Legović D, Ćurko-Cofek B, Rukavina D, Babarović E, Kehler T, Peršić V, Laškarin G. 7-ketocholesterol-induced pro-inflammatory activation of synovial tissue macrophages in patients with knee osteoarthritis. 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society, 7.–8.10.2021., Zagreb. Program and abstract book. Poster 5; p39.
- Ćurko-Cofek B, **Drvar V**, Legović D, Šantić V, Kehler T, Laškarin G, Rukavina D. Macrophages mediate synovial tissue lymphocyte infiltration in patients with mature

osteoarthritis. 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society, 7.-8.10.2021., Zagreb. Program and abstract book. OP3; p27.

- Laškarin AM, **Drvar V**, Kehler T, Laškarin G, Gržić R, Dulčić N. IL-12/IL-23 p40 in the saliva of patients with spondyloarthritis and disc displacement reflects the inflammatory process of the intestine and supports the restriction of lower jaw movements. 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society, 7.-8.10.2021., Zagreb. Program and abstract book. Poster 10; p45.
- Rogoznica M, Laškarin AM, **Drvar V**, Gržić R, Peršić V, Kehler T. Bjelančevina toplinskog šoka 70 korelira s ograničenjem čeljusti i depresivnim poremećajem bolesnika s reumatoidnim artritisom. Reumatizam 2021 ; 68 (Supl. 1 / Suppl 1). Rovinj, Hrvatska, 2021. str. 31-32.
- Kehler T, Laškarin AM, **Drvar V**, Laškarin G, Peršić V, Gržić R, Dulčić N. Stupanj ograničenja funkcije čeljusti u bolesnika s aksijalnim spondiloartritisom i pomakom diska pozitivno korelira s koncentracijom matriksmetaloproteinaze-3 u slini . 23. godišnji kongres reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. U: Reumatizam. 2021 ; 68 (Supl. 1 / Suppl 1). Zagreb, 2021. str. 44-44.
- **Drvar V**, Legović D, Ćurko-Cofek B, Laškarin G. Inflammatory characteristics of peripheral blood lymphocytes from patients with osteoarthritis. Science and Us, 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 19-20, 2002. Book of Abstracts/ Šutić Udović I, Knežević M, Viduka I (ur.). Rijeka: University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, 2022. p32-33, OP8.
- Laškarin AM, **Drvar V**, Kehler T, Gržić R, Dulčić N. Temporomandibular disorders in patients with spondyloarthritis. Science and Us, 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 19-20, 2002. Book of Abstracts/ Šutić Udović I, Knežević M, Viduka I (ur.). Rijeka: University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, 2022. p95-96, P23.
- Rogoznica M, Laškarin AM, **Drvar V**, Peršić V, Kehler T. Physical symptoms, degree of anxiety and depression correlate with the concentration of HSP70 in the saliva of patients with rheumatoid arthritis. Science and Us, 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 19-20, 2002. Book of Abstracts/ Šutić Udović I, Knežević M, Viduka I (ur.). Rijeka: University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, 2022. p89-90, P20.
- **Drvar V**, Legović D, Ćurko-Cofek B, Rukavina D, Babarović E, Kehler T, Persic V, Laskarin G. Oxysterol 7-ketocholesterol can re-program synovial tissue macrophages and support M1 polarization. Annals of the Rheumatic Diseases Vol. 81, Suppl. 1, June 2022. POS0407.
- Kehler T, Uravić Bursać I, **Drvar V**, Persic V, Laskarin G. Monocyte chemoattractant protein-1 in patients with psoriatic spondyloarthritis correlates with components of patient functional status. EULAR European Congress of Rheumatology, Copenhagen, Denmark, June 1-4, 2022. Annals of the Rheumatic Diseases Vol. 81, Suppl. 1, June

2022. AB0115.

- Laškarin AM, **Drvar V**, Babarović E, Kehler T, Laskarin G, Dulčić N. Diagnostic accuracy of salivary matrix- metalloproteinase-3 to diagnose anterior disc displacement in temporomandibular joints in patients with axial spondyloarthritis. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian physiological Society. NP Plitvička jezera, Croatia, September 22-24, 2022. Program and Abstract book, p55-55.
- **Drvar V**, Laškarin AM, Peršić V, Kehler T. Correlation of fecal calprotectin with salivary inflammatory markers. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian physiological Society. NP Plitvička jezera, Croatia, September 22-24, 2022. Program and Abstract book, p125-125, P73.
- Ćurko-Cofek B, Legović D, **Drvar V**, Laskarin G, Čanadi Jurešić G. Characterization of lipids in osteoarthritis patients. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian physiological Society. NP Plitvička jezera, Croatia, September 22-24, 2022. Program and Abstract book. p134-134, P79.
- Uravić Bursać I, **Drvar V**, Kehler T, Peršić V, Laskarin G. Interrelationship of monocyte chemoattractant protein-1 and parameters of diastolic dysfunction in patients with psoriatic arthritis. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian physiological Society. NP Plitvička jezera, Croatia, September 22-24, 2022. Program and Abstract book. p133-133, P78.
- Laskarin G, Laškarin AM, **Drvar V**, Peršić V, Kehler T. Usporedba kliničkih, laboratorijskih i radioloških značajki između bolesnika s HLA-B44+ spondiloartritisom i HLA-B27+ spondiloartritisom. Reumatizam 2022;69 (Supl 1/Suppl 1):45–65, p47.
- Hrabrić Vlah S, **Drvar V**. Aggressive IgD lambda multiple myeloma (IgDλ MM): a case report. Biochemia Medica 2022;32(Suppl 1):S1–S235, p175.
- Hrabrić Vlah S, **Drvar V**. Parainfectious encephalitis in a COVID-19 patient - case report. Biochemia Medica 2022;32(Suppl 1):S1–S235, p193.
- Dozet M, Laškarin AM, **Drvar V**, Gržić R; Špalj S, Kovačević Pavičić D. Povezanost biomarkera slin i seruma oboljelih od reumatoidnog artritisa s temporomandibularnim poremećajima. Zbornik radova 6. međunarodnog kongresa Hrvatskog društva za stomatološku protetiku "Novi izazovi u stomatološkoj protetici" / Kovačić, Ines (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za stomatološku protetiku, 2023. str 31-31. P
- Laskarin AM; Špalj S, **Drvar V**, Babarovic E, Kehler T; Laškarin G, Dulcic N. Diagnostic accuracy of salivary interleukin-23 to diagnose internal derangement of temporomandibular joints in patients with spondyloarthritis. Physiology in Focus 2023 (SPS-FEPS 2023), 14-16.9.2023, Tallinn, Estonia. Poster Presentations. Acta Physiol, 239: e14044. p15-16.
- Grubišić K, Ogrizović Ban T, **Drvar V**. Klinička povezanost Ro52 (TRIM21) antitijela sa sistemskim upalnim bolestima. Knjiga Sažetaka 5. Kongresa SRMLD 2023. 14-19.9.2023, Zagreb, Hrvatska. P10. p85.
- Mirić F, **Drvar V**, Novak S. Značenje anti-Ku protutijela u dijagnostici i praćenju sustavnih autoimunskih bolesti- iskustvo jednog centra. Reumatizam 2023;70(Supl 1/Suppl 1).

