



Sveučilište u Rijeci

MEDICINSKI FAKULTET

Zdravstveno i ekološko inženjerstvo

SANDRA RUSAC-KUKIĆ

**ZNAČENJE MOLEKULARNIH OBRAZACA POVEZANIH
S OŠTEĆENJEM TKIVA PROTEINA VISOKE
POKRETLJIVOSTI SKUPINE B1 I PROTEINA S100A8/A9
TE NJIHOVA RECEPTORA ZA NAPREDNE
GLIKACIJSKE PROIZVODE U SERUMU BOLESNIKA S
OSTEOARTRITISOM KOLJENA I KUKA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2025.



Sveučilište u Rijeci

FACILTY OF MEDICINE

Health and environmental engineering

SANDRA RUSAC-KUKIĆ

**Significance of Damage-Associated Molecular
Patterns with High Mobility Group B1 and S 100 A8 /
A9 Proteins, and Their Receptors for Advanced
Glycation End Products in the Serum of Patients
with Knee and Hip Osteoarthritis**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2025.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom i u Klinici za ortopediju i traumatologiju Kliničke bolnice Dubrava te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rebro, Zagreb, pod vodstvom izv. prof. prim. dr. sc. Dubravke Bobek, dr. med., spec. fizikalne i rehabilitacijske medicine, subspec. reumatologije i prof. dr. sc. Tatjana Kehler, dr.med. spec. fizikalne i rehabilitacijske medicine, subspec. reumatologije u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Zdravstveno i ekološko inženjerstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

Mentor: prof. dr.sc. Tatjana Kehler

Prof. dr. sc. Tatjana Kehler, dr. med. specijalista je fizikalne i rehabilitacijske medicine. Obrazovanje doktora medicine stekla je na studiju medicine gdje je diplomirala 1982.g na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Na istom fakultetu 1984. g upisuje poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije koji završava 1986. g te stječe zvanje magistra znanosti. Pohađa poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvena Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci i 2003. stječe zvanje doktora znanosti.

Specijalistički staž započinje 1995. g u Thalassotherapia Opatija - Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma te 2000. godine nakon položenog specijalističkog ispita postaje specijalista fizikalne i rehabilitacijske medicine. Uži specijalist reumatologije postaje 2005. godine nakon polaganja ispita iz uže specijalizacije. Svojestvo pročelnice Katedre za Fizioterapiju na Fakultetu zdravstvenih studija - Sveučilišta u Rijeci obnaša od 2015. godine.

Prof. dr. sc. Tatjana Kehler je djelatnik Thalassotherapie Opatija - Specijalne bolnice za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci gdje sve do danas obnaša niz zapaženih profesionalnih funkcija. Predstojnica je Klinike za fizikalnu medicinu i reumatologiju u specijalnoj bolnici Thalassotherapia Opatija.

U svojstvu profesora sudjeluje u nastavnoj, znanstvenoj i stručnoj aktivnosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Aktivni je sudionik mnogih stručnih tečajeva, simpozija i kongresa. Autor je mnogobrojnih znanstvenih članaka i poglavlja u knjigama te sudjeluje na više znanstvenih projekata.

Komentor: Izv. prof. prim. dr. sc. Dubravka Bobek

Izv. prof. prim. dr. sc. Dubravka Bobek specijalist je fizikalne medicine i reumatologije. U periodu od 1992.-1998. završila je Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, a od 1998.-2000. znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Svoj liječnički put započela je pripravničkim stažom u DZ Peščenica Zagreb u periodu od 1998 do 1999 godine, potom je u DZ Sesvete od 2000.- 2003. radila kao liječnik OM.

2003.-2007. specijalizant iz fizikalne medicine i rehabilitacije za KB Dubrava. 2007. položila specijalistički ispit iz fizikalne i rehabilitacijske medicine. 2005.-2006. stručni poslijediplomski studij „Fizikalna i rehabilitacijska medicina“ .

1998.-2000. znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

2002. obranila znanstveni magistarski rad pod nazivom „Značenje CD30 na limfocitima u infiltratu akutne faze atopijskog dermatitisa“ te stekla akademski stupanj magistra znanosti.

2012. položila subspecijalistički ispit iz reumatologije.

2011./2012. završila treću godinu doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“,

2012. obranila temu disertacije „Uloga alarmina HMGB1, S100A12 i njihova receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu“. Od

2013. do danas pročelnica Centra za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom u KB Dubrava. 2007. predavač na poslijediplomskom studiju Fizikalna medicina i rehabilitacija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, 2010. godine izabrana u nastavno zvanje predavača kao naslovno zvanje u području, biomedicine i zdravstva, polje kliničke medicinske znanosti, grana fizikalna medicina i rehabilitacija. U znanstveno znanje docenta izabrana je ? da bi? Postala izvanredna profesorica. Kao profesorica djeluje i na preddiplomskom sveučilišnom studiju Fizioterapije.

Objavila 55 stručnih i znanstvenih radova. Sudjeluje aktivno na domaćim i međunarodnim stručno-znanstvenim skupovima.

Zahvala

Sveučilište u Rijeci

Medicinski fakultet

Poslijediplomski studij – Zdravstveno i ekološko inženjerstvo

Doktorski rad

ZNAČENJE MOLEKULARNIH OBRAZACA POVEZANIH S OŠTEĆENJEM TKIVA PROTEINA VISOKE POKRETLJIVOSTI SKUPINE B1 I PROTEINA S100A8/A9 TE NJIHOVA RECEPTORA ZA NAPREDNE GLIKACIJSKE PROIZVODE U SERUMU BOLESNIKA S OSTEOARTRITISOM KOLJENA I KUKA

SANDRA RUSAC-KUKIĆ

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Klinički bolnički centar Rijeka, Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma Thalassoterapia Opatija

Osteoarthritis (OA) je najčešći artritis koji može zahvatiti sinovijalni zglob. Ranije se smatralo da je povezan s mehaničkim trošenjem zglobne hrskavice. Novije spoznaje upućuju na to da je OA upalna bolest. U ovom istraživanju proučavala se serumska razina molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva: proteini visoke pokretljivosti skupine B1/HMGB1/ i proteini S100A8/9 te njihov topljiv receptora za napredne glikacijske proizvode sRAGE. Cilj istraživanja je ispitati koncentraciju HMGB1 i S100A8/A9 i sRAGE u venskoj krvi bolesnika s OA zgloba koljena i kuka. Broj predviđenih ispitanika je 100, oba spola, s dijagnozom od blagog do teškog stupnja OA koljena i kuka. Istraživanje će se provesti u KB Dubrava, te u KBC-u Zagreb. Znanstveni doprinos ogleda se u proučavanju patofiziologije OA kao upalnog procesa i traženju ciljane molekule uzročnika upale kod pacijenata s OA koljena i kuka, dok je praktičan doprinos u traženju medikamentoznog liječenju oboljelih od OA čijim otkrićem bi se mogao upori proces razvoja OA.

(Stranica 104, slika 5, tablica 4, literarnih navoda 203, jezik izvornika Hrvatski)

Ključne riječi: Koljeno; Kuk; Molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva, Osteoarthritis; Proteini visoke pokretljivosti skupine B1 - HMGB1; Proteini S100A8/A9; Receptor za napredne glikacijske proizvode - sRAGE; Serum; Upala

Mentori : Prof. dr.sc. Tatjana Kehler, dr.med

Izv. prof. prim. dr. sc. Dubravka Bobek, dr. Med

Ocjenjivači : prof.dr.sc. Nadica Laktašić Žerjavić

prof.dr.sc Tea Schnurrer Luke -Vrbanić

prof. dr.sc. Srđan Novak

University of Rijeka

Doctoral thesis

Faculty of Medicine

Doctoral study – Health and environmental engineering

SIGNIFICANCE OF DAMAGE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS WITH HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN B1 AND PROTEIN S100 A8 / A9 AND THEIR RECEPTORS FOR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS IN SERUM OF PATIENTS WITH KNEE AND HIP OSTEOARTHRITIS

SANDRA RUSAC-KUKIĆ

Faculty of medicine University of Rijeka, Clinical Hospital centre Rijeka and Special hospital for medical rehabilitation of heart, lung and rheumatism Thalassoterapia Opatija

Osteoarthritis (OA) is the most common arthritis that can affect the synovial joint. It was previously thought to be associated with mechanical wear of articular cartilage. Recent findings suggest that OA is an inflammatory disease. In this study, the serum level of molecular patterns associated with tissue damage would be studied: high mobility proteins of group B1 / HMGB1 / and protein S100A8 / 9 and their soluble receptors for advanced glycation products sRAGE. The aim of the study was to examine the level of HMGB1, S100A8/A9 and sRAGE in the venous blood of patients with OA of the knee and hip joint. The number of predicted subjects is more than 100, both sexes, with a diagnosis of mild to severe OA of the knee and hip. The research will be conducted in KB Dubrava, and in KBC Zagreb. The scientific contribution is reflected in the study of the pathophysiology of OA as an inflammatory process and the search for the target molecule of inflammation in patients with knee and hip OA, while the practical contribution is in the search for drug treatment of OA patients whose discovery could slow the development of OA.

(Page 104, figures 5, tables 4, references 203, original in Croatian)

Key words: Damage - associated molecular patterns; high mobility group proteinB1 – HMBG1; Hip; Inflammation; Knee; Osteoarthritis; Protein S100A8/A9, Serum

Supervisor: Prof. Tatjana Kehler, MD

Assoc. prof. prim. dr. sc. Dubravka Bobek, MD

Reviewers: prof. dr. sc. Nadica Laktašić Žerjavić, MD

prof. dr. sc. Tea Schnurrer - Luke - Vrbančić, MD

prof. dr. sc. Srđan Novak, MD

SADRŽAJ:

1. Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1. Osteoartritis	3
1.2. Klasifikacija osteoartritisa.....	6
1.3. Osteoartritis zgloba koljena	9
1.4. Osteoartritis zgloba kuka.....	12
1.5. Imunološki aspekt u razvoju osteoartritisa	16
1.6. Neurološki aspekt osteoartritisa	19
1.7. Potencijalni biomarkeri osteoartritisa.....	21
1.8. Alarmini	23
1.9. Protein visoke pokretljivosti skupine B1-HMBG1.....	26
1.10. Protein S100A8/9	30
1.11. Topljiv receptor sRAGE	33
2. Cilj i hipoteze istraživanja	36
3. Uzorci i metode	37
3.1. Materijali	37
3.1.1. Ispitanici	37
3.1.2. Ispitivani uzorak - periferna venska krv	38
3.2. Metode	39
3.2.1. Analiza općih i imunosnih laboratorijskih pokazatelja.....	39
3.2.2. Analiza molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva HMBG1 i S100A8/A9 receptora sRAGE u serumu.....	39
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina -Bradford metoda	39
3.2.4. Sendvič ELISA proteina u krvi	43
3.2.5. EIA metoda analize CRP u krvi	45
3.2.6. Statističke metode	47
4. Rezultati.....	48
5. Rasprava	56
6. Zaključci	73
7. Prilog kratice.....	75
8. Literatura	78
9. Životopis.....	104

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Osteoarthritis (OA) se klasificira kao neupalni artritis no dihotomija između upalnog i degenerativnog artritisa postaje sve manje jasna s prepoznavanjem obilja tekućih imunoloških procesa unutar OA zgloba i sinovije. Sinovitis je upala sinovijalne membrane i karakteristična je za klasične upalne artritise i sve se više priznaje prisutnost sinovitisa u značajnom udjelu pacijenata s primarnim OA. Klinički OA nije jedna bolest, nego konačni "zajednički put" koji je sekundaran mnogim predisponirajućim čimbenicima, osobito starosti, traumi u zglobovima, promijenjenoj biomehanici i pretilosti [Sokolove i sur., 2013]. OA se dugo smatrao "habanjem" koji dovodi do gubitka hrskavice. Istraživanja da mnogi topljivi posrednici kao što su citokini ili prostaglandini mogu povećati proizvodnju matričnih metaloproteinaza od strane hondrocita doveo je do prvih koraka "upalne" teorije te je sinovitis prihvaćen kao kritična značajka OA te uzimanje stanja u obzir kao pokretača procesa u OA. Eksperimentalni podaci ukazuju da subhondralna kost može imati značajnu ulogu u procesu OA, kao mehanički prigušivač te izvor upalnih medijatora koji su uključeni u proces OA i degradaciju dubokog sloja hrskavice [Berenbaum i sur., 2013]. Sustav urođene imunosti prepoznaje endogene molekule koje stvaraju i/ili oslobađaju oštećene i umiruće stanice. Nazivamo ih molekularnim obrascima povezanim s oštećenjem tkiva / engl. *damage* – associated molecular patterns, DAMP/ i mogu ukazati na sterilno oštećenje stanica koje može nastati djelovanjem kemijskih toksina, opeklina, traume ili smanjenje opskrbe kisikom [Santoni i sur., 2015]. Intracelularni proteini oslobođeni iz stresnih, oštećenih ili nekrotičnih stanica mogu djelovati kao treći potencijalni izvor DAMP-ova. DAMP-ovi, normalno sekvestrirani unutar stanice, mogu signalizirati imunološkom sustavu kada se oslobodi aktiviranje istog te uključuju i proteinsku skupinu 1 visoke mobilnosti (HMGB-1) [Taniguchi i sur., 2018; Foell i sur., 2007]. "Toll like" receptor (TLR-s) i receptori za napredni glikacijski kraj (RAGE) su aktivirani u upalnim i kataboličkim procesima oštećenja hrskavice zgloba. S100A4, A8, A9 i A11 su također identificirani kao markeri upalnog procesa kroz aktivaciju sRAGE i TLR-s [Less i sur., 2015], te potencijalna uloga S100 obitelji proteina u upali povezani s OA. [Van Lent i sur., 2012]. Sinoviociti nalik fibroblastu ključni su čimbenici u patogenezi sinovitisa kod reumatskih bolesti pa su terapije temeljene na signalima farmakoloških poremećaja interleukina korisne za liječenje i ukazuju na aktivaciju S100A8 i S100A9 u procesu OA [Carrión i sur., 2013]. Sinovitis je očit u značajnoj subpopulaciji bolesnika s OA, povezan je s

razvojem patofiziologije a matične stanice masnog tkiva inhibiraju uništavanje zglobova u eksperimentalnoj OA izazvanoj kolagenazom [Schelbergen i sur., 2014]. Inverzivna povezanost sa strukturnim poremećajima i pozitivna povezanost s brzinom sedimentacijom eritrocita mogu odražavati upalne sinovijalne procese u bolesnika s OA prije nego što se pojave strukturne nepravilnosti [Mahler i sur., 2015]. HMGB-1 je prekomjerno izražen i koncentriran u sinovijalnoj membrani bolesnika s OA koljena. Povećana razina HMGB-1 u sinovijalnoj tekućine je povezana s težinom sinovitisa, boli i svakodnevnim aktivnostima u bolesnika s OA koljena, pa HMGB-1, kao proupalni citokin, može imati presudnu ulogu u progresiji OA koljena [Ke i sur., 2015]. Imunološki parametri značajni su u dijagnosticiranju OA više nego li biokemijski i fiziološki parametri [Ashraf i sur., 2015], a S100A8 inducira signalni put u makrofazima i mišićnim zglobovima koljena. S100A8 i S100A9 reguliraju sinovijalnu aktivaciju, oštećenje hrskavice i stvaranje osteofita kod OA [Van den Boch i sur., 2016]. Provedeno je istraživanje HMGB1 i RAGE kod osteoartritisa koljena (KOA) i njegov klinički značaj. Ukupno 108 sinovijalnih tkiva odabranih od bolesnika s KOA uključeno je u eksperimentalnu skupinu. U kontrolnu skupinu uključeno je 75 sinovijalnih tkiva zglobova koljena, izabranih od bolesnika koji su klinički i patološki potvrđeni bez lezije zglobova. Rezultati su pokazali da izraz proteina i mRNA, HMGB1 i RAGE su povećani kod bolesnika s KOA što sugerira da su oni uključeni u KOA [San i sur., 2016]. Nadalje, S100A8 / A9 pogoršava stvaranje osteofita u eksperimentalnom OA s visokom sinovijalnom aktivacijom i može se upotrijebiti za predviđanje napredovanja osteofita u ranoj simptomatskoj OA [Scheldbergen i sur., 2016]. I kristali monosodium, koji su ključni stimulatori upale kod gihta, mogu potaknuti OA patologiju putem aktivacije upale koja dovodi do oslobađanja interleukina i drugih DAMP –ova [Ma i sur., 2017]. Defensini su još jedna skupina DAMP-ova koja je povezana s kataboličkim odgovorom u OA jer je povećana proizvodnja β -defensina u hrskavici i meniscima zahvaćenim OA. Usporedbom DAMP-ova između OA zgloba koljena i kuka je dobivena značajna razlika u razinama DAMP-a izraženih u zglobovima koljena u odnosu na zglob kuka [Pellieter i sur., 1991]. Povišene razine DAMP sugeriraju razliku u temeljnoj patogenezi OA u koljenu i kuku te izdvajaju DAMP kao potencijalne terapijske ciljeve za OA [Rosenberg i sur., 2017]. Studija na miševima polazila je da su monociti dominantne stanice prisutne u upalnoj sinoviji tijekom OA te da indukcija OA lokalno dovodi do snažno povišene ekspresije S100A8 / A9 i povećanog priliva monocita iz koštane srži u sinoviji [Cremers i sur., 2017]. Višestruke funkcije proteina HMGB otkrivaju složenu ulogu ovih proteina kao urođenih i endogenih regulatora upale zglobova i njihove

kooperativne uloge u hipertrofiji hrskavice kao i u održavanju homeostaze zgloba tkiva [Taniguchi i sur., 2018]. Razina DAMP-ova u serumu značajno je povišena u bolesnika s OA šake, bez obzira na erozivnost bolesti [Addimanda i sur., 2019] i koncept upale je važan faktor u patogenezi OA, posebno središnja uloga koju DAMP-ovi imaju u pokretanju i održavanju niskog stupnja upalnog odgovora u OA [Van den Boch i sur., 2019]. Do sada nisu provedena istraživanja u Hrvatskoj o DAMP-ova u OA kuka i koljena. Jedino istraživanje iz 2012. o značenju HMGB1 i S100A12 te njihove receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu, a koje je pokazalo statističko značajno povišene serumske koncentracije protuupalnog alarmina HMGB1 u JIA u odnosu na kontrolnu skupinu (Bobek D., 2012) i [Wang i sur., 2020]). Iako nemamo tretmana za zaustavljanje ili sprečavanje OA, postignut je napredak u razumijevanju patofizioloških procesa. Trenutno shvaćanje upale stavlja urođeni imunitet u središte ovog procesa. PRR-ovi /patološko prepoznatljivi receptori/, koji prepoznaju DAMP i izazivaju upalu, ključni su elementi urođenog imuniteta. Akumulacija DAMP-ova s godinama ističe važnost proučavanja PRR-a (posebno TLR-a i RAGE-a) kao potencijalnih terapijskih ciljeva u OA. Nekoliko važnih liganda RAGE se povećava ili akumulira s godinama, kao što su HMGB1, S100, promičući na taj način povećane niske stupnjeve, sterilne upale s godinama [Millerand i sur., 2019].

1.1 Osteoartritis

Osteoartritis (OA) je jedan od vodećih uzroka invaliditeta u populaciji starije dobne skupine. To je bolesno stanje koje može zahvatiti sve zglobove, a karakterizira ga upala i oštećenje zglobne hrskavice. Vodeći simptom je bol u zahvaćenim zglobovima, a kao posljedica cijelokupnog patološkog procesa je ograničena pokretljivost [Zhou i sur., 2021]. Evolucijskim promjenama i razvojem uspravnog hoda na dvije noge značajno se povećala učestalost osteoartritisa nosivih zglobova: kukova, koljena, zigapofizealnih zglobova kralježnice. Međutim, OA može nastati na svakom sinovijalnom zglobu, ali se to dešava u značajno manjoj učestalosti u odnosu na nosive zglobove [Brygidai sur., 2015]. Iako postoji značajan napredak na osobnoj, ali i ekonomskoj i društvenoj sferi života, još uvijek se bilježi trend zanemarivanja simptoma OA. To ima za posljedicu vrlo često postavljanje dijagnoze u uznapređovalom stadiju bolesti. Ne postoje globalni strateški planovi za OA kao iznimno učestalu nezaraznu bolest. Međutim OA je često udružen s drugim bolestima kao što su dijabetes, srčane bolesti i problemi mentalnog zdravlja te može povećati stopu morbiditeta i

mortaliteta koja je povezana s tim bolestima [Veronese i sur., 2016]. U cijelom svijetu od OA boluje više od 500 milijuna ljudi, što predstavlja oko 7% populacije, ali valja naznačiti da su žene neproporcionalno pogođene ovim stanjem [Hunter i sur., 2020]. Osteoartritis predstavlja jedan od vodećih uzroka invaliditeta što ima reperkusije na izvor društvenog troška. U odnosu na prethodno desetljeća, sada bilježimo trend sve starije i sve pretilije populacije te je ova bolest još rašireniji s obzirom da prvenstveno zahvaća osobe starije životne dobe [Hunter i sur., 2020]. Kod svakog pojedinca može varirati klinička slika, pa tako i intenzitet bolova koji ne mora uvijek odgovarati stadiju OA. Bez obzira na početne simptome bolovi često postaju sve teži i češći što s vremenom značajno iscrpljuje bolesnike. Stopa progresije bolesti je varijabilna kod svakog pojedinca. Najčešći klinički simptomi su bol u zahvaćenom zglobu koja se postupno pojačava te dovodi do slabije aktivnosti, ukočenosti i oticanja zgloba. To je bolest koja predstavlja začarani krug, jer bol ograničava pokrete i aktivnost osobe te ih prisiljuje na dugotrajno sjedenje ili mirovanje što s vremenom dovodi do još jače boli [Hsu i sur., 2023]. S obzirom da je OA iznimno polimorfna bolest te se javlja u različitim manifestacijama teško ga je rigorozno definirati.

Promatranjem postojećih definicija OA često nailazimo na opis kako je riječ o heterogenom stanju koje obilježavaju različiti simptomi i znakovi bolesti, a koji su posljedica poremećenih anatomskih odnosa što podrazumjeva promjene u podležućoj kosti i narušen integritet zglobne hrskavice, najčešće na rubovima zgloba. Etiopatogeneza OA do sada nije u potpunost razjašnjena, postoji više teorija njegovog nastanka koje obuhvaćaju složenu međusobu interakciju između mehaničkih sila, staničnih, biokemijskih, imunoloških i genetskih čimbenika [Kohn i sur., 2016]. Posljednjih godina stekli smo važne uvide u uzrok i patogenezu boli kod osteoartritisa [Hunter i sur., 2020]. Patofiziološki mehanizam OA zasnovan je na progresivnom oštećenju i različitom obimu gubitka zglobne hrskavice (Slika 1). Početna faza bolesti često je asimptomatska i karakterizirana izraženim kompenzacijskim mehanizmima kao odgovor na ponavljajuće ozlijeđe. Nastaje proliferacija i hipertrofija hondrocita i remodeliranje subhondralna kosti. Oštećenje zglobnih struktura nije u ravnoteži s njihovim oporavkom te nastaju osteoartritične promjene, gubitak hrskavice i skleroza kosti, a u uznapredovalim stadijima sinovitis i stvaranje osteofita [Chaney i sur., 2022]. Jedan od razloga asimptomatskog početnog OA je što hrskavica nije opskrbljena živčanim vlaknima koja bi signalizirala bol, pa se ona javlja tek onda kada su bolešću zahvaćene i okolne strukture kao što su zglobna čahura i ligamenti ili pak dođe do potpunog gubitka zglobne hrskavice. Izlaganjem periosta kosti nastaje nakon kompletne degradacije zglobne hrskavice

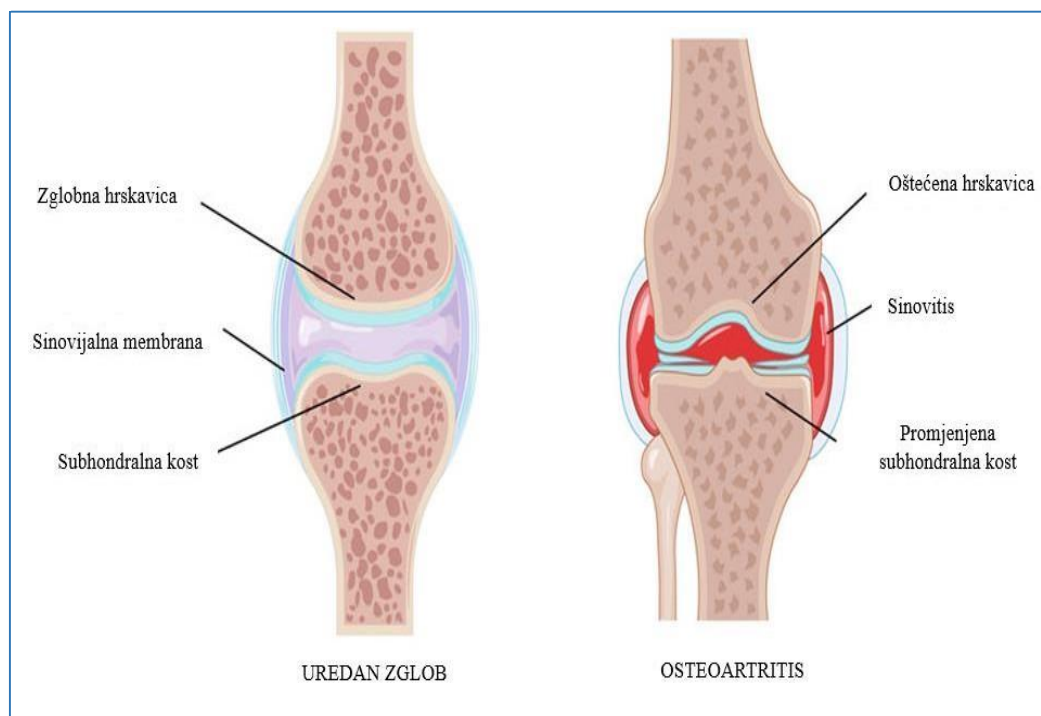
te su tada izloženi osjetni završeci živaca što OA čini bolnim sindromom [Potočki i sur 2015].

Degenerativna bolest zglobova poznata kao OA identificira se oštećenjem i zglobne hrskavice. Patogeneza OA uključuje različite čimbenike rizika kao što su dob, fizička trauma i pretilost. Međutim, novije studije pokazuju da je upala uzrokovana DAMP molekulama također značajan čimbenik u razvoju OA [Hunter i sur., 2019; Robinson i sur., 2016].

Nekoliko je čimbenika rizika povezanih s osteoartritisom (OA), uključujući dob, spol, pretilost, genetiku i veće ozljede zglobova. Češći je u osoba starijih od 75 godina, pri čemu 33% ima simptomatski i radiografski OA koljena. Oni s OA imaju više popratnih bolesti i vode više sjedilački način života. Smanjena tjelesna aktivnost može povećati stope smrtnosti prilagođene dobi do 20%. Određeni nalazi fizičkog pregleda mogu pomoći u dijagnozi, kao što je povećanje kosti kod OA koljena i bol uzrokovana unutarnjom rotacijom kuka kod OA kuka [Katz i sur., 2021].

Prekomjerna tjelesna težina i pretilost također mogu povećati pritisak na zglobove, osobito one koji nose težinu poput kukova i koljena [Huang i sur., 2020]. Pretilost je povezana s većim rizikom od osteoartritisa kuka, što znači da bi regulacija težine mogla pomoći u prevenciji i liječenju [Yuan i sur., 2023].

Otkriveno je da osteoporozna OP-a može smanjiti vjerojatnost razvoja osteoartritisa, uključujući osteoartritis koljena i kuka. To je utvrđeno Mendelovom randomizacijom (MR) [Lin i sur., 2022].



Slika 1. Prikaz anatomski urednog zgloba i promjene u zglobu zahvacene osteoartritisom
[prilagođeno prema Kohn i sur., 2016]

Dijagnoza OA prvenstveno se temelji na kliničkoj procjeni, unatoč čestoj uporabi slikovnih tehnika. Liječenje treba prilagoditi simptomima pojedinca i usredotočiti se na temeljne terapije kao što su samokontrola, obrazovanje, odgovarajuća tjelovježba i gubitak težine. Operaciju treba razmotriti samo u slučajevima kada su se manje invazivne metode pokazale neučinkovitim. Istraživači trenutno istražuju prevenciju i modifikaciju bolesti, što je dosad pokazalo obećavajuće rezultate [Hunter i sur., 2019].

Opservacijske studije ukazuju na povezanost između razine željeza i OA, što zahtijeva nove pristupe prevenciji i liječenju bolesti [Hunter i sur., 2020].

Liječenje OA prilagođeno je svakom pojedincu i može uključivati edukaciju, tjelovježbu, gubitak težine za one koji su pretili i strategije samokontrole [Hunter i sur., 2019].

OA je uobičajena kronična bolest zglobova koja vrlo često zahvaća zglobove koljena (KOA) i kuka (HOA). Uzrokovana je degeneracijom hrskavice, promjenama u kosti ispod hrskavice i upalom sluznice zgloba [Hunter i sur., 2019].

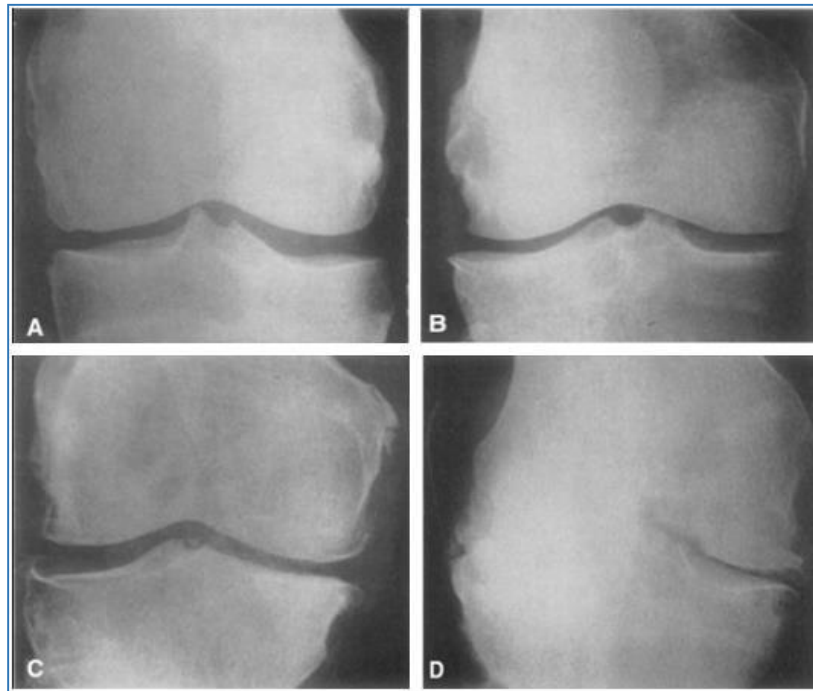
1.2 Klasifikacija osteoartritis

Ne postoje standardizirani protokoli za dobru klasifikaciju OA koji bi prikazivali detaljne promjene u razvoju bolesti i bili strukturirani na način da u kliničkoj verifikaciji OA omogućće odabir preciznog liječenja bolesti [Huang i sur., 2020]. OA predstavlja polimorfnu bolest koja obuhvaća veliki broj heterogenih stanja, a sva imaju zajedničku poveznicu narušenog integriteta zglobne hrskavice s promjenama u podležćoj kosti [Altman i sur., 1986]. Radiografija oboljelog zgloba i dalje predstavlja osnovno uporište u dijagnozi OA. Prvi pokušaj uspostave klasifikacijskog obraca pomoću radiografskih snimki za OA su 1957 godine opisali Kellgren i Lawrence (KL) [Kellgren i sur., 1957]. Klasifikacija KL OA koristi se kod kliničkog odlučivanja u odabiru načina liječenja OA, a posebno pri odlučivanju o mogućem kirurškom zahvatu zahvaćenog zgloba [Kohn i sur., 2016]. Međutim, prikaz klasifikacije u izvornom obliku po KL primjenjuje se tipično za OA koljena, jer je izvorno opisana pomoću AP radiografske snimke koljena. Pri tome je prema klasifikaciji KL svakoj AP rendgenskoj slici koljena prema opsegu OA dodijeljeno bodovanje u rasponu 0 do 4. Ovom skalom stupanj 0 je dodjeljen kod odsustva promjena u zgobu povezanih s OA, dok stupanj 4 označava promjene kod teškog OA [Braun i sur., 2012]. Izvorni opis KL klasifikacije je slijedeći:

1. **Stupanj 0 (nema radiografskih promjena povezanih za OA):** definitivno odsustvo rendgenskih promjena osteoartritisa
2. **Stupanj 1 (radiografske promjene u zgobu su dvojbene za OA):** sumnjivo sužavanje zglobnog prostora i mogućí početak stvaranja osteofita
3. **Stupanj 2 (minimalne radiografske promjene povezane s OA):** definitivno vidljivi osteofiti i moguće suženje zglobnog prostora
4. **Stupanj 3 (umjereno teške promjene povezane s OA):** srednje veliki i brojniji osteofiti, definitivno suženje zglobnog prostora, naznačena skleroza i eventualna deformacija krajeva kostiju
5. **Stupanj 4 (teške promjene povezane s OA):** prisutstvo više velikih osteofita, jako suženje zglobnog prostora, teška skleroza i deformacija krajeva kostiju

Navedena KL klasifikacija je i slikovno prikazana gdje svaka slika prikazuje određeni stupanj OA (Slika 2) [Kellgren i sur., 1957]: **Slika A:** rendgenska slika koljena koja predstavlja stupanj 1 prema KL klasifikaciji. Na slici je prikazano eventualno suženje zglobnog prostora uz dvojbenu nalaz početka stvaranja osteofita. **Slika B:** rendgenska slika koljena koja predstavlja stupanj 2 prema KL klasifikaciji. Na slici je prikazano moguće suženje zglobnog

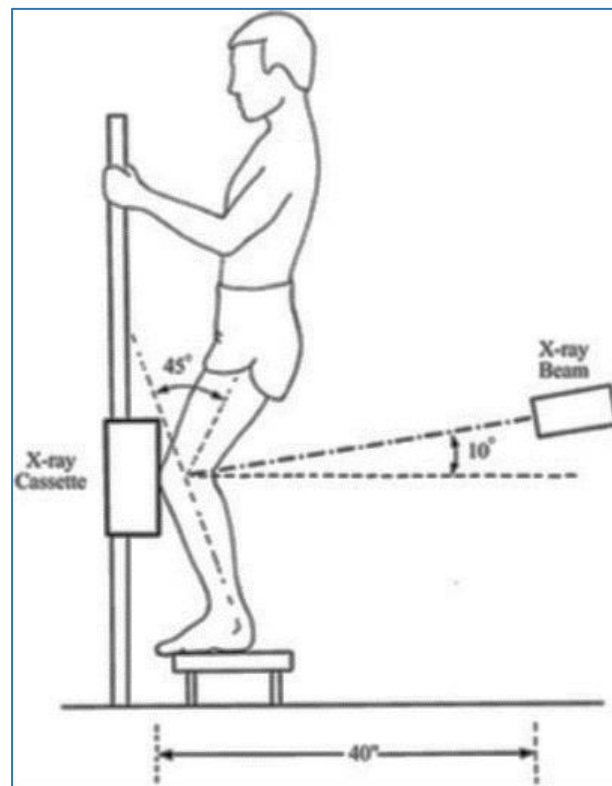
prostora i stvaranje osteofita. **Slika C:** rendgenska slika koljena koja predstavlja stupanj 3 prema KL klasifikaciji. Na slici je prikazano izraženo suženje zglobnog prostora, postojanje umjerenih osteofita kao i početna skleroza krajeva kostiju uz eventualni početak njihove deformacije. **Slika D:** rendgenska slika koljena koja predstavlja stupanj 4 prema KL klasifikaciji. Na slici je prikazan velikog osteofita uzznačajno suženje zglobnog prostora i vrlo izraženu sklerozu i deformaciju krajeva kostiju.



Slika 2. Radiografske snimke koljena prikazane u izvornom članku Kellgren-Lawrence[Kellgreni sur., 1957]

Za razliku od KL klasifikacije gdje se sa sigurnošću ne može tvrditi u kojem je opsegu radiografski nalaz istovjetan fizičkom stanju zgloba, Rosenbergova radiografska slika moguće bolje oslikava fizičku komponentu, jer oslikava središnju fleksiju femoralnog zglobnog nastavka gdje je najčešće početak degeneracije zglobne hrskavice (Slika 3). Rosenbergov pregled obuhvaća snimku s opterećenjem posteroanteriorne fleksije od 45°[Kohn i sur., 2016]. Prilikom ovakve radiografske snimke može se uočiti kako je površina femoralnih kondila postavljena da bude u kontaktu s tibialnim kondilom i na taj način se može prikazati i minimalno sužene zglobnog prostora [Rosenberg i sur., 1988]. Ova metoda je osmišljena kako bi se omogućio prikaz suženja zglobnog prostora koji se vizualizira prilikom operativnog

zahvata, a nije vidljiv na ekstenzijskom anterioposteriornj rendgenskoj slici [Bapatunde i sur., 2015].



Slika 3. Prikaz položaja bolesnika kod Rosenbergove radiografske snimke [Rosenberg i sur., 1988]

U dobivanju slika fiksnog prikaza fleksije (FFV) prednja strana natkoljenicas se postavlja u kontakt s kazetom, a u istoj ravnini trebaju stajati i vrhovi nožnih prstiju. Na taj način postičemo fiksaciju fleksije koljena neovisno o tjelesnoj građi bolesnika. Mogući različiti kut fleksije koljena kod svakog bolesnika može imati reperkusiju na vidljivost suženja zglobnog prostora što se umanjuje ovakvim položajem radiografskog snimanja [Kan i sur., 2017].