- **Drvar V.** Klinička vrijednost laboratorijskih testova za reumatološke bolesti. 4. Riječki dani primarne zdravstvene zaštite, „Bolesnik s reumatološkim bolestima u PZZ – izazovi komorbiditeta“, Rijeka, Hrvatska, 1.–2.12.2023. Knjiga sažetaka katedre za obiteljsku medicinu, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci/ Prepelec AM, Šutić I, Popović B (ur.). p22-25.
- Đerek L, Crnogorac M, Tešija Kuna A, **Drvar V**, Kukuruzović Živković K, Ana Strižić A, Horvatić I, Stančin N. Comparison of five different reagents for MPO and PR3 antibodies determination. 21st International Vasculitis Workshop. Barcelona, Spain, April 7-10.2024. Abstract book p501. P-236.
- **Drvar V**, Čanadi Jurešić G, Legović D, Laškarin G, Ćurko-Cofek B. Lipid profile and lipid peroxidation in knee osteoarthritis patients. Science and Us, 1nd Biomedicine and Health PhD Students Congress with international participation. University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, May 16-18, 2024. Book of Abstracts/ Bračun I, Krstanović F, Medved M, Materljan J (ur.). Rijeka: University of Rijeka, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia, 2024. p94-95, P15.
- Mirić F, Ahel Pavelić T, **Drvar V**, Novak S. Clinical features of patients with antisyntetase syndrome- retrospective single centre analysis. 14th International Congress on Autoimmunity. Ljubljana, Slovenia, May 17-20, 2024. Abstract E-book. EV252/ #527.
- Đerek L, Tešija Kuna A, **Drvar V**, Kukuruzović Živković K, Stančin N. Comparison of five different reagents for dsDNA antibodies determination. 14th International Congress on Autoimmunity. Ljubljana, Slovenia, May 17-20, 2024. Abstract E-book. EV271/ #838.
- Mirić F, Vurić K, Ahel Pavelić T, **Drvar V**, Zekić T, Novak S. Klinička obilježja pacijenata s antisintetaznim sindromom- iskustva jednog centra. Reumatizam 2024;71(Supl 1/Supl 1):14–15.
- Đerek L, Tešija Kuna A, **Drvar V**, Kukuruzović Živković K, Crnogorac M, Juričić G, Stančin N. Is it possible to harmonize anti-dsDNA antibodies? Comparison of six different reagents for anti-dsDNA antibodies determination. Biochemia Medica 2024;34(Supl 1):S1–S144. P G-01.

Stručni i znanstveni radovi:

- Tešija Kuna A, Đerek L, Kozmar A, **Drvar V**: Current practice in laboratory diagnostics of autoimmune diseases in Croatia. Survey of the Working group for laboratory diagnostics of autoimmune diseases of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochemia Medica 2016. 26(3):376-394.
- Tešija Kuna A, Đerek L, **Drvar V**, Kozmar A, Gugo K. Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. Biochem Med (Zagreb). 2021 Jun 15;31(2):020502.
- **Drvar V**, Ćurko-Cofek B, Karleuša L, Aralica M, Rogoznica M, Kehler T, Legović D, Rukavina D, Laskarin G. Granulysin expression and granulysin-mediated apoptosis in the peripheral blood of osteoarthritis patients. Biomed Rep. 2022 May;16(5):44.

- Bursać Uravić I, Kehler T, **Drvar V**, Babarović E, Pejčinović VP, Baršić AR, Peršić V, Laskarin G. Predictive Value of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Development of Diastolic Dysfunction in Patients with Psoriatic Arthritis. *Dis Markers*. 2022 Jun 3;2022:4433313.
- **Drvar V**, Legović D, Čanadi Jurešić G, Ćurko-Cofek B, Kehler T, Laskarin AM, Nemčić E, Gordana Laskarin G. Possible immune mechanisms initiated by 7-ketocholesterol that contribute to synovial oxidative stress and inflammation. *Medical Hypotheses*. **175** (2023), 111078, 6.