1.3 Osteoartritis zgloba koljena

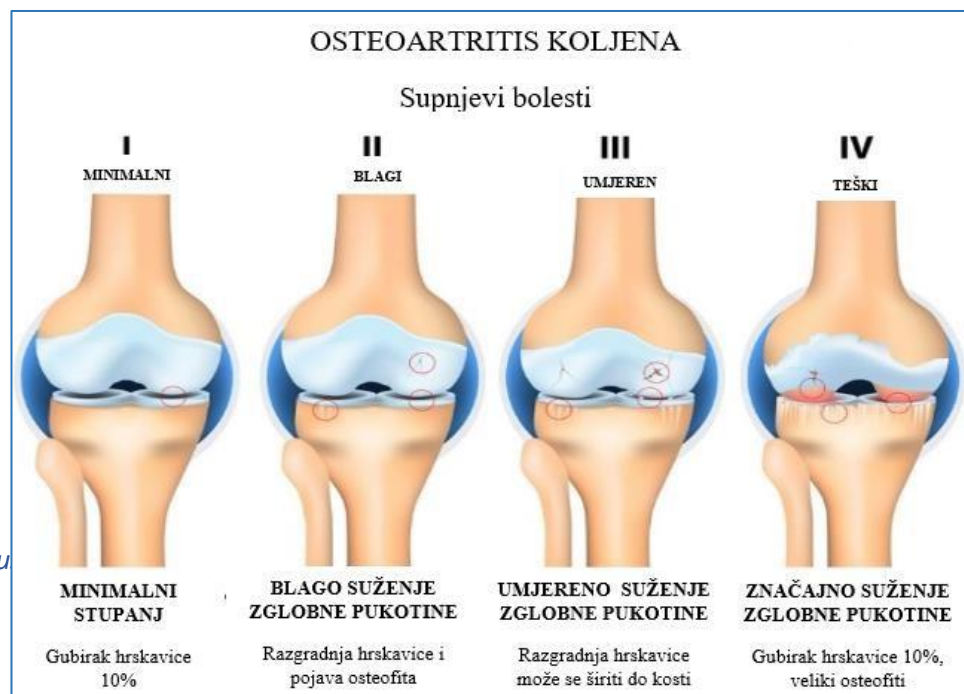
Najveći zglob u ljudskom tijelu je koljeni zglob. To je sinovijalni zglob koji se sastoji od 3 koštane strukture; distalnog djela kosti femura, proksimalnog djela kosti tibie i unutar samog

zgloba patele. Funkciju zgloba omogućuju hrskavični elementi odnosno zglobna hrskavica i menisk, zatim ligamenti, sinovija i infrapatelarni masni jastučić. Hrkavica zgloba ovisi o sinovijalnoj tekućini koju eksprimira sinovij. Sinovijalna tekućina između ostaloga ima i funkciju prehrane i podmazivanja hrskavice [Jang i sur., 2021].

Osteoartritis koljena (KOA) predstavlja kronični poremećaj koji nastaje zbog degenerativnih promjena u zglobu koljena zbog različitih stupnjeva oštećenja hijalinske hrskavice. Kada govorimo o osteoartritisu, KOA je tip artritisa koji se najčešće javlja kod osoba starijih od 65 godina, a ujedno je i vrlo česta bolest mišićno-koštanog sustava u toj dobi. Progresijom degeneracije hijaline zglobne hrskavice i sinovijalne membrane KOA postaje vodeći uzrok invaliditeta. Iako je to vrlo učestala bolest s obzirom na sve stariju populaciju kao i bilježenje iznimnog porasta pretilosti etiologija KOA nije do sada u potpunosti razjašnjena [Sun i sur., 2016].

Postoje dva tipa KOA i djelimo ga na primarni i sekundarni. Zaključiti ćemo da se radi o primarnom tipu KOA kada postoji jasno vidljiva degeneracija zglobne hrskavice, ali se to stanje ne može povezati s i jednim vidljivim razlogom nastanka. Sekundarni KOA uvijek ima uzročni vidljivi razlog koji može dovesti do degeneracije zgloba i često je posljedica različitih upalnih bolesti kao što je reumatoidni artritis (RA), nakon traume mogu u zglobu nastati abnormalne koncentracije sile kao posljedica posttraumatskih zbivanja ili postoji abnormalna zglobna hrskavica koja je više sklona degenerativnim procesima. Bez obzira na tip KOA i njegov uzrok to je progresivna bolest koja na kraju često dovodi do invaliditeta [Hsu i sur., 2023].

Sandra Ru



Slika 4. prikaz stupnjeva progresije osteoartritisa koljena [prilagođeno prema Morgan i sur., 2022]

Simptomi karakteristični za KOA su posljedica strukturnih promjena primarno oštećenja zglobne hrskavice i subhondralne kosti što dovodi do boli i otekline različitog intenziteta (Slika 4) [Jang i sur., 2021]. Međutim, osim navedenih struktura kod KOA može doći i do oštećenja drugih anatomskih struktura zgloba pa vidimo promjene na Hoffa masnom jastučiću, ligamentima, sinoviji i mišićima [Primorac i sur., 2020]. Vodeći simptom je bol koja može varirati od nelagode do značajno izražene boli koja dovodi do ograničenog raspona pokretljivosti zgloba. Oticanje i osjećaj propadanja zgloba, te različiti stupnjevi ukočenosti zgloba imaju značajan utjecaj na mogućnost izvršavanja uobičajenih radnji koje podrazumjevaju hod, penjanje po stepenicama i obavljanje kućanskih poslova [Mahir i sut., 2016].

Iako je etiopatofiziologija KOA još je uvijek nedovoljno razjašnjena, smatra se da je to bolest koja ima multifaktorsko podrijetlo. Na nastanak i razvoj KOA utječe kombinacija više različitih čimbenika. Niz poremećenih bioloških čimbenika utječe na anatomske strukture zgloba uključujući hrskavicu, sinoviju, kost, menisk, mišiće, ligamente i periartikularno masno tkivo [Katz i sur., 2020]. Važnu ulogu zauzimaju upalni i biomehanički procesi u koljenu, ali se ne može isključiti i utjecaj dobi, obiteljske anamneze, pretilosti, urođene imunosti, sinovitisa, dijabetesa, traume, operativnih zahvati korekcije prirođenih anomalija nogu, malformacije oblika zgloba i druga stanja i bolesti u organizmu. Neovisno o uzroku bolesti KOA je karakterizirana oštećenjem hijaline zglobne hrskavice, a u razvijenijim stadijima bolesti i čestim stvaranjem koštanih osteofita, sklerozom subhondralne kosti i patološkim stvaranjem subhondralnih cista [Lespasio i sur., 2017].

Istraživanjem utjecaja spola, zaključeno je da ženski u odnosu na muški spol češće pati od KOA i imaju značajno više izraženu bol i funkcionalnih ograničenja [Latijnhouwers i sur., 2023]. Ovisno o stupnju razvoja KOA razlikovati će se i simptomi povezani s momentom kretnje koljena, te će kod većih stadija bolesti simptomi biti značajnije izraženi [Hall i sur., 2017]. U nekim slučajevima simptomi bolesti osteoartritisa javljaju se u relativno mlađoj životnoj dobi [Losina i sur., 2013]. Iako je KOA bolest koja je najviše zastupljena u dobi iznad 65 godina, ukoliko postoje simptomi treba posvetiti posebnu pažnju i osigurati

simptomatsku terapiju već nakon 40 godine života [Li i sur., 2020]. Pretili osobe imaju 60% veći rizik nastanka KOA [Panuzi i sur., 2021]. Povezanost pretilosti zbog povećanog opterećenja zgloba uključuje i dodatne čimbenike razvoja bolesti kao što su povećana sklonost upalnim događajima zbog čimbenika masnog tkiva i smanjena tjelesna aktivnost [Wluka i sur., 2013]. Ako pacijent sugerira osim simptoma dijagnosticirane KOA i istodobnu bolna više mjesta treba učiniti obradu u smislu postpojanja depresije, jer će se liječenjem depresivnih stanja umanjiti i simptomi bolnosti [Zheng i sur., 2021].

Dijagnoza KOA se može postaviti na osnovu anamneze i fizikalnog pregleda. Radiogram (RTG koljenog zgloba u stajaćem položaju) je koristan u cilju prikaza strukturnih oštećenja, opsega suženja zglobnog prostora kao i postojanja osteofita. Treba naglasiti da uredan nalaz RTG koljena ne isključuje početni stadij KOA. Kada fizikalni pregled daje nalaz graničnog značenja, a RTG koljena ne pokazuje patološke promjene, s ciljem otkrivanja ranog početnog stadija KOA moguće je napraviti magnetsku rezonanciju koljenog zgloba (MRI) koja će zbog svoje visoke osjetljivosti prikazati promjene u hrskavičnoj strukturi, meniskusu, sinovijalnim strukturama i subhondralnom djelu kosti. Umjesto MRI moguće je napraviti ultrazvuk koljenog zgloba, ali s ograničenjem procjene suženja zglobnog prostora [Katz i sur., 2020].

Liječenje KOA iziskuje koncept farmakološke terapije koji će imati osnovu u odabiru pravog lijeka za određenog bolesnika u dozi koja ovisi o stadiju progresije KOA. Takav pristup bi mogao značajno ublažiti simptome KOA i povećati odgovor bolesnika na primjenjenu terapiju [Primorac i sur., 2021]. Terapiju KOA svakako treba započeti s nefarmakološkim učincima davajući posebnu pažnju edukaciji, tjelovježbi i smanjivanju tjelesne težine ako za to postoji potreba [Bannuru i sur., 2019]. Primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) predstavlja prvu liniju farmakološkog liječenja [Kolasinski i sur., 2019]. Pacijentima koji zbog niza nuspojava ne mogu uzimati NSAID ili im je ta terapija nedovoljno djelotvorna može se liječenje pokušati s intraartikularnim steroidnim injekcijama [Conaghan i sur., 2018]. Nadalje, na bol kod KOA može djelomično imati i mehanizmi u središnjem živčanom sustavu te se tada mogu primijeniti inhibitori ponovne pohrane norepinefrina i serotonina [Osani i sur., 2019]. Kod uznapredovalog stadija KOA gdje postoje značajni funkcionalni ispadi primjenjuje se kirurška terapija, odnosno totalna zamjena koljena (TKR) koja ima dugoročniji učinak [Evans i sur., 2019].

1.4 Osteoartritis zgloba kuka

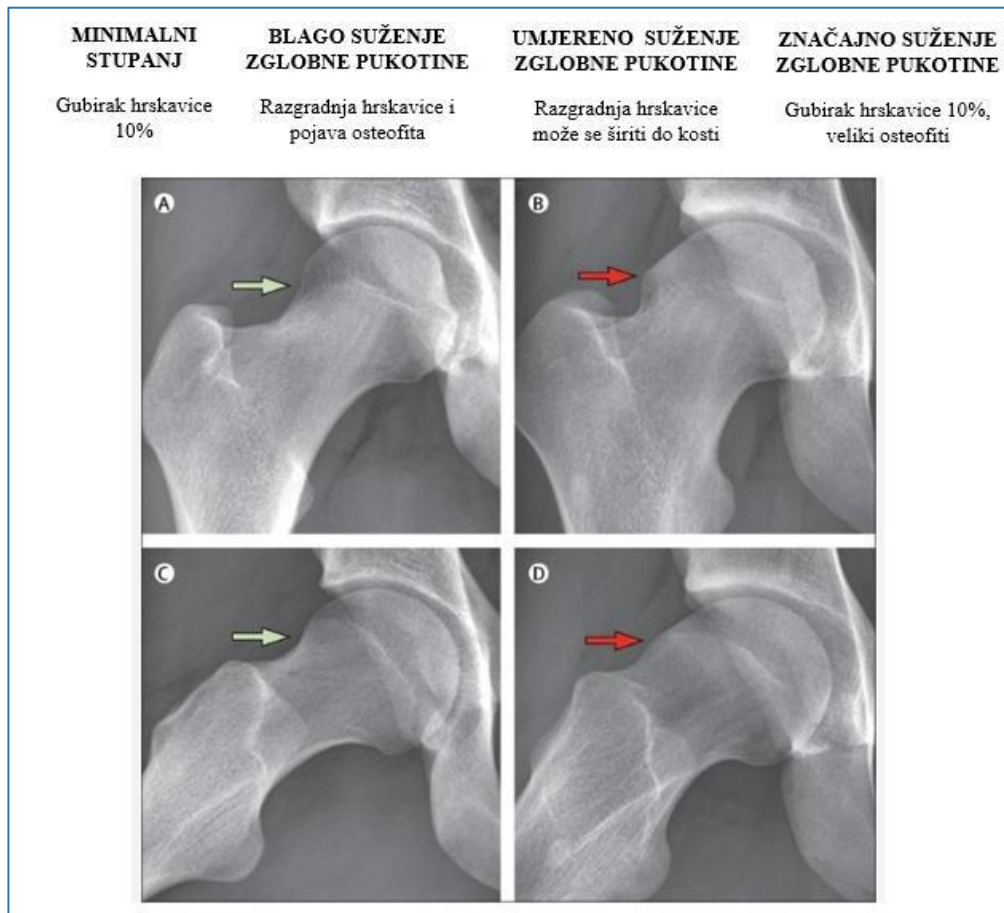
Osteoarthritis(OA) kuka je u kontinuiranom porastu i glavni je uzrok bolnih stanja i invaliditeta u starijoj populaciji. Pravovremena i učinkovita terapija bazira se na razumijevanju nastanka i progresije bolesti, a suvremeni pristup liječenju omogućuje maksimalno iskorištavanje resursa koji su na raspolaganju [Sandiford i sur., 2020]. Zglob kuka je kuglastog oblika i pod stalnim je opterećenjem statičkim i dinamičkim silama bilo da se radi o stajanju, hodanju ili trčanju te su zglobne površine (bedrena kost i acetabulum) podvrgnute kroničnom trošenju i oštećivanju što predstavlja jednu od osnova nastanka OA kuka [Helmick i sur., 2008]. OA se bazično djeli na primarni i sekundarni. Jedan od najčešćih sekundarnih oblika osteoartritisa predstavlja osteoarthritis zgloba kuka [Brygida i sur., 2015]. Često se naziva OA „habanja“ i također je povezan sa starijom životnom dobi. Zglob kuka pripada velikim zglobova u tijelu koji nosi veći dio težine. Kod OA kuka često nije zahvaćena samo hrskavica već i cijeli zglob. Kao i kod ranije opisanih OA može biti zahvaćena hijalina hrskavica i opuštenost periartikularnih ligamenta, a često susrećemo i stvaranje kalcifikata i subhondralnih cista te slabost mišićnih struktura [Lespasio i sur., 2018]. Osobe koje obole od OA kuka u prosjeku imaju 60 godina, a trajanje simptoma do početka liječenja je znatno kraće zbog ograničenog opsega pokreta za razliku od KOA gdje prevladava nestabilnosti zgloba [Gold i sur., 2015].

Iako etiopatogeneza OA kuka nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da je to bolest na koju utječe više etioloških faktora, a ne predstavlja samo upalne promjene u zglobu. Tako čimbenike rizika za OA kuka možemo podijeliti na čimbenike vezane za zglob (izravno djelovanje) i one vezane za cijelo tijelo (neizravno djelovanje). Važno je napomenuti da čimbenici koji su na razini tjela ne mogu samostalno izazvati OA kuka već pridonose povećanoj ekspresiji osnovnim etiološkim čimbenicima na razini zgloba [Murphy i sur., 2016]. Destruktivni procesi hrskavice i cijelog zgloba koji obuhvaćaju i postupno omekšavanje i ulceracije zgloba s oštećenjem subhondralne kosti imaju za posljedicu bol, oticanje i ograničen opseg kretnji [Pola i sur., 2005]. Zahvaćena hrskavica podliježe reakciji obnove i zacijeljivanja taloženjem kolagena stvarajući fibrohrskavicu koja nije elastična i ima znatno smanjenu mogućnost apsorpcije sile udara. Nastankom manje kvalitetne hrskavice proces oštećivanja se dalje prenosi na subhondralni dio kosti koja eksplicira zaštitnu reakciju pojačane pregradnje, ali kako ona nije sinhrozirana nastaje skleroza uz stvaranje osteofita [Sandiford i sur., 2020]. Femoroacetabularni udar (FAI) je jedan od češćih osnovnih razloga u nastanku OA kuka. Opisana su dva tipa FAI koji se razlikuju prema morfološkim promjenama: FAI cam i FAI pincer FAI. U FAI cam, prevladava abnormalnost zadebljanog spoja vrata i glave femura,

dok je kod FAI pincer produbljeni acetabulum i vrat bedrene kosti koji naliježe na acetabulum labrum dovodeći do njegovog oštećenja [Ganz i sur., 2003].

Potrebitost dijagnosticiranja OA kuka u ranom stadiju je neupitna, međutim ne postoje dobro validirani dijagnostički testovi koji služe u tu svrhu [Runhaar i sur., 2019]. Dijagnoza se prvenstveno zasniva na fizikalnom pregledu i radiografskim značajkama zgloba kuka [Rondas i sur., 2022]. Pažljivo uzimanje anamneze prethodi kliničkom pregledu koji mora obuhvatiti usporedbu duljine noge u odnosu na zdravu stranu, procijenu fiksno položaja zgloba i patološke promjene hoda u svrhu razlučivanja deformiteta [Lespasio i sur., 2018]. Prilikom fizikalnog pregleda testovi pokreta kuka i promatranje bolesnikovih reakcija na bol kod izvođenja pokreta mogu se razlikovati pacijenti koji imaju OA kuka od onih kod kojih je bol druge etiologije [Metcalf i sur., 2019]. Kod OA kuka bol se najčešće javlja u području velikog trohantera, stražnjice i bedra na zahvaćenoj strani, dok bol u potkoljenici i koljenu nije zabilježena [Poulsen i sur., 2016].

Radiografska snimka kuka je najčešće anteroposteriorna (AP) i lateralna snimka (Slika 5). Prilikom AP snimanja kuk treba biti u unutarnjoj rotaciji. Kod bočne snimke potrebno je da kuk bude u fleksiji s vanjskom rotacijom. Kako bi bili sigurni da je radiografija kuka ispravno učinjena na AP snimci veliki i mali trohanter natkoljениčne kosti ne smiju prekrivati jedan drugoga, a preklapanje oba ruba spoja glave i vrata bedrene kosti treba biti minimalno [Gold i sur., 2015]. Često postoji nesrazmjer između simptoma koje iskazuje osoba koja boluje od OA kuka i prikaza oštećenja na radiografskoj snimci [Iidaka i sur., 2016].



Slika 5. radiografski prikaz stupnjeva progresije osteoartritisa kuka [prilagođeno prema Glyn-Jones i sur., 2015]

Liječenje je potrebno prilagoditi zasebno svakoj oboljeloj osobi te započeti s osnovnim tretmanima kao što su edukacija, samokontrola, tjelovježba i po potrebi gubitak tjelesne težine. Terapija vježbanjem ima dobar učinak na kratkoročnu bol, dok je kod dugoročne boli njen učinak nejasan [Teirlinck i sur., 2023]. Terapijski učinak vježbe je veći kada se primjeni doziranje iz smjernica za program kod odraslih zdravih osoba [Holeden i sur., 2021]. Nesteroidni protuupalni lijekovi su učinkoviti u smanjivanju boli kod OA kuka, a kod bolesnika s komorbiditetima mogu se primjeniti i kao lokalna terapija [Da Costa i sur., 2021]. Intraartikularna injekcija steroida ublažava bol do 12 mjeseci [Zhong i sur., 2020]. Pacijentima s dugoročnom boli treba se ponuditi minimalno invazivne postupke [Urits i sur., 2020]. Kod neadekvatnog odgovora na primjenjene manje invazivne metode liječenja

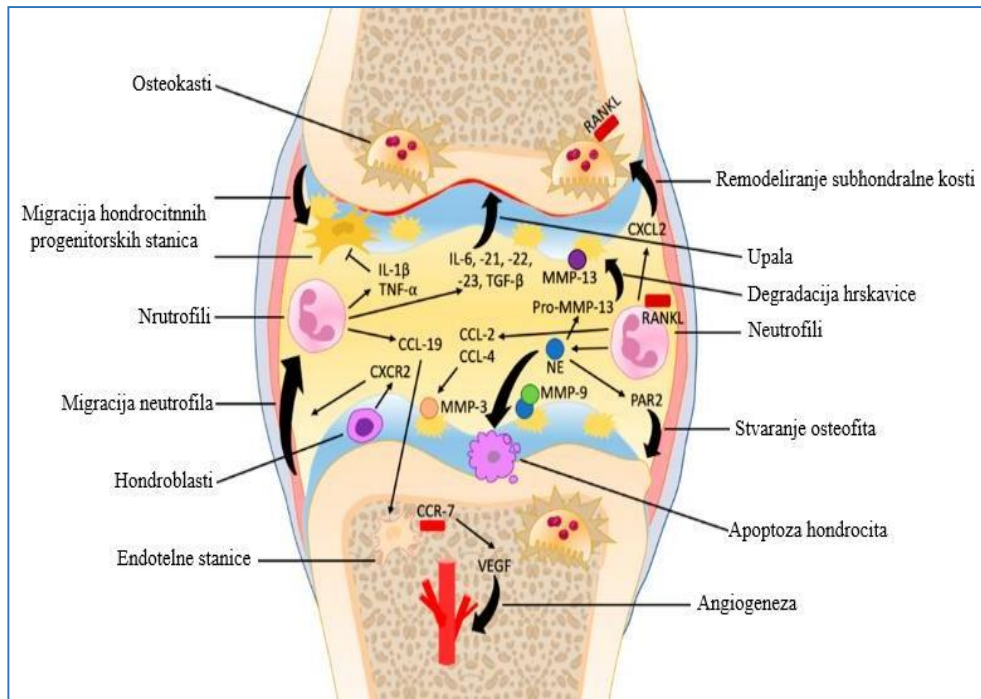
potrebno je razmisliti o mogućnosti kirurškog zahvata odnosno totalnoj artroplastici kuka [Hunter i sur., 2019]. Češći komorbiditeti vezani uz OA kuka su kardiovaskularne bolesti, depresija, bol u leđima i osteoporoza [Dell'Isola i sur., 2022]. Starije osobe koje imaju OA kuka i istovremeno bol u leđima bilježe povećani rizik od pada i poslijedičnog prijeloma [Knox i sur., 2021].

1.5 Imunološki aspekt osteoartritisa

Imunološki sustav sastoji se od nespecifičnog ili urođenog i specifičnog ili adaptivnog imuniteta. Prisutstvo patogena u organizmu i njihovo imunološko prepoznavanje ima za cilj aktiviranje različitih imunoloških mehanizama kako bi se eliminirali patogeni i zaštitilo oštećenje tkiva domaćina. Međusobno djelovanje nespecifičnog i specifičnog imunološkog obrasca neophodno je u eliminaciji patogena i osigurava najbolju učinkovitost. Nespecifični imunološki sustav predstavlja prvu liniju obrane domaćina i uključuje različite fagocitne stanice kao što su dendritičke stanice i makrofagi čime se pokreće upalna reakcija. Specifičan imunitet je baziran na T limfocitima i B limfocitima na kojima se eksprimiraju antigen specifični receptori. To je imunitet koji je dugotrajan s imunološkom memorijom i obično se javlja u uznapredovaloj fazi infekcije [Kawai i sur., 2009].

Posljednjih desetljeća smatra se da je u napredovanje bolesti aktivno uključena upala koja je prisutna kod većine bolesnika s OA. Veliki broj upalnih medijatora je detektiran u osteoartritski promjenjenom zglobu, a povećano eksprimiranje imunoloških stanica posebno je izraženo u sinovijalnom prostoru. Imunološke stanice gube svoju zaštitnu funkciju i pojačano proizvode enzime koji razgrađuju osnovni hrskavični matriks posredujući na taj način nastanak upale i razvoj OA. Alarmini su molekule koje svrstavamo među signale opasnosti i posreduju uvelikom broju upalnih bolesti. Kod infekcije, oštećenja zgloba ili upalnih promjena alarmini su među prvim medijatorima koji se oslobađaju u zahvaćeno tkivo. Alarmini čine osnovni dio upalne reakcije na način da privlače stanice imunološkog sustava na ozlijeđeno mjesto i aktiviraju njihovu funkciju. Upalno promjenjeno tkivo je važan čimbenik u etiopatogenezi OA gdje središnju ulogu imaju alarmini koji sudjeluju u početnom stadiju razvoja bolesti i održavanju upalnog odgovora u OA. Postoje teorije koje kažu da bi suprimiranje alarmina smanjilo jačinu upalnih događaja i na taj način usporilo progresiju OA [Van den Bosch i sur., 2019]. Upalna komponenta trenutno je primarno zastupljena u otkrivanju etiologije bolesti i smatra se da bi se suprimiranjem i liječenjem upale moglo usporiti progresiju i nastanak komplikacija kod OA. Različiti citokini i proteinaze

ekspimiraju se u povećanim količinama u zglob što ima za posljedicu promjenu sastava hrskavice i posljedično njenih karakteristika. Modulacijom citokina i proteina smanjio bi se upalni utjecaj u zglobu na promjenu karakteristika i degradacije hijaline hrskavice čime bi se moglo odgoditi napredovanje bolesti [Kosor i sur., 2013].



Slika 6. Uloga neutrofila u progresiji osteoartritisa. Neutrofili pridonose lučenju citokina i kemokina i inhibiraju migraciju hondrocitnih progenitorskih stanica potiču upalne procese u zglobu. Neutrofilna elastaza apoptozom hondrocita doprinosi daljnjoj degradaciji hrskavice, a uz neadekvatno remodeliranje subhondralne kosti dolazi do stvaranja osteofita.

[prilagođeno prema Chaney i sur., 2022]

U vrijeme nastanka infekcije ili upale u zahvaćenom tkivu snažno se regrutiraju neutrofilni granulociti koji čine prvu liniju obrane u urođenom imunološkom sustavu. Granulocitni neutrofili regrutirani u upalno promjenjeno područje vrlo brzo prepoznaju „molekularne uzorke povezane s patogenom (PAMP) i molekularne uzorke povezane s oštećenjem (DAMP). Mogućnost detektiranja molekularnih uzroka poremećaja u tkivu nastaje zbog aktivacije specifičnih receptora na površini PAMP i DAMP. PAMP nastaje iz molekula patogenih mikroba dok DAMP predstavljaju endogene molekule koje imaju mogućnost

osloboditi se iz oštećenog tkiva i na taj način signalizirati ozlijeđenu stanicu [Gong i sur., 2020]. Aktivirani neutrofilni granulociti imaju sposobnost eliminirati različite patogene pomoću mehanizama obrane domaćina kao što je proizvodnja povećane količine reaktivnih kisikovih radikala (ROS), fagocitoza i degranulacija čime posreduju u stvaranju izvanstaničnih zamki (Slika 6) [Ley i sur., 2018].

Sinoviociti nalik fibroblastu (FLS) imaju ključnu ulogu u etiopatogenezi sinovitisa kod upalno promjenjenog zgloba, a sintetiziraju i eksprimiraju veliku količinu interleukina 22 (IL-22), receptora interleukina 22 (IL-22R1), S100A8 proteina (S100A8) i S100A9 proteina (S100A9). Upalni medijatori pojačavaju ekspresiju IL-22 i IL-22R1 čime još više aktiviraju FLS. U nastalom začaranom krugu povećana ekspresija i proliferacija FLS povećava ekspresiju S100A8/A9 i MMP1 [Carrión i sur., 2013]. Interleukin-1 beta (IL-1 β) je snažan propupalni čimbenik koji kod OA sudjeluje u razgradnji hrskavice potičući aktivaciju drugih molekula u tom procesu.

HMBG-1 molekula uravnotežuje cijeli proces inhibirajući učinak IL-1 β čime sprječava degradaciju hrskavice suprimirajući ekspresiju upalnih molekula u hondrocitima [Fu i sur., 2016]. Međutim, unatoč pokušaju suprimiranja IL-1 β nuklearni protein HMGB1 se pojačano eksprimira i otpušta u izvanstanični prostor u upalnim stanjima ili onima gdje dolazi do oštećenja tkiva. To je molekula koja aktivira molekule urođenog imunološkog odgovora i ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji upalnih procesa tako što između ostalih procesa aktivira osteoklaste čime uzrokuje bol koja je prvi simptom OA [Aulin i sur., 2020]. Protein HMGB-1 bilježi važnu ulogu u nastanku OA moduliranjem oksidativnih, upalnih i apoptotičkih signalnih puteva [Zhang i sur., 2019]. Kod osteoartritisa HMGB-1 snažno pokazuje funkciju proupalnog citokina inducirajući upalu u sinovijalnoj tekućini i na taj način indirektno sudjeluje u razaranju hrskavice. Kako u serumu tako i u sinovijalnoj tekućini kod OA detektiraju se povećane koncentracije HMGB1. Ekspresija HMGB1 je veća što su upalni procesi više izraženi, a zglobne strukture jače oštećene [Li i sur., 2022].

Promatramo li zglob kao cijeli organ, razvidno je da postoji interakcija između sinovijalne tekućine i hrskavice. Različite imunološke stanice u sinovijalnoj tekućini uzrokuju upalu i potiču aktivnost enzimske razgradnje u hrskavici što zauzvrat daje signale sinoviji koja potiče daljnju proteolizu hrskavice [Woodell-May i sur., 2020]. Kod zdravih osoba koncentracija cirkulirajućih stanica Th1 imunološkog odgovora pokazuje varijacije u serumu što se ne primjećuje u oboljelih od OA. Međutim, u sinovijalnoj tekućini i sinovijalnoj membrani

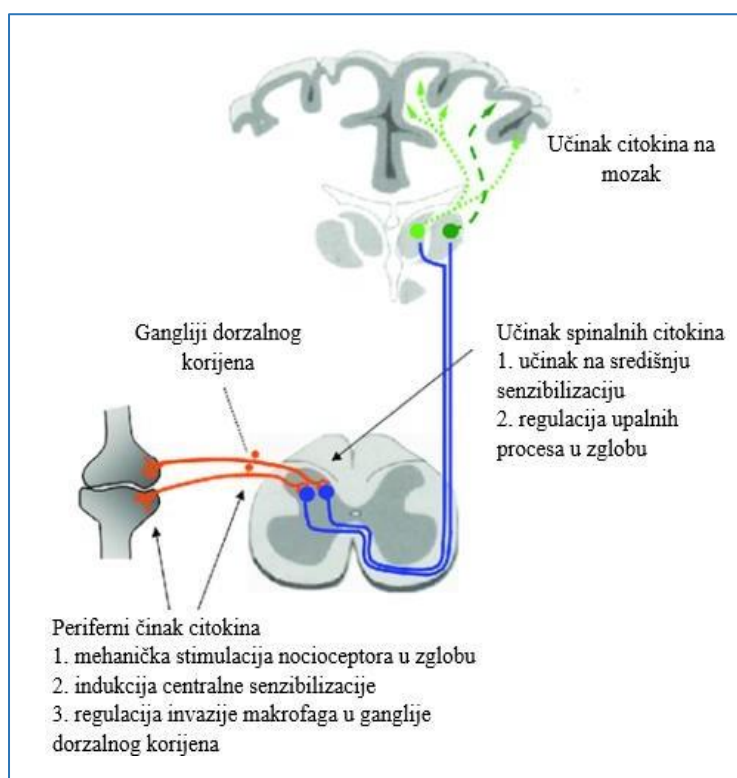
detektira se značajno veća koncentracija Th1 stanica u oboljelih osoba od OA [Nedunchezhiyan i sur., 2022]. Upalni procesi u sinovijalnoj tekućini pokazuju povećanu ekspresiju mastocita, makrofaga i CD4+ limfocita koji ekspresijom alogeničkih molekula senzibiliziraju nocioreceptore kod OA i aktiviraju senzorne neurone čime doprinose bolnim podražajima [Miller i sur., 2020].

1.6 Neurološki aspekt osteoartritisa

Zdravlje zglobova je između ostaloga i pod sofisticiranom kontrolom živčanog sustava. Proprioceptori i nocioreceptori u zglobu imaju višestruku ulogu u održavanju homeostaze te kontroliraju osjećaj položaja, boli i prokrvljenosti zglobnih struktura. Fiziološki pokreti zgloba zahtijevaju fluidne pokrete koji su pod kontrolom zglobnog živčanog sustava i njihovo oštećenje dovodi do disfunkcije zgloba. Nocioreceptori zgloba imaju brzinu provođenja impulsa manju od 20 m/s, a prag njihove aktivacije je visok. Nalazimo ih u sinovijalnoj tekućini, subhondralnoj kosti, površini ligamenata, intrapatelarnom masnom jastučiću i vanjskom djelu meniskusa zgloba. Nasuprot tome mijelinizirana aferentna vlakna u zglobu nalazimo u cijelom zglobu, imaju veliku brzinu provođenja živčanih impulsa, signaliziraju osjet položaja zgloba i vrlo su osjetljiva na mehaničke podražaje [McDougall i sur., 2019]. OA obilježava nociocepcijska bol uzrokovana mehaničkim i molekularnim podražajem aferentnih živčanih vlakana u zglobu. Periferne i središnje senzibilizacije boli povezuju se s pojačanim prijenosom senzornih impulsa iz perifernih nocioreceptora i disfunkcije modulacijskih neuronskih puteva [Barroso i sur., 2020].

Bol je za razliku od strukturnih promjena u zglobu subjektivni simptom OA u koji su uključeni periferni i središnji živčani mehanizmi. Smatra se da bol uzrokuju upalni poremećaji zgloba, a ne sama destrukcija hrskavice. Citokini, kemokini, prostaglandini, neuropeptidi i proteaze su medijatori u kaskadnim poremećajima upalnih procesa te izravno djeluju na nocioreceptore zgloba uzrokujući bol [Fu i sur., 2018]. Nociceptivni podražaji iz zgloba potiču perifernu senzibilizaciju, međutim ako se bol ponavlja uzrokovati će središnju senzibilizaciju [Hattori i sur., 2022].

U patogenezi OA proupalni citokini su jedni od važnijih medijatora boli. Posebno su izraženi citokini poput faktora tumorske nekroze-alfa (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL6) i interleukin 17 (IL 17) koji izravno djeluju na nociseptivne receptore. Trajni podražaji u zglobu i kontinuirani podražaj nociseptivnih senzornih neurona kod osteoartritisa izazivaju perifernu senzibilizaciju dodatno i pridonose hiperalgeziji. Neuronski učinak citokina postepeno dovodi i do središnje senzibilizacije u leđnoj moždini podržavajući hiperalgeziju kod OA. TNF- α i IL-1 β imaju glavni učinak na toplinsku hiperalgeziju, dok IL6 i IL17 utječu na postojanost mehanički uzrokovane hiperalgezije. Suprimiranjem navedenih citokina moguće je smanjiti osjet bola kod OA (slika 7) [Schaible i sur., 2014].



Slika 7. Učinak perifernih i spinalnih citokina na nociseptore u zglobu, leđnoj moždini i mozgu [prilagođeno prema Schaible i sur., 2014]

Bol kod OA je u početnom stadiju posljedica perifernih mehanizama odnosno štećenja nociseptora uzrokovanog degeneracijom zglobnih struktura. Kronična bol je povezana s aktiviranjem središnjih mehanizama koji mogu dovesti i do promjena u moždanim strukturama. Morfometrijske metode omogućile su mjerene debljine korteksa mozga i

uočavanje promjena u volumenu sive tvari kod kronične boli. Dužinom trajanja kronične boli zabilježeno proporcionalno kortikalno stanjivanje [Alshuft i sur., 2016].

Kod pacijenata s OA kuka i OA koljena prisutna je bol koja je vrlo slična neuropatskoj. Pacijenti s KOA imaju izraženu smanjenu funkciju zgloba što uz izraženu bol značajno smanjuje i kvalitetu života. Bol koja se javlja u oba tipa OA nalik je na neuropatsku i posljedica je centralne neurološke senzibilizacije [Bilkman i sur., 2018]. Postoje dokazi da je središnji živčani sustav kod pacijenata s OA postaje hipersenzibiliziran i pacijenti imaju niži prag tolerancije na bolne podražaje [Fingelton i sur., 2015].

1.7 Potencijalni biomarkeri osteoartritisa

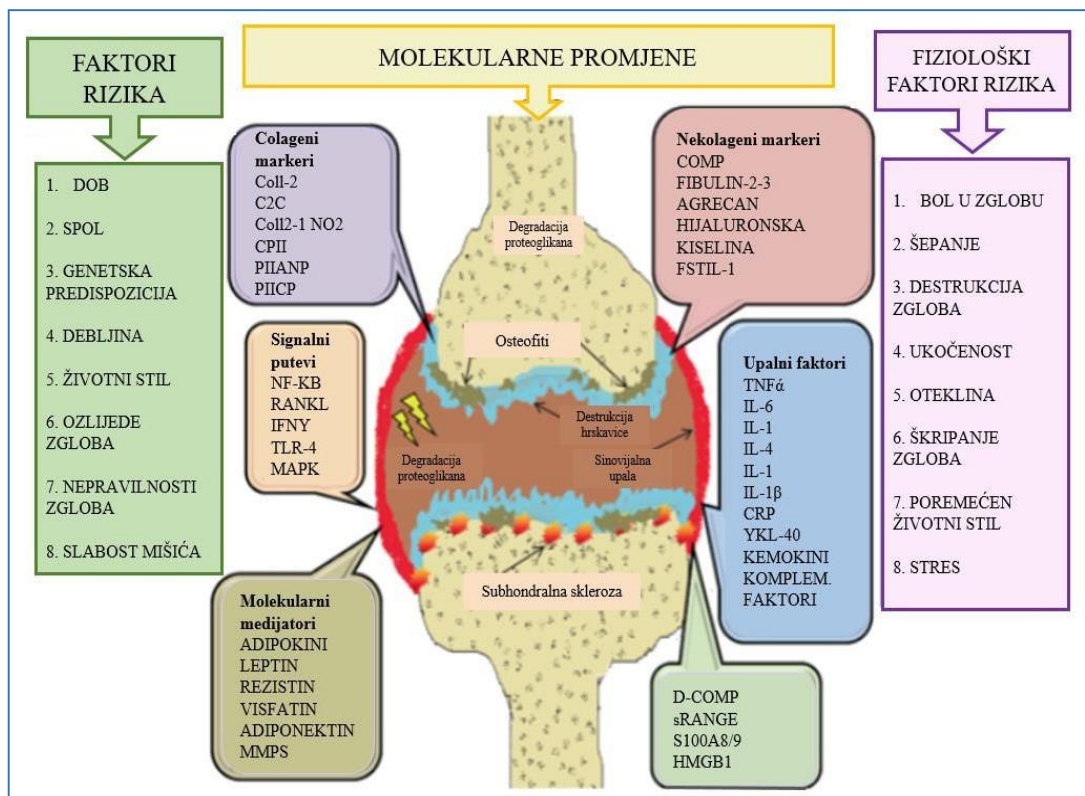
U patofiziologiji KOA nametnuli su se određeni serumski biomarkeri koji bi mogli pridonijeti lakšem postavljanju dijagnoze (Slika 8). Cilj je identificirati dovoljno specifičan biomarker OA koji bi bio u pozitivnoj korelaciji s radiografskim nalazom i stupnjem progresije bolesti.

Metaboličkim sindromom (MetS) povezan je s OA i naziva se MetS-OA gdje su metabolički poremećaji udruženi s upalom niskog stupnja i imaju glavnu ulogu u poremećajima struktura zgloba i nastanku OA. U različitim istraživanjima uloženi su značajni napor u pronalaženju biomarkera MetS-OA, međutim dovoljno specifičan serumski marker koji bi mogao imati dijagnostičku ulogu do sada nije pronađen. U patologiju MetS-OA uglavnom se ubrajaju visceralna pretilost, intolerancija glukoze i dislipidemija [Lynskey i sur., 2023].

Adropin ima značajke neuropeptida, sudjeluje u kontroli metabolizma glukoze i masnih kiselina. Koncentracija adropina u krvi je obrnuto proporcionalna s indeksom tjelesne mase. Bolesnici s KOA imaju značajno niže razine adropina u serumu [Selim i sur., 2022]. Biomarkeri kao što su toll-like receptor 4 (TLR4) i lipopolisaharid vezujući protei (LBP) imaju važnu ulogu u OA. TLR4 je dio urođenog imuniteta i njegova povećana ekspresija povezana je sa stupnjem upale i sužavanjem zglobnog prostora kod KOA. LBP proizvode hepatociti, medijator je akutne upalne faze te nužan čimbenik u kaskadnim putevima pri pokretanja upale. S obzirom na njegove fiziološke funkcije može se smatrati adipokinom. Serumске koncentracije LPB proporcionalne su s radiografskim nalazima destrukcije zgloba kod KOA [Huang i sur., 2018].

Adipokini imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze kosti i hrskavice. S obzirom da je pretilost često povezana s OA, masno tkivo luči niz citokina među kojima je i rezistin. U

bolesnika s primarnim KOA bilježe se značajno povećane koncentracije rezistina [Alissa i sur., 2020]. Protein oligomernog matriksa hrskavice (COMP) drugog naziva trombospodin 5 (THBS5) snažno se eksprimira u strukturama kostiju i hrskavice i predstavlja marker koji odražava njihov metabolizam. COMP je nekolagenski glikoprotein, ima ulogu katalizatora u stvaranju kolagenskih fibrila. Koncentracije COMP odražavaju razinu metaboličkih i strukturnih promjena u zglobu kod OA, te se bilježi značajno veća serumska ekspresija kod KOA [Liem i sur., 2020].



Slika 8. Prikaz čimbenika koji mogu utjecati na nastanak i razvoj osteoartritisa [prilagođeno prema Kumavat i sur., 2021]

Glikolizirani izvanstanični protein matriksa (CRTAC1) nalazimo u dubokoj zoni zglobne hrskavice. Sudjeuje u procesima oštećenja kologena i zacijeljivanja rana što moguće implicira njegovu ulogu u procesima fibroze. Koncentracije CRTAC1 pokazuju izrazito serumsko povećanje u stanjima poput OA [Szilagyi i sur., 2023]. Matriks metaloproteinaza 1 (MMP1) se izlučuje u hrskavici kao reakcija na proupalne i druge kataboličke čimbenike u procesima progresije OA čime potiče naknadnu razgradnju zglobne hrskavice [Braaten i sur., 2022]. Grelin je neuropeptid koji ima snažnu protuupalnu funkciju. Nije u potpunosti razjašnjen

mehanizam djelovanja grelina, no zabilježene su njegove povećane koncentracije u OA [Wu i sur., 2017].

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) ima snažan proangiogenetski učinak čime aktivira proliferaciju endotelnih stanica. U endohondralnoj osifikaciji VEGF proangiogenetski učinkom sudjeluje u remodeliranju hrskavice. Pojačano je eksprimiran u sinovijalnoj tekućini u korelaciji je sa stupnjem progresije OA [Saetan i sur., 2014]. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB-1, eng. *High-mobility group box 1*) je protupalni citokin čije su povećane koncentracije u sinovijalnoj tekućini u korelaciji s kataboličkim promjenama u hondrocitima odnosno progresijom OA [Palumbo i sur., 2023]. Koncentracije HMGB1 i proteina S100A8/A9 u sinovijalnoj tekućini bilježe povećane koncentracije kod ozljede koljena. Međutim, postoje razlike u njihovom odgovoru na traumu tkiva. Dok je HMGB1 povezan s molekularnim markerima hrskavice, protein S100A8/A9 je u vezi s proupalnim čimbenicima. Oba citokina imaju važnu ulogu u imunoregulacijskim mehanizmima upalnih stanja i mogu imati učinak na progresiju OA [Aulin i sur., 2022].

Pod pojmom biomarkera OA podrazumjevamo različite molekule i njihove fragmente koji se eksprimiraju u povećanoj koncentraciji kao reakcija na patološke promjene zglobnih struktura i odražavaju dinamički proces destrukcije tkiva. Biomarkeri moraju imati visoku specifičnost i osjetljivost, a njihovo mjerenje treba biti minimalno invazivno [Rousseau i sur., 2021]. Analiziran je veliki broj različitih biomarkera u serumu, urinu i sinovijalnoj tekućini. U dostupnoj literaturi se može pronaći više desetaka molekularnih čimbenika koji moguće obećavaju visoku specifičnost u dijagnozi OA. Međutim, iako je uloženi veliki napor znanstvenika do sada niti jedan od analiziranih biomarkera nije bio dovoljno specifičan i validiran u kliničkoj praksi. Nadalje, nedostatak univerzalnog konsenzusa definicije i klasifikacije OA uvelike otežava istraživanja [Convill i sur., 2021]. Osteoartritis je multifaktorska bolest i niti jedan od čimbenika rizika nije sam dovoljan za nastanak i razvoj bolesti te u dijagnostici valja uključiti sve fiziološke i molekularne čimbenike.

1.8 Alarmini

Alarmini su skupina imunomodulatorskih molekula koje stanice otpuštaju nakon ozljede tkiva i zato su usko povezani s molekularnim obrascima povezanim s oštećenjem (DAMP). Važno je razlikovati alarmine koji predstavljaju endogene molekule DAMP od molekularnih obrazaca povezanih s patogenom koji su u naravi egzogeni DAMP odnosno PAMP. Endogeni

i egzogeni DAMP su među prvim čimbenicima koji se oslobađaju nakon stresa stanica te privlače i aktiviraju stanice imunološkog sustava i stoga leže u osnovi upalne reakcije [Palumbo i sur., 2023].

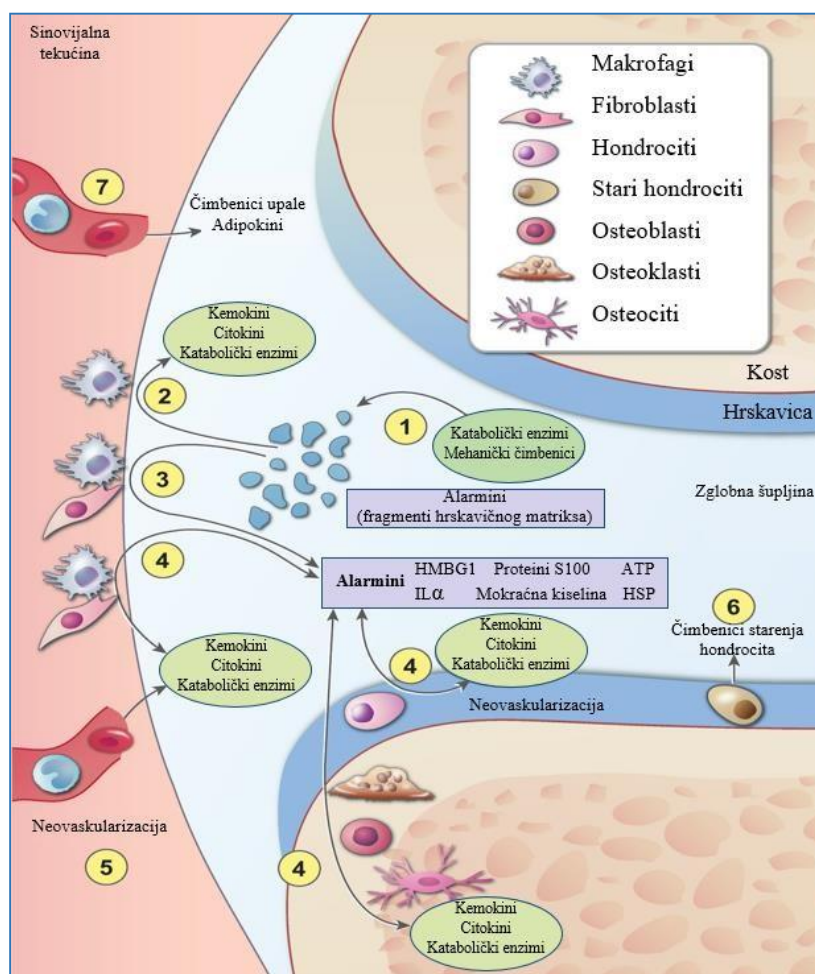
Alarmini su strukturno vrlo različite multifunkcionalne molekule koje otpuštaju stanice nakon njihove degradacije odnosno neprogramirane stanične smrti, a uzrokovane različitim upalnim stanjima ili ozljedom. DAMP molekule imaju važnu ulogu unutar stanice u fiziološkim uvjetima, ali u stanjima staničnog stresa kada su eksprimirani u izvanstanični prostor dobivaju dodatne funkcije. Na taj način upozoravaju tijelo na prisutnu opasnost, ali i aktiviraju upalni odgovor i sudjeluju u procesu regeneracije tkiva. Osim što ih pasivno otpuštaju nekrotične stanice, neke DAMP molekule se mogu aktivno izlučiti i iz funkcionalno zdravih stanica ako su stanice izložene stresu koji može ugrožavati život. Glavna uloga eksprimiranih alarmina u izvanstanični prostor je aktiviranje nespecifičnog urođenog imuniteta i regrutacija stanica stečenog imuniteta aktivacijom antigen prezentirajućih stanica i prepoznavanje patogena putem specifičnih receptora (PRR) [Chan i sur., 2012]. Kada se alarmini aktivno oslobađaju u izvanstanični prostor mehanizam eksprimiranja je reguliran mehanizmima koji nisu ovisni Golgijevom aparatu i endoplazmatskom retikulumu. Takav način otpuštanja alarmina uključuje sekreciju pomoću inflamatornih molekula, piroptozu (stanična smrt uzrokovana upalom) i degranulaciju stanica [Pruenster i sur., 2016].

DAMP molekule su povezane s upalnim procesima i sličnim stanjima nastalim nakon ozljede tkiva. Međutim, to su molekule koje nisu samo signali koji alarmiraju opasnosti, već imaju i zapaženu aktivnost pri obnavljanju tkiva nakon upale povezane s infekcijom ili posljedica sterilne upale [Vénéreau i sur., 2015]. Sve veći broj studija pokazuje da aktivacija urođenog imunološkog sustava i upalnih mehanizama imaju važnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti. Urođeni imunološki sustav prisutan je u gotovo svim višestaničnim organizmima i njegova se aktivacija javlja kao odgovor na patogene ili ozljede tkiva putem receptora za prepoznavanje uzoraka (PRR) koji prepoznaju PAMP ili DAMP molekule. Kao rezultat toga PRR aktiviraju upalne signalne putove kako bi inducirali urođeni imunitet [Santoni i sur., 2015]. PRR su važne komponente urođenog imunološkog sustava. Identificirano je nekoliko obitelji PRR u različitim segmentima stanice. Glavne funkcije PRR molekula su poticanje fagocitoze i posredovanje upale izlaganjem različitih patogena i molekula iz oštećenih stanica [Jin i sur., 2017; Santoni i sur., 2015]. Nakon aktivnog ili pasivnog otpuštanja alarmina S100A8/A9 iz monocita ili neutrofila svoje funkcije izvršavaju najčešće vezivanjem na jedan od dva PRR :

Toll-like receptor 4 (TLR4) i receptor naprednih krajnjih proizvoda glikacije (RAGE) [Pruenster i sur., 2016]. Osim TLR 4 i RAGE receptora PRR uključuje niz drugih molekula, a neki od njih su Nod-like receptor (NLR) i lektinski receptori. Međusobno djelovanje TLR i stanica urođenog imuniteta stvara učinkovitu imunološku obranu domaćina. Iako se dugo smatralo da urođeni imunitet funkcionira na osnovi nespecifičnog prepoznavanja patogena, sada je dobro poznato da je ono zapravo specifično i posredovano s TLR [Kawai i sur., 2010].

DAMP molekule se oslobađaju iz staničnih i izvanstaničnih prostora potaknuti kao što je već rečeno ozljedom tkiva. Prepoznaju ih makrofagi i različitim putevima pokreću upalne odgovore. DAMP molekule mogu potjecati iz različitih izvora uključujući stanične molekule poput proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB-1), proteina S100, histona, proteina plazme kao što su Gc-globulini, fibrinogeni, serumski amiloidi A (SAA) i proteina toplinskog šoka (HSP) te izvanstaničnih molekula poput tenascina C i biglikana [Roh i sur., 2018]. Identificirani su neki unutarstanični putovi koji usklađuju imunološki odgovor s funkcijom ionskih kanala koji pridonose boljoj učinkovitosti alarmina. Primjer toga su ionski kanali prijelaznog receptorskog potencijala (TRP) koji su dio obitelji važnih neselektivnih kanala s propuštanjem kationskih iona. Pomoću ionskih kanala TRP ostvaruju ulogu multifunkcionalnih staničnih senzora u mnogim fiziološkim i patološkim reakcijama [Santoni i sur., 2015].

U patološkim reakcijama zgloba kod OA izvanstanični hrskavični matriks između ostalih molekularnih spojeva čine i fibronektin, agrekan, biglikan i hijaluron male molekularne težine. Fragmenti navedenih stanica hrskavičnog matriksa u zgloba imaju funkciju alarmina jer putem PRR receptora stimuliraju proizvodnju i ekspresiju upalnih medijatora te privlače upalne stanice. Aktiviranjem sinovijalnih makrofaga aktiviraju proupalne citokine, kemokine i niz kataboličkih enzima (Slika 9) [Pruenster i sur., 2016].



Slika 9. U patološkim zbivanjima osteoartritisa tijekom degradacije struktura zgloba važan čimbenik je upala koja ima ključnu ulogu u progresiji bolesti. Alarmini se oslobađaju iz stanica tijekom staničnog oštećenja uzrokovanog upalnim procesima i u nizu kaskadnih procesa tijekom upale potiču imunološku reakciju regrutacijom različitih upalnih medijatora [prilagođeno prema Van den Bosch., 2019].

Pretilost je vrlo česta kod bolesnika s OA i snažno utječe na razvoj i progresiju OA. Što je veći indeks tjelesne mase više se otpuštaju sistemski upalni čimbenici. Kod pretilosti eksprimiraju se različiti citokini i adipokini proizvedeni u masnom tkivu koji imaju funkciju alarmina, i induciraju blagu sistemsku upalnu aktivnost [Richter i sur., 2015].

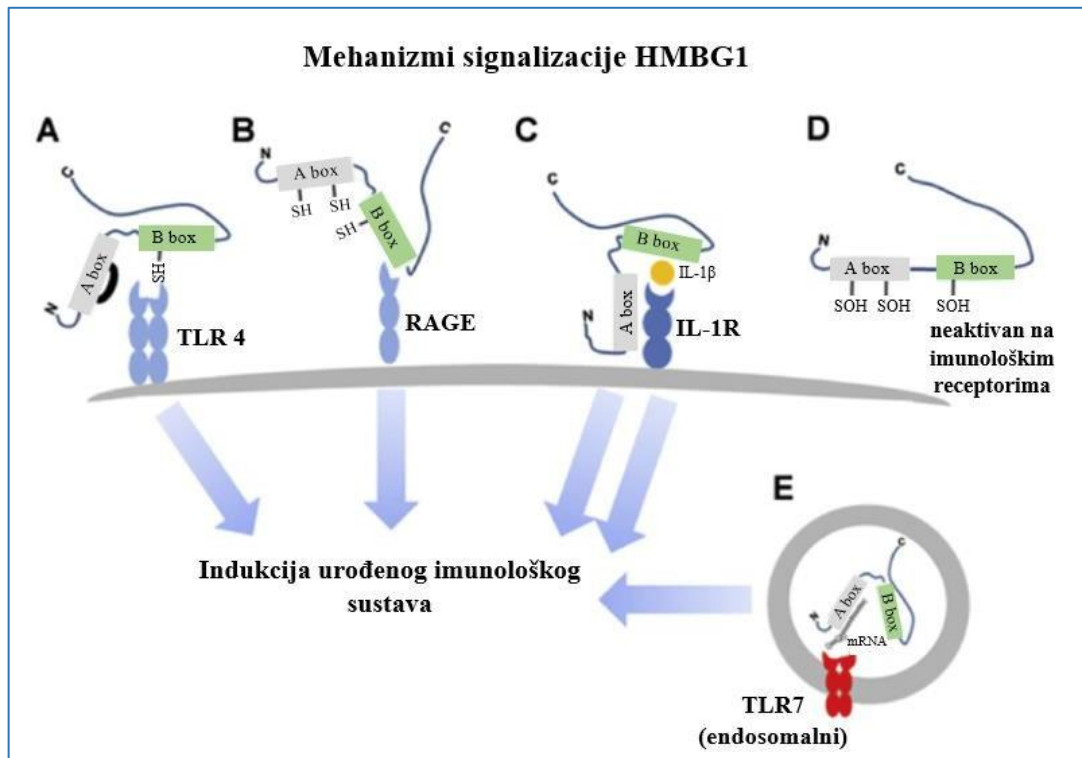
Reguliranjem DAMP signalizacije i njezinim utišavanjem u patološkim procesima može koristiti kao potencijalni putu smanjenju upale i liječenjenju bolesti [Roh i sur., 2018].

1.9 Protein visoke pokretljivosti skupine B1-HMBG1

Protein HMGB1 je endogena molekula koja potiče aktivaciju urođenog imunološkog odgovora. Osim što ima važnu ulogu u nastanku upalnih procesa snažno aktivira osteoklaste i uzrokuje i bol koja je glavni simptom kod osteoartritisa [Aulin i sur., 2020]. Modulacijom signalnih puteva upalnih, oksidativnih i apoptotičkih molekule važan je čimbenik u upalnim procesima [Zhang i sur., 2019]. Skupina protein visoke pokretljivosti (HMGB) čine proteini manji od 30 kDa i njihovo djelovanje je ovisno o strukturi DNA jer ovisi o mogućnosti njihovog vezanja, izuzev nukleotidne sekvence DNA koja nema utjecaj na vezanje HMGB.

Obitelj HMGB uključuje četiri člana: HMGB1, HMGB2, HMGB3 i HMGB4. Biokemijska svojstva su slična kod HMGB1, HMGB2, HMGB3, a struktura na razini aminokiselina stanične i izvanstanične domene je identična u gotovo 80% molekule. To su proteini koji sadrže dvije domene s razlikom što HMGB4 nema na kraju domene kiseli nastavak te se djelomično razlikuje i u biokemijskim svojstvima. Članovi skupine HMGB pokazuju ekspresiju u gotovo svim tkivima ljudskog organizma [Taniguchi i sur., 2018]. HMGB1 protein sadrži 215 aminokiselina raspodjeljene u tri domene, dvije domene koje su pozitivno nabijene (A box i B box) i negativno nabijeni kiseli rep. N-terminalna regija molekule HMGB1 sadrži sekvencu aminokiselina na koju se veže heparin. Na suprotnom kraju C-terminalne domene je skup aminokiselina koje posreduju u vezanju topljivog receptora za krajnji produkt uznapredovale glikolizacije RAGE i TLR. HMGB1 molekula je lokalizirana u jezgri i citoplazmi stanice. Unutarstanična molekula HMGB1 je hiperacetilirana, u citosolu stanice stvara kompleks sa sekretornim lizosomima te se takva eksprimira u izvanstanični prostor. Može se ekspimirati iz stanice aktivno u upalnim stanjima aktiviranjem imunološkim stanicama i pasivno tijekom stanične nekroze [Martinotti i sur., 2015; Antoine i sur., 2012]. HMGB1 kao mobilni kromatinski protein ima funkciju DNK šaperona, veže se reverzibilno za molekulu DNK, a nakon vezanja i aktiviranjem transkripcijskih faktora savija DNK u spiralnu strukturu. Kao DNK šaperon olakšava vezanje proteina i stvaranje nukleosoma. Važnu ulogu ima u transkripciji, replikaciji i popravku DNK molekule. Oslobađa se nakon staničnog traumatskog oštećenja, staničnog stresa i smrti stanice, ali ne uvijek i tijekom stanične apoptoze [Bianchi i sur., 2005]. Unutarstanični HMGB1 (jezgra) je u potpuno reduciranom obliku. Prevalencija potpuno reduciranog HMGB1 se mijenja u disulfidni oblik HMGB1 kod aktivacije imunoloških stanica potaknutim ozlijedom tkiva odnosno oštećenjem ili smrti stanica [Lundbäck i sur., 2016]. Stanična smrt poput nekroze i NEToze (neutrofilne izvanstanične zamke) predstavlja važan mehanizam za aktivaciju alarmina i aktivira

oslobađanje različitih izoformi HMGB1 [Magna i sur., 2014]. Translokacija HMGB1 i njegova izvanstanična uloga proupalnog citokina posljedica je imunološke aktivacije, a redoks stanje cisteina modulira mogućnost vezanja HMGB1 i time određuje njegovu daljnju funkciju [Antoine i sur., 2014].



Slika 10. Mehanizmi signalizacije HMGB1 koji se sastoji id dvije slične molekule A box i B box i dugog negativnog C terminalnog kraja. HMGB1 je izlučen iz aktiviranih nekrotičnih stanica i ima ulogu imunološkog modilatora. A: TLR 4 djeluje kao agonist HMGB1 i aktivira urođeni imunooški odgovor. B: RAGE nereducirani sisulfidni agonsit HMGB1 koji uz aktivaciju urošenog imunološkog odgovora potiče rast živčanih stanica. C: Heterodimenrni Agonist HMGB1/IL-1 koji s citokinima stvara proupalne komplekse i preko IL-1 receptora pojačava signalizaciju IL-1 β pojačavajući indukciju urođenog imuniteta. D: oksidirani oblik HMGB1 koji ne pokazuje aktivnost na receptorima imunoloških molekula. E: HMGB1-mRNA- šaperon aktivira RNA senzor TLR7 receptora pojačavajući imunološki odgovor (prilagođeno prema Crews i sur., 2017).

HMGB1 molekula sadrži tri cisteina koji su ključni za biološku aktivnost proteina: disulfidnu vezu tvore atomi C23 i C45, a nespren je atom C106. Na krajevima HMGB1 cisteini u

različitim redoks reakcijama reverzibilno oksidaciju tiolne skupine (-SH) bočnih lanaca u nekoliko redoks stanja, kao što su sulfenska kiselina (R-SOH) i sulfonatni (R-SO₃ H). Atom C106 neophodan je za vezanje molekule HMGB1 na TLR4, jer nastali kompleks stimulira pojačano otpuštanje citokina i kemokina (Slika 10). Sulfonil-HMGB1 ne pokazuje aktivnost citokina. Međutim, molekula HMGB1 i RAGE međusobnom interakcijom tvore multifunkcionalni transmembranski kompleks te induciraju ekspresiju medijatora upale [Vénéreau i sur., 2015; Taniguchi i sur., 2018]. Aktivnost HMGB1 s njegovim receptorom RAGE aktivira put NF- κ B koji pojačava ekskreciju adhezijskih molekule IL-1 ili TNF čime se potiče angiogenezu i promiče upalno stanje [Martinotti i sur., 2015].

U stanjima infekcije ili oštećenja tkiva dolazi do pojačane ekspresije nuklearnog proteina HMGB1 koji se brzo otpušta u izvanstanični prostor. HMGB1 ima funkciju proupalnog citokina koji kod osteoartrisa inducira sinovijalnu upalu potičući degradaciju hrskavice. Ekspozirajući kataboličke stanične procese tijekom upalnog odgovora pridonosi nastanku i progresiji bolesti. Osim što se kod osteoartritisa (OA) povećana ekspresija HMGB1 očitava u serumu također možemo detektirati prekomjerne koncentracije i u sinovijalnoj tekućini pacijenata. Teži oblici sinovitisa su karakterizirani većom ekspresijom HMGB1 [Li i sur., 2022].

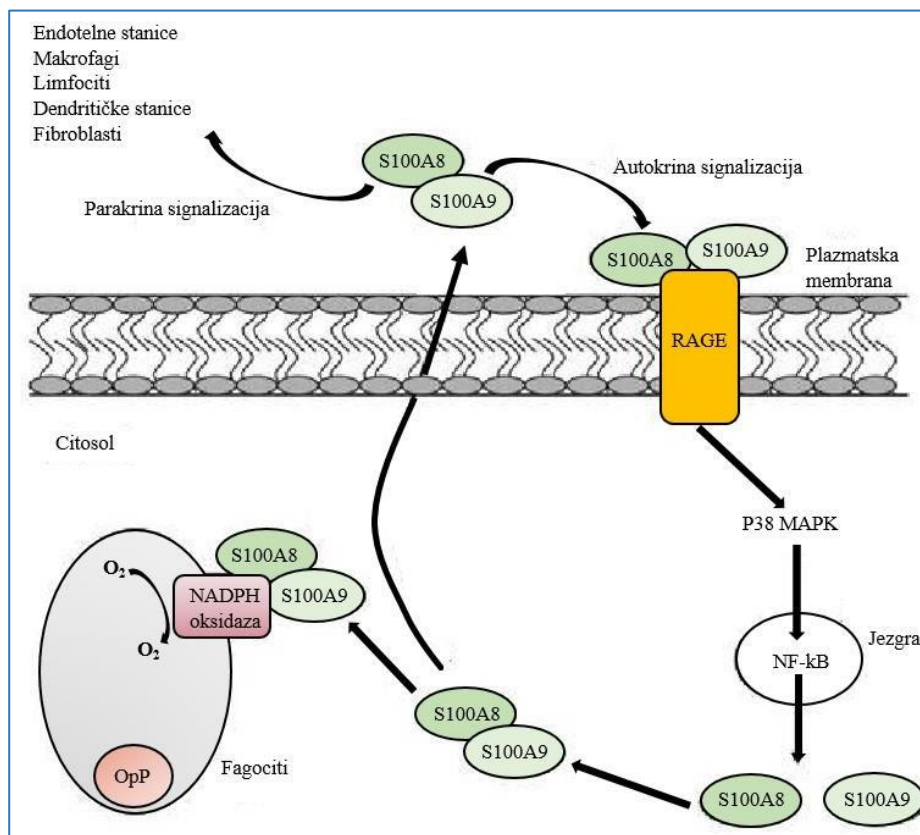
Tkivno specifična ekspresija HMGB1 i HMGB2 u hrskavici povezana je patološkim promjenama i narušavanjem homeostaze u hrskavici zahvaćenoj OA. Parakrini učinci HMGB1 induciraju kemokine i molekule dušikovog oksida (NO) za koje se smatra da mijenjaju homeostazu u hrskavici zahvaćenoj OA. Multifunkcionalni oblik HMGB 1 u kasnom stadiju oštećenja zglobnih struktura zahvaćenim OA meže produžiti upalu hrskavice i stvoriti stanje slično sterilnoj upali [Amin i sur., 2014]. HMGB1 je uključen u etiopatogenezu OA, a svojim djelovanjem potiče degradaciju kostiju i hrskavice. IL-1 β ima snažnu propupalnu funkciju i važan je čimbeniku etiopatogenezi osteoartritisa, jer potiče aktivaciju proteina koji dovode do razgradnje hrskavice. Inhibirajući učinak na IL-1 β ima HMGB-1 jer smanjuje ekspresiju upalnih medijatora u hondrocitima [Fu i sur., 2016]. U OA koncentracija HMGB1 posredovana s IL-1 β značajno je povišena u zglobnim tkivima i hondrocitima. Apoptoza stanica je inhibirana molekulom HMGB1. Smanjena koncentracija HMGB1 otvara prostor za prekomjernu ekspresiju mRNA, putem TLR povećava ekspresiju matriksmetaloproteinaze (MMP) i potiče upalu u hondrocitima [Wang i sur., 2020]. Ekspoziranjem u izvanstanični prostor HMGB1 potiče upalu aktiviranjem puta NF- κ B i

vezanjem na TLR2, TLR4, TLR9 i RAGE [Roh i sur., 2018; Sun i sur., 2016]. Koncentracija HMGB-1 u sinovijalnoj tekućini korelira s težinom sinovitisa prikazanih s kliničkim simptomima kao što su ukočenost i bol i radiografskim promjenama u bolesnika s OA koljena [Zhou i sur., 2021; Ke i sur., 2015].

1.10 Protein S100A8/9

Obitelji proteina S100 pripadaju proteini S100A8 i S100A9 (S100A8/A9). To su kalgranulini koje čine kalgranulin A ili protein S100A8 koji se još naziva protein-8 povezan s mijeloidom (MRP8) i kalgranulin B poznat kao protein S100A9 ili MRP14. Proteini S100A8/A9 su najčešće heterodimeri što ih izdvaja od većine molekularnih struktura proteina, jer takva struktura utječe na njihovu stabilnost. Obitelj proteina S100 teže oko 10 000 kDa, a ime su dobili zbog potpune topljivosti u zasićenom amonijevom sulfatu [Gondez i sur., 2020]. Kodirani su genima koji su grupirani na lokusu unutar kromosoma 1q21 [Santamaria-Kisiel i sur., 2006] i jedni su od važnijih regulatora homeostaze mehanizma kalcija [Bertheloot i sur., 2016]. Svi S100 proteini sadrže dva EF-hand motiva odvojena spajajućom regijom. Zbog svoje nekovalentno vezane heterodimerne strukture i aminokiselinskih ostataka imaju visoki afinitet za dvovalentne ione Ca^{2+} i cinka (Zn^{2+}). Stvaranje nove konformacije S100A8 i S100A9 s ionima Ca^{2+} i Zn^{2+} osnova je za njihovo iskazivanje aktivnosti u imunološkim procesima tijekom upalnih reakcija. Potječu od makrofaga i neutrofila i čine oko 40-45% citoplazmatskih proteina u neutrofilima [Wang i sur., 2018]. Alarmini S100A8/A9 su stanični proteini a izvanstanično se eksprimiraju na podražaje proupalnih medijatora kada bilježe iznimno visoke koncentracije [Huecksteadt i sur., 2022]. U fiziološkim zdravim uvjetima S100 proteini sudjeluju u staničnoj proliferaciji, migraciji i diferencijaciji stanica kao i energetskom metabolizmu [Bertheloot i sur., 2017]. Proteini S100A8/A9 polimerizacijom tubulina sudjeluju formaciji citoskeleta što predstavlja bitan čimbenik koji omogućava migraciju stanica. Način na koji S100A8/A9 utječe na mogućnost migracije stanica vjerojatno je mehanizam kojim učestvuje i u regrutiranju neutrofila u akutnim zbivanjima [Wang i sur., 2018]. U nespecifičnim imunološkim reakcijama najzastupljeniji su neutrofil koji se prvi regrutiraju na mjestu upale ili traume tkiva. Neutrofil vrlo brzo prepoznaju PAMP ili DAMP putem receptora TLR4 i RAGE na njihovoj površini te stvaranjem NET, degranulacijom, fagocitozom i ekspresijom reaktivnih kisikovih radikala (ROS) eliminiraju patogene. [Sprenkeler i sur., 2021; Roh i sur., 2018; Donato i sur., 2013]. Proteini S100A8/A9 su

glavni ligandi na plazmatskoj membrani za receptore TLR4 i RAGE. Vežanjem S100A8/A9 na membranske receptore započinju intracelularne kaskadne reakcije koje imaju za cilj translokaciju NF- κ B u staničnoj jezgri i ekspresiju ciljnih gena. Na fagocitnoj membrani S100A8/9 regulira aktivnost nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) čime regulira stupanj fagocitoze i stvaranje ROS. RAGE je u izravnoj interakciji s lipopolisaharidima i sudjeluje u endotelnoj hiperpermeabilnosti i aktivaciji NF- κ B. Aktivacija NF- κ B stanica i protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) u konačnici rezultira indukcijom povratne sprege i dodatnim povećanjem ekspresije RAGE, a kao posljedica tih procesa pojačava se



sinteza medijatora upalnih stanica /Slika 11/ (Wang i sur).

Slika 11. Povratna signalizacija posredovana S100A8/A9 tijekom fagocitoze. Na površini neutrofila dolazi do povezivanja RAGE pomoću S100A8/A9 i potiče transkripciju NF- κ B koji zauzvrat inducira S100A8/A9. Kompleks S100A8/A9 na membrani fagocita regulira

aktivaciju NADPH oksidaze. Izvanstanični S100A8/A9 autokrinim i parakrinim djelovanjem pojačava imunološki odgovor [prilagođeno prema Zhao i sur., 2011].

Proteini S100A8/A9 vrlo su osjetljivi na oksidacijske promjene. Njihovo redoks stanje određuje molekularnu funkciju pa neoksidirane molekule imaju proupalnu aktivnost, dok oksidirani oblici pokazuju suprotan učinak u upalnim stanjima te imaju antioksidacijska svojstva i potiču zacijeljivanje tkiva. Moguće je da S100 proteini imaju funkciju „čistača“ ROS-a i NO čime sudjeluju u smanjivanju oksidativnog stresa [Bertheloot i sur., 2016].

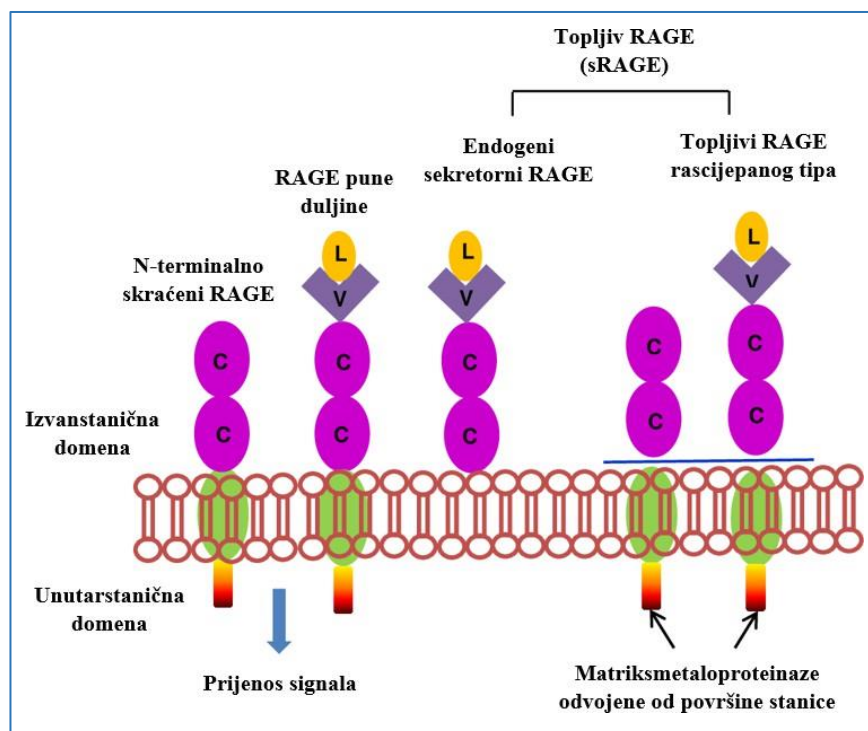
Sinovitis je klinički prisutan kod velikog broja bolesnika s OA i povezan je s razvojem bolesti. Proteini S100A8/A9 u imunomodulacijskoj aktivaciji medijatora upale sudjeluju u etiopatogenezi bolesti [Schelbergen i sur., 2014] tako što potiču upalom izazvanu koštanu eroziju i direktno aktiviraju resorpciju osteoklasta [Di Ceglie i sur., 2019]. Aktivirani makrofagi proizvode alarmine kao što su proteini S100A8 i S100A9 koji reguliraju upalnu aktivaciju sinovijalne tekućine i oštećenje hrskavice u OA [Schelbergen i sur., 2016; Van Lent i sur., 2012]. Proteini S100A8/A9 se povezuju s različitim imunološkim reakcijama koje mogu imati važnu ulogu u progresiji OA. S100A8/A9 i HMGB1 imaju više zajedničkih funkcija u kaskadnim imunološkim reakcijama, a regrutiraju se kao neposredni odgovor na traumu [Aulin i sur., 2022].

Alarmini S100A8/A9 u OA reguliraju oštećenje hrskavice, aktivaciju sinovijalnih stanica i stvaranje osteofita tako što potiču ekspresiju protuupalnih i kataboličkih medijatora i aktiviraju Wnt signalizaciju u sinovijalnoj tekućini. Ekspresija specifičnih gena za molekule signalnog puta Wnt i S100A8/A9 pokazuje da S100A8 inducira Wnt signalni put u makrofazima i zglobovima. Učinci S100A8 značajno ovise o aktiviranju Wnt signalizacije, a kompleks S100A8/A9 i Wnt signalni put pokazuju aktivnu ulogu u razvoju OA [Van den Bosch i sur., 2016]. Koncentracija proteina S100A8/A9 u serumu korelira sa brzinom sedimentacije eritrocita, ali je obrnuto proporcionala sa strukturnim poremećajima u zglobu što može odražavati upalne procese u sinovijalnoj tekućini u bolesnika s OA i indikativna je u predkliničkom stadiju prije pojave strukturnih degradacije [Mahler i sur., 2015]. Značajno veća ekspresija proteina S100A8/A9 je zabilježena u OA s osteofitima što ih povezuje s uznapredovalim stadijem OA [Schelbergen i sur., 2016].

Osim što alarmini S100A8/A9 potiču izlučivanje citokina i aktiviranje leukocita njegova izvanstanična domena pokazuje i protuupalne karakteristike te ima antimikrobna svojstva. Smatra se da ti proteini tijekom upalnih procesa sudjeluju u naporima održavanja homeostaze [Wang i sur., 2018]. Međutim, koncentracije S100A8/A9 su u pozitivnoj korelaciji s dobi i proupalnim citokinima (IL-1 β , IL-8, IL-6 i TNF) oboljelih od OA, ali su obrnuto proporcionalne s vremenom, pa su koncentracije i do 100 puta veće u akutnoj fazi, odnosno kod svježije ozlijeđe u odnosu na kronični oblik bolesti [Aulin i sur., 2022].

1.11 Topljiv receptor sRAGE

Višeligandni receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE) član je obitelji imunoglobulina. Struktura RAGE je podjeljena u tri različita dijela: unutarstanični, transmembranski i izvanstanični dio. Ligand se veže na izvanstanični dio molekule RAGE kojeg čine tri zasebne domene imunoglobulina. Te imunoglobulne djelimo na C1 i C2 dio te V dio. Razlikujemo C-terminalnu i N-terminalnu domenu receptora od kojih svaka ima različite funkcije (Slika 12). Gen za RAGE je na kromosomu 6p21.3 i nalazi se na glavnom lokusu kompleksa histokompatibilnosti. To je regija klase III kromosoma i osim gena za RAGE na njoj se nalaze i mnogi drugi upalni geni [Dong i sur., 2022].



Slika 12. Struktura glavnih izoformi RAGE [prilagođeno prema Premaratne i sur., 2016].

Opisana struktura receptora RAGE sa unutarstaničnim fragmentima se veže na različite signalne molekule koje se također nalaze u stanici. Dio molekule RAGE pune duljine, zatim skraćeni C-terminalni i skraćeni N-terminalni dio molekule RAGE posreduju u prijenosu unutarstaničnih signala i izazivaju cijeli niz kaskadnih reakcija. Skraćeni C-terminalni dio ima samo izvanstaničnu domenu molekule i predstavlja topljivi RAGE (sRAGE) kojeg izlučuju stanice i kompetitivno se veže za različite RAGE ligande. Međutim, skraćeni N-terminalni dio ima unutarstaničnu i transmembransku domenu. Transmembranska domena može biti uklonjena hidrolizom membranskih proteaza kada izvanstanična domena samostalno formira sRAGE [Yue i sur., 2022].

RAGE receptor je sličan imunoglobulinima, a možemo ga naći u višestrukim izoformama čime postiže mogućnost vezanja raznolikih izvanstaničnih liganada, ali i unutarstaničnih izvršnih molekula. Stvaranje i ekspresija reaktivnih kisikovih radikala (ROS) rezultat je vezanja liganda na izvanstaničnu domenu RAGE čime se aktivira cijeli niz složenih signala. Regulacija RAGE receptora u opisanim kaskadnim reakcijama stvaranja ROS molekula ima za cilj utjecati na staničnu proliferaciju, apoptozu i imunološke učinke u upalnim stanjima [Bongarzone i sur., 2017]. Topljivi RAGE se javlja u dva oblika, a razlikuju se po mehanizmu djelovanja. Jedan oblik sRAGE čini izvanstanična domena vezana za ligand koji je nastao proteolitičkim cijepanjem metaloproteinazama (MMP) i integrinom α (ITG α) od RAGE molekule pune duljina sa staničnom, transmembranskom i izvanstaničnom domenom. Drugi oblik je RAGE kojeg endogeno stvaraju i aktivno izlučuju stanice (esRAGE). Oba oblika RAGE receptora, dakle sRAGE i esRAGE imaju ulogu inhibitora liganda [Hudson i sur., 2018]. Aktivnost membranskog RAGE-a se uvelike razlikuje od nuklearnog RAGE koji je vjerojatno neophodan kod popravaka nastalih oštećenja na DNK molekuli. Multifunkcionalnost RAGE receptora ovisno da li se nalazi u jezgri ili na površini stanice očitava se u mogućnosti aktiviranja imunoloških stanica u proupalnim reakcijama i reakcijama popravka DNK [Kumar i sur., 2020]. sRAGEs se ekspimiraju u plazmi, sinovijalnoj tekućini, bronhoalveolarnom lavatu i cerebrospinalnom likvoru [Egaña-Gorroño i sur., 2020].

Aktiviranjem RAGE signalnog puta aktivira se regrutacija molekula koje potiču upalu i povezani su s endogenim i egzogenim DAMP. RAGE endocitnim reakcijama može internalizirati ligande, uključivanjem u reakcije fagocitoze apoptotskih stanica (eferocitoza) u makrofagima i aktivno sudjeluje procesima nakon početnog oštećenja stanica [Yang i sur., 2022]. RAGE receptor prepoznaje i veže različite vrste liganda, a neki od njih su HMGB1,

lizofosfatidna kiselina (LPA), S100 proteini, fosfatidilserin (PS), amiloid beta ($A\beta$) i protein komplementa C1q [Xiao i sur., 2020; Palanissami sur., 2018; Ge i sur., 2018].

Stanična smrt je uzrokovana starenjem i disfunkcijom mitohondrija i ima za posljedicu povećanu akumulaciju PAMP i DAMP molekula iz oštećenih stanica povezanih sa starenjem i mitohondrijskom disfunkcijom te povećanu ekspresiju proupalnih citokina [Teissier i sur., 2019]. Interakcijom između krajnjih proizvoda uznapredovale glikacije (AGE) i njihovih receptora RAGE regulira se stanična funkcija koja ima važnu funkciju u etiopatogenezi OA [Drinda i sur., 2018]. Prepoznavanjem i vezanjem AGE i RAGE aktivira se unutarstanična signalizacija, nastaje oksidativni stres koji dodatno oštećuje stanice i potiče ih na povećanu produkciju alarmina kao što su HMGB1 i S100 proteini što rezultira aktivacijom cijelog niza kaskadnih signalnih puteva i početak upalnog odgovora [Wu i sur., 2023].

2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitivanje i usporedba serumske koncentracije HMBG1 i S100A8/A9 te sRAGE u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena.

Specifični ciljevi su:

1. usporediti serumske koncentracije HMBG1 i S100A8/A9 te sRAGE u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena neovisno o stupnju težine bolesti s kontrolnom skupinom;
2. usporediti serumsku koncentraciju HMBG1 i S100A8/A9 te sRAGE bolesnika s blagim stupnjem osteoartritisa kuka i osteoartritisom koljena (stupanj 1. i 2. prema Lawrence – Kellgren skali) sa serumskom koncentracijom HMBG1 i S100A8/A9 te sRAGE u bolesnika s teškim stupnjem osteoartritisa kuka i koljena (stupanj 3. i 4. prema Lawrence – Kellgren skali);
3. usporediti serumsku koncentraciju HMBG1 i S100A8/A9 te sRAGE neovisno o stupnju težine osteoartritisa koljena sa serumskom koncentracijom istih molekula u bolesnika s osteoartritisom kuka.

Hipoteza ovog rada jest da visoka koncentracija HMBGI i S100A8/A9 te niska koncentracija sRAGE u serumu bolesnika s osteoartritisom ukazuje na upalnu aktivnost bolesti.

3. UZORCI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Ispitanici

Istraživanje je rađeno u Zavodu za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom KB Dubrava i u Klinici za ortopediju i traumatologiju KB Dubrava. Ispitanici su podjeljeni u dvije skupine po istim isključnim kriterijima; ispitivanu skupinu (N=94) i kontrolnu skupinu (N=96). Ispitivanu skupinu čine pacijenti navedenih zdravstvenih ustanova kojima je anamnezom, kliničkim statusom, laboratorijskom i RTG obradom utvrđen blagi do teški stupanj osteoartritisa (OA) kuka ili koljena. Kontrolnu skupinu čine pacijenti istih demografskih karakteristika kao i ispitivanu skupinu, a nemaju OA niti druge bolesti i stanja koja bi mogla utjecati na rezultate analize. U kontrolnoj skupini su bolesnici koji tijekom uzimanja uzoraka krvi nisu imali povišene laboratorijske vrijednosti sedimentacije (SE) i C reaktivnog proteina (CRP) niti imaju simptome OA kuka, koljena i šaka, bez recentnih mišićno-koštanih trauma te bez upalnih reumatskih bolesti, a kojima će se zbog drugih bolesti uzeti venska krv. Članovi obje ispitivane skupine uključuju oba spola u dobnoj skupini od 55 do 75 godina.

Ispitivana skupina je podijeljena u 4 podskupine prema važećoj klasifikaciji na slijedeći način:

- Prva podskupina - prvi i drugi stupanj OA kuka
- Druga podskupina- prvi i drugi stupanj OAKoljena
- Treća podskupina - treći i četvrti stupanj OA kuka
- Četvrta podskupina - treći i četvrti stupanj OA koljena

Uključni kriterij je OA jedne zglobne razine kuka ili koljena s urednim laboratorijskim vrijednostima u smislu upalnih procesa karakteriziranih vrijednostima sedimentacije (SE) i C reaktivnog proteina (CRP). Dijagnoza je postavljena na osnovu kliničkog fizikalnog pregleda i radiološke snimke koljena i kuka. Stupanj progresije osteoartritisa kuka i koljena određen je

na radiogramu prema Kellgren – Lawrence ljestvici. Svim bolesnicima je na osnovu iskazanih simptoma određena vizualna analogna skala boli /VAS/ te Womac test (The Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Indeks).

Isključni kriteriji su istovremena prisutnost simptoma OA kuka i koljena, povišene vrijednosti upalnih laboratorijskih vrijednosti (SE,CRP), OA šaka u evolutivnoj fazi, recentna mišićno - koštana trauma i upalna reumatska bolest.

Kod svih bolesnika analizirana je periferna venska krv. Klinički dio rada proveden je u Zavodu za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom KB Dubrava te u Klinici za ortopediju i traumatologiju KB Dubrava, a laboratorijska obrada u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb.

3.1.2 Ispitivani uzorak - periferna venska krv

Navedenim pacijentima ispitivane i kontrolne skupine uzeta je periferna venska krv. Za potrebe biokemijske analize korišteno je 6 ml krvi. Krv je prikupljana uvijek između 9 i 10 sati prije podne venepunkcijom u epruvete za vađenje krvi (BD vacutainer systems-7ml, Plymouth, UK) koje kao antikoagulans sadržavaju natrijev EDTA. Nakon prikupljanja svaki uzorak krvi je odstajao 30 minuta u biokemijskim epruvetama, a potom je centrifugiran na sobnoj temperaturi 5 min na 3500 rpm (Hettich centrifuge, Universal 320/320 RAndreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen,Germany). Odvojen je nadtalog (plazma) te aspiriran i pohranjen u kriotube (Nunc, Danska) za pohranu na -70°C do daljnje obrade za analiziranje EIA i ELISA metodama. Analiza uzoraka je napravljena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Ovisno o dokazanom stadiju OA uzorci krvi su podijeljeni u 4 podskupine. U podskupini jedan (prvi i drugi stupanj OA kuka) prikupljena su 25 uzoraka krvi, podskupini dva (prvi i drugi stupanj OA koljena) 23 uzoraka krvi, podskupini tri (treći i četvrti stupanj OA kuka) 24 uzoraka krvi i u podskupini četiri (treći i četvrti stupanj OA koljena) 22 uzoraka krvi. Kontrolnu skupinu čini ukupno 96 uzoraka krvi dobivenih od pacijentica bez OA.

Metodom EIA analizirana je koncentracija CRP, ELISA metodom razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE.

3.2 Metode

3.2.1 Analiza općih i imunosnih laboratorijskih pokazatelja

Analizom venske krvi u svih ispitanika izmjerene su koncentracije sljedećih laboratorijskih pokazatelja: brzina sedimentacije eritrocita, hematokrit, hemoglobin, broj trombocita i leukocita u perifernoj krvi, elektroforeza serumskih proteina i serumska razina C-reaktivnog proteina turbidimetrijski [Correia, et al., 2003].

3.2.2 *Analiza molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva HMGB1 i S100A8/A9 te receptora sRAGE u serumu*

Koncentracija HMGB1 i S100A8/9 te njihova receptora sRAGE u uzorcima plazme izmjerena je pomoću enzimskog imunotesta (ELISA) po uputi proizvođača: RAGE (R&D Systems, Minneapolis (MN), USA); S100A12/EN-RAGE (CycLex Co., Nagano, Japan); HMGB1 (Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan). Osjetljivost testa ELISA za HMGB1 bila je 1 ng/ml, za S100 56 pg/ml, a za RAGE 4.12 pg/m.

3.2.3 *Određivanje koncentracije proteina - Bradford metoda*

Proteini su makromolekule koje sačinjavaju aminokiseline. Da bi se moglo izvršiti istraživanje proteina u određenom uzorku potrebno je prethodno proteine pročistiti i izolirati, a potom pristupiti određivanju njihove koncentracije u ispitivanom uzorku. Određivanje koncentracije proteina je važan korak za daljnje analitičke metode, jer se tako na vrlo jednostavan način mogu ujednačiti rezultati svih uzoraka. Spektrometrijski kvantitativni testovi za mjerenje koncentracije proteina temelje se na međusobnoj reakciji metalnih iona sa određenim aminokiselinama te vezama aminokiselina u proteinima. Nastaje otopina koja ima karakterističnu plavu boju različitog intenziteta koji ovisi o koncentraciji proteina u uzorku. Pomoću UV vidljive spektroskopije na osnovu obojenja tekućine određuje se brojčana vrijednost proteina u svakom uzorku [Noble i sur., 2014.]. Kvantitativnom analizom određujemo točnu koncentraciju proteina u uzorku, a u te svrhe koristimo apsorpcijsku metodu koja se bazira na apsorpciji svjetlosti pri određenoj valnoj duljini. Dobivena vrijednost ovisi o vrsti proteina u uzorku i valnoj duljini spektrometra s kojim se vrši mjerenje. Spektroskopske metode koriste svjetlost koja predstavlja elektromagnetske valove.

Količinu apsorpcije koja je u korelaciji s valnom duljinom nazivamo apsorpcijski spektar. Postoje specifične strukture unutar molekula koje reagiraju s elektromagnetskim valovima, poznate kao kromofori. U proteinima postoje tri vrste kromofora: amidne ili peptidne veze, triptofan i aminokiselina tirozin koje se nalaze u bočnim lancima drugih aminokiselina i proteinske skupine kao što je hem u porfirinskoj skupini. Uzorcima koji su testirani dodana je otopina za postizanje odgovarajuće molarne koncentracije.

Beer-Lambertov zakon se koristi za izračunavanje koncentracije proteina u uzorku. Uključuje eksponencijalnu transformaciju u logaritamsku funkciju, gdje je apsorbancija jednaka koncentraciji kromofora [Hofman i sur, 2014].

Prema Beer-Lambertovom zakonu, postoji linearna veza između apsorbancije (A) i koncentracije (c) otopine. Jednadžba je $A = \epsilon cl$, gdje je ϵ koeficijent ekstinkcije, c koncentracija izmjerena u mol/L, a l duljina optičkog puta. Koeficijent apsorpcije (ϵ) mjeri se u molarnoj vrijednosti i molarnoj koncentraciji, dok je l duljina koju zrake putuju, obično u rasponu od 1-5 cm [Grimsley i sur., 2003]. Kolorimetrijska metoda za određivanje proteina temelji se na stvaranju intenziteta boje kao rezultat reakcije proteina sa specifičnim reagensom [Simonian i sur., 2006.]. Bradfordov test, nazvan po dr. Marion Bradford koja ga je opisala 1976., uključuje korištenje Coomassie Brilliant Blue G250 za analizu. Međutim, ova metoda ima nedostatak jer je boja vrlo kisela, ograničavajući analizu samo na proteine koji nisu topljivi u kiselim sredinama [Kielkopf i sur., 2020].

Mjerenje razine proteina u uzorku pomoću Bradfordovog reagensa je brza i pouzdana tehnika koja daje točne rezultate. Metoda uključuje kalorimetrijski pristup koji se oslanja na vezanje Coomassie Brilliant Blue boje na aminokiseline u proteinu. Bradfordov reagens je odgovoran za bojanje uzoraka u plavo, a maksimalna apsorpcija anionske Coomassie plave boje događa se na 590 nm. Standardni test mjeri koncentraciju proteina između 10-100 μg . Međutim, mikrottest se koristi kada se mjeri mnogo niža koncentracija proteina od 1-10 μg po uzorku. Budući da mikrottestovi koriste veće količine uzorka zbog niske koncentracije proteina, postoji potencijalni rizik od interferencije s drugim spojevima u uzorku. Da bi se odredila koncentracija proteina, obojena tekućina se izlaže određenoj valnoj duljini i prati se njena apsorpcija svjetlosti [Simonian, 2002.].

Za izradu Bradfordovog reagensa, otopi se boja CBB (Coomassie Brilliant Blue G-250) u 95% etanolu. Nakon što se boja potpuno otopi, umiješa se 85% fosforne kiseline i otopina razrijedi destiliranom vodom (Tablicu 1). Smjesu se ostavi na tamnom mjestu preko noći, zatim se filtrira kroz Wathman F1 papir. Dobivena otopina, koja ima izrazito plavu nijansu, naziva se Bradfordov reagens [Noble i sur., 2014].

Za pripremu Bradfordovog reagensa slijede se ovaj protokol: pomiješa se 100 mg CBB s 50 ml fosforne kiseline i 100 ml etanola. Zatim se doda destilirana voda dok ukupni volumen ne dosegne 1 L.

Tablica 1. Prikaz količine sastojaka u pripremi Bradford reagensa

Bradford reagens sastojci	Količina reagensa za 1l
Coomassie Brilliant Blue G250	100mg
95% C ₂ H ₅ OH	50 ml
85% H ₃ PO ₄	100 ml
ddH ₂ O	do ukupno 1l

Bradfordov standardni test nije prikladan za proteine koji su topljivi u kiselim sredinama i može smanjiti koncentraciju proteina u uzorcima koji su bogati membranama. Kako bi se to spriječilo, mogu se dodati deterdženti i NaOH kako bi se djelomično denaturirala membrana i smanjio njihov negativan učinak na rezultate. Amfoliti i deterdženti u uzorcima mogu promijeniti apsorpciju proteina u standardima i testiranim uzorcima. Natrijev karbonat i gvanidin hidroklorid također mogu uzrokovati lažne rezultate jer se snažno vežu za boju i natječu s proteinima, što rezultira nižom koncentracijom proteina u uzorku. Za uklanjanje ovih elemenata može se koristiti gel filtracija ili taloženje proteina s kalcijevim fosfatom [Kruger, 2002]. Kako bismo osigurali točnost mjerenja koncentracije proteina u ispitivanom uzorku, prvo mjerimo koncentraciju u kivetama koje sadrže slijepu probu (kiveta bez proteina). Slijepa proba se sastoji od destilirane vode s dodatkom Bradfordovog reagensa. Uz kivete sa slijepom probom nalazi se još šest kiveta sa standardima u kojima se razrjeđenja proteina kreću od niže do više koncentracije. Za određivanje koncentracije proteina u testiranim uzorcima koristi se otopina BSA (albumini iz goveđeg seruma) s unaprijed određenom vrijednošću koncentracije proteina ($\gamma = 1 \text{ mg/mL}$). Bradfordov reagens se dodaje u ovu otopinu i također u kivete koje sadrže testirane uzorke. Slijepe otopine pripremaju se s

različitim razrjeđenjima standarda i ispitivanih uzoraka te se dodaje 50 μL Bradfordovog reagensa i destilirane vode do ukupnog volumena od 100 μL . Ove otopine se ostave stajati otprilike 25 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se u kivetama aparatom s valnom duljinom od 595 nm mjeri apsorbancija, a pomoću dobivenog baždarnog dijagrama izračunava se koncentracija proteina. Standardna otopina (BSA) se čuva na -20°C i miješa s destiliranom vodom i proteinima prema navedenoj shemi (Tablica 2) [Redmile-Gordon i sur., 2013].

Tablica 2. Prikaz razrjeđivanja uzoraka i potrebne količine BSA, dH₂O i proteina

BSA (μL)	0	2,5	5	12,5	25	50	125	250	500
Destilirana voda (μL)	500	498	495	488	475	450	375	250	0
Proteini ($\mu\text{g/mL}$)	0	10	20	50	100	200	500	1000	2000

Intenzitet boje u uzorku proteina varira ovisno o njegovoj koncentraciji. Veća koncentracija rezultira intenzivnijom bojom. Rezultati apsorbancije također ovise o vrsti proteina, jer različiti proteini proizvode različite stupnjeve intenziteta boje. Kako bi se ovaj učinak sveo na najmanju moguću mjeru, ključno je izraditi stupčasti dijagram koji prikazuje vrijednosti slijepe probe i različitih standardnih koncentracija. Bradfordov test koristi se za kvantificiranje proteina, a svaki se uzorak testira tri puta kako bi se osigurali točni rezultati [Kalaydzhievi sur., 2018].

Kada se koristi spektrometar za mjerenje apsorpcije svjetlosti, raspon je obično između 210-585 nm. Razine apsorpcije će varirati ovisno o specifičnim aminokiselinama prisutnim u različitim proteinima. Aminokiseline koje imaju najveći utjecaj na apsorpciju su tirozin (Tyr), cistein (Cys), histidin (His), triptofan (Trp) i arginin (Arg), dok fenol (Phe) i postojeće disulfidne veze imaju manji utjecaj. Kako bi dobili najtočniji rezultat za određeni protein, idealno je izmjeriti njegovu apsorpciju na 50% njegove vrijednosti. Kivete koje se koriste trebaju biti prozirne za određenu valnu duljinu, a otopina mora ispuniti kivetu kako bi svjetlosne zrake mogle proći kroz nju. Prema Beer-Lambertovom zakonu, najbliže vrijednosti koncentracije proteina mogu se dobiti pri 215 nm i razinama apsorpcije ispod 2,0 [Aitken i sur., 2002]. Kalibracijska krivulja (baždarni dijagram) se radi razrjeđivanjem standardne otopine na različite koncentracije [Birghila i sur., 2015].

Ukratko, Bradfordova metoda koristi Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) boju u kiseloj sredini za reakciju s proteinima. CBB uglavnom reagira s aromatskim aminokiselinama tirozinom (Tyr) i triptofanom (Trp), au manjoj mjeri s histidinom (His), argininom (Arg), fenilalaninom (Phe) i lizinom (Lys) kao i peptidnim vezama koji apsorbiraju kraće valne duljine. Boja se veže za proteine hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama, što je stabilizira u anionskom stanju i uzrokuje promjenu boje iz smeđe u plavu. Bradfordova metoda temelji se na reakciji između proteina i boje. Apsorpcijski maksimum boje pomiče se s 465 nm na 595 nm, što se zatim prati spektrofotometrijom [Goldring, 2019].

Nakon izmjerene apsorpcije i dobivenih vrijednosti koncentracije proteina nacrtava se standardna krivulja. Ona služi da nakon upisanih početnih koncentracija mjerenih proteina možemo utvrditi koncentracije proteina nepoznatih vrijednosti. Dodavanjem standarda BSA dobiva se samo približna vrijednost koncentracije proteina, a apolutne vrijednosti koncentracije služe za crtanje standardne krivulje [Li i sur., 2023].

U ovom istraživanju korišten je spektrometar Varian Cary 100 i softver Cary WinUV, uzorci su obrađeni na prethodno opisan način. Uređaj ima točnost od ± 2 nm i koristi halogeni izvor svjetlosti s valnim duljinama u rasponu od 190-900 nm. Uzorci su analizirani difuznom refleksijom pomoću optičkih vlakana na temperaturi od 20°C.

3.2.4 Sendvič ELISA proteina u krvi

ELISA je skraćenica za Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, to je izoenzimna tehnika koja se koristi za određivanje koncentracije antigena. Ova metoda uključuje upotrebu specifičnih antitijela obilježenih enzimima za stvaranje kompleksa antigen-antitijelo putem izravnih ili neizravnih reakcija, što rezultira kvantitativnom i kvalitativnom analizom.

ELISA je temeljni imunološki test jer može otkriti i najmanje količine antigena u ispitivanom uzorku. Za mjerenje intenziteta prenesene boje, enzimu se uvodi kromogeni supstrat. Ta se boja zatim očitava kroz čitače mikrotitarskih ploča koji mjere apsorpciju svjetla. Obično se ovaj postupak provodi na polistirenskim pločama s 96 jažica. Test se može izvesti pomoću nekoliko metoda uključujući izravnu, neizravnu, kompetitivnu i metodu mikrotitarske ploče, koja je također poznata kao sendvič ELISA [Sakamoto i sur., 2018; Kohl i sur., 2017].

Metoda sendvič ELISA uključuje vezanje dva antitijela na antigen koji se testira. Za određivanje koncentracije antigena potrebno je koristiti poznato protutijelo. Proces započinje premazivanjem jažica mikrotitarske ploče antitijelom za "hvatanje", nakon čega slijedi pranje kako bi se uklonio sav višak antitijela koja se nisu vezala na jažice. Antitijelo za "hvatanje" ima poznatu sposobnost vezanja na antigen koji se testira. U sljedećem koraku, uzorak urina ili seruma dodaje se u jažice mikrotitarske ploče koja je obložena antitijelom. To uzrokuje reakciju između testiranog antigena i antitijela koje je vezano za jažice, što rezultira stvaranjem kompleksa antigen-antitijelo. Višak nanesenog uzorka zatim se uklanja ponovnim pranjem jažica. U trećem koraku procesa uvodi se enzimski obilježeno protutijelo za detekciju. Ovo se protutijelo veže na antigen koji se nalazi u jažicama mikrotitarske ploče za koje je prethodno vezano protutijelo. Na kraju se dodaje podloga. Preporuča se provesti barem dva ili tri testa i snimiti zvuk kako bi se dobila bolja statistička analiza. Budući da kompleks antigen-protutijelo stvara različite stupnjeve bojenja u kromogenoj reakciji, apsorbancija se može mjeriti pomoću čitača mikrotitarskih ploča. Za određivanje koncentracije mora se konstruirati standardna krivulja na temelju očitavanja apsorbancije [Crowther, 2009].

Za ovo istraživanje korišten je komercijalni ELISA kit za detekciju S100A8/S100A9 Heterodimer Immunoassay, odnosno za detekciju koncentracije proteina S100A8/S100A9 u serumu. Raspon detekcije za S100 proteine bio je između 0,6 i 40 ng/mL, a osjetljivost 0,215 ng/mL. Čitač mikropločica mjeri apsorbanciju na 450 nm s mogućom korekcijom valnih duljina na 540 nm do 570 nm. U tu svrhu korištena je metoda kvantitativne enzimske imunološke analize (sendvič ELISA) za otkrivanje prisutnosti ljudskog heterodimera S100A8/S100A9. Uzorci seruma pohranjeni su na -70 °C i obrađeni u skladu s prethodno navedenim postupkom. Kako bi se sačuvali proteini uzorci seruma su postupno otapani na ledu.

Komplet sadrži nerazrijeđeni humani S100A8/S100A9 heterodimerni standard (40 ng/mL), dok je kalibratorski razrjeđivač RD5-10 s nultim standardom (0 ng/mL). Prema uputama proizvođača prije uporabe svi reagensi su stavljeni na sobnu temperaturu. Uzeta je u obzir visoka endogena razina S100A8/S100A9, te su uzorci seruma 200 puta razrijeđeni. To je postignuto kombiniranjem 20 µL uzorka sa 180 µL razrjeđivača kalibratora RD5-10. Da bi dobili osnovnu otopinu od 40 ng/mL, pomješan je heterodimerni standard S100A8/S100A9 s kalibratorskim razrjeđivačem RD5-10. Uz lagano miješanje prije nego što se napravi

razrjeđenje, standard je pomiješan i ostavljen da odstoji 15 minuta. Razrjeđivanje je dovršeno dodavanjem 10 µL razrijeđenog uzorka u 190 µL razrjeđivača kalibratora RD5-10. Za pripremu 500 mL pufera za ispiranje dodano je 20 mL koncentrata pufera za ispiranje u destiliranu vodu. Unutar 15 minuta od upotrebe pomiješan je reagens za boju (A i B) u jednakim količinama te je držan u odsutstvu svjetlosti. Dobiveno je 200 µL reagensa za svaku jažicu. U svaku epruvetu s pipetom je dodano 200 µL razrjeđivača kalibratora RD5-10.

U svaku jažicu je dodano 50 µL razrjeđivača za analizu RD1-34, a zatim 50 µL standarda. Mikrotitarska ploča je potom inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi na horizontalnoj orbitalnoj mućkalici za mikropločice postavljenoj na 500 ± 50 okretaja u minuti. Zatim je aspirirana svaka jažica, a ploča isprana s 400 µL Pufer za ispiranje. Ukupno je napravljeno 4 ispiranja. U slijedećem koraku dodano je 200 µL humanog S100A8/S100A9 heterodimer konjugata u svaku jažicu, mikroploča je pokrivena i inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja dodano je 200 µL otopine supstrata u svaku jažicu i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetlosti. Na kraju je dodano u svaku jažicu 50 µL stop otopine. Boja u jažicama se promijenila iz plave u žutu.

Za određivanje koncentracije, mikroploča se umetne u uređaj koji mjeri optičku gustoću na 450 nm (OD vrijednost) za svaku jažicu. Izmjerene apsorbancije zatim se pretvaraju u koncentracije na temelju stupnja razrjeđenja. Izrađuje se standardna krivulja, iscrtavajući standardne vrijednosti koncentracije na osi "X" i vrijednosti apsorbancije na osi "Y". Optičke nesavršenosti na ploči su korigirane oduzimanjem očitavanja na 540 nm od očitavanja na 450 nm. Svaki uzorak je učinjen u duplikatu kako bi se izbjegla moguća pogrešna očitavanja.

3.2.5 Enzimski imunološki test (EIA) analiza CRP u krvi

Enzimski imunološki test (EIA) je skupina testova koji koriste sposobnost molekularnog prepoznavanja antitijela, a osnova su enzimi za otkrivanje i mjerenje imunoloških reakcija. Postoje različite vrste EIA, kao što je kompetitivni EIA za antigene, enzimski imunotest za antigene, sendvič EIA za antigene, EIA za antitijela, homogeni EIA za haptene i drugi EIA. Ova metoda uključuje upotrebu enzimski konjugiranog protutijela i dodavanje enzimskog supstrata za vizualizaciju i kvantificiranje rezultata. Ovaj enzimski supstrat poznat je kao kromogen, a to je bezbojna molekula koja se pretvara u obojeni produkt u prisutnosti enzima.

Alkalna fosfataza i peroksidaza hrena ili HRP najčešće su korišteni enzimi u EIA. U nekim EIA metodama supstrat je fluorogen, nefluorescentna molekula koju enzim mijenja u fluorescentni produkt. Od svih EIA metoda, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) je najraširenija. Danas ima široku primjenu u laboratorijskim analizama i dijagnostici za otkrivanje i mjerenje antigena i antitijela. Korištenjem odgovarajućeg EIA moguće je brzo kvantificirati različite analite, uključujući one prisutne u vrlo niskim koncentracijama [Kohl i sur, 2017; Lequin, 2005].

U ovom istraživanju je korištena metoda sendvič EIA (DRG® TM-CA 125 ELISA (EIA-5072)). TM CA 125 ELISA detektira CA 125 reaktivne determinante na serumskom glikoproteinu molekularne težine 200-1000 kDa. DRG TM-CA 125 je enzimski imunotest za mjerenje CA 125 u serumu i plazmi.

Prilikom izvođenja važno je napraviti standardnu krivulju. U mikrotitarsku ploču s jažicama stavljeno je 50 μ L standarda u svaku jažicu ispitivanog i kontrolnog uzorka. Nakon toga, je u svaku jažicu nanoseno 50 μ L enzimskog konjugata i temeljito promješano u trajanju od 10 sekundi kako bi osigurali adekvatno miješanje. Potom se je mikrotitarska ploča s enzimskim konjugatom odstajala 60 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedi ispiranje jažica razrijeđenom otopinom za ispiranje. Postupak je ponovljen tri puta a u svaku jažicu je prilikom ispiranja stavljeno 300 μ L otopine za ispiranje. U slijedećem koraku dodano je 100 μ L otopine supstrata u svaku jažicu i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi. Za zaustavljanje enzimske reakcije dodano je po jažici 100 μ L stop otopine. Na kraju postupka unutar 10 minuta nakon dodavanja stop otopine određena je apsorbancija (OD) svake jažice na 450 \pm 10 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča. Za izračunavanje rezultata koncentracija uzoraka očitana je izravno iz standardne krivulje.

3.2.6 Statističke metode

Deskriptivna analiza relevantnih podataka sažeta je u vrijednostima N, postotcima, srednjim vrijednostima (M) i standardnim devijacijama (sd). Da bi se utvrdile razlike u pojedinim varijablama korišten je Student t-test, hi-kvadrat test (χ^2) i Mann Whitney U test (Z vrijednost). Korišten je prag značajnosti od $p < .05$. Analiza podataka izvršena je pomoću Stat.Soft.12.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

4. Rezultati

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 94 bolesnika s osteoartritisom kuka (N=49) i koljena (N=45). Sudionici istraživanja su uglavnom žene (77.6% žena) i muškarci (22.4% muškaraca) (Tablica 1). Nema značajne razlike u omjeru ispitanika ženskog i muškog spola ($\chi^2=0.27$, $p=0.60$) između pacijenata sa osteoartritisom kuka i osteoartritisom koljena. Također, nema značajne razlike u dobi ($t=-1.56$, $p=0.73$) između pacijenata sa osteoartritisom kuka i osteoartritisom koljena.

U usporedbi ostalih kliničkih podataka između pacijenata sa osteoartritisom kuka i osteoartritisom koljena dobivene su značajne razlike u koncentraciji Albumina ($Z=-2.32$; $p=0.02$), Alfa 1 globulinu ($Z=-3.49$; $p<0.001$), Alfa 2 globulinu ($Z=-4.53$; $p<0.001$), Beta globulinu ($Z=-4.01$; $p<0.001$), Gama globulinu ($Z=-3.25$; $p<0.001$) i HMGB1 ($Z=-3.12$; $p<0.001$). Koncentracija svih navedenih parametara veća je kod bolesnika s osteoartritisom koljena (Tablica 1).

Tablica 1 Demografski i klinički podaci bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena.

	Kuk M±sd	Koljeno M±sd	Ukupno M±sd	Test	p
N	49	45	94	-	-
Žensko/Muško (n)	37/12	36/9	73/21	$\chi^2=0.27$	0.60
Dob (godine)	63.00±6.04	64.91±5.74	63.19±5.94	t=-1.56	0.73
Dob (raspon)	51-75	51-74	51-75	-	-
SE mm/h	17.87±9.84	19.25±15.20	18.54±12.69	Z=0.20	0.84
CRP mg/L	2.73±1.93	7.10±19.75	4.66±13.92	Z=-1.82	0.07
Hematokrit L/L	0.41±0.04	0.42±0.04	0.41±0.04	Z=-1.81	0.07
TRC x10 ⁹ /L	245.52±61.61	260.95±58.58	252.90±60.35	Z=-1.47	0.14
L x10 ⁹ /L	7.06±2.48	7.21±2.44	7.14±2.45	Z=-0.23	0.81
Albumin g/L	43.38±4.31	48.89±9.30	46.01±7.59	Z=-2.32	0.02*
Alfa 1 globulini g/L	2.92±0.43	3.45±0.74	3.17±0.65	Z=-3.49	0.00**
Alfa 2 globulini g/L	7.35±1.16	9.15±1.88	8.20±1.78	Z=-4.53	0.00**
Beta globulini g/L	8.11±1.05	9.66±1.79	8.84±1.63	Z=-4.01	0.00**
Gama globulini g/L	10.56±1.91	13.41±5.51	11.90±4.25	Z=-3.25	0.00**
Omjer A/G	1.51±0.21	1.42±0.24	1.47±0.23	Z=1.64	0.10
VAS boli	4.93±1.79	5.5±2.37	5.20±2.09	Z=-1.79	0.07
WOMAC bol	9.84±3.18	9.02±4.68	9.45±3.97	Z=0.82	0.41
WOMAC ukočenost	4.08±1.63	3.28±2.00	3.70±1.85	Z=1.65	0.10
WOMAC ASŽ	33.06±11.95	31.40±13.80	32.27±12.82	Z=0.41	0.68
sRAGE ng/ml	566.76±223.89	499.97±187.11	536.91±209.73	Z=1.17	0.24
HMGB1 ng/ml	7.11±14.64	21.72±35.08	13.64±26.69	Z=-3.12	0.00**
Human S100a8/A9	664.88±389.09	1227.06±1753.48	916.21±1231.3	Z=0.59	0.55
Heterodimer ng/ml					

Abbreviations: SE -; CRP -; TRC -; A/G -; VAS -; WOMAC -; *p>0.05; **p<0.001

KUK-KOLJENO-KONTROLA

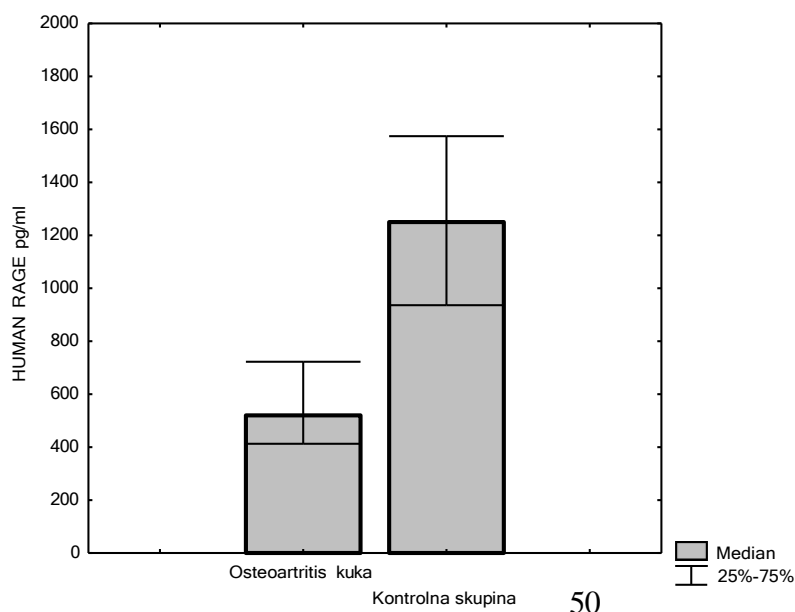
U usporedbi serumske koncentracije HMGB1 i sRAGE u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena neovisno o stupnju težine bolesti s kontrolnom skupinom (N=96) dobivene su značajne razlike (Tablica 2). Pacijenti s osteoartritisom kuka imaju manju serumske koncentracije sRAGE (Z=-7.18, p<0.001) (Slika 1) a veću HMGB1 (Z=7.22, p<0.001) (Slika

2) od kontrolne skupine. Također, pacijenti s osteoartritisom koljena imaju značajno manju serumsku koncentraciju sRAGE ($Z=-7.13$, $p<0.001$) (Slika 3) a veću HMGB1 ($Z=7.17$, $p<0.001$) (Slika 4) od kontrolne skupine.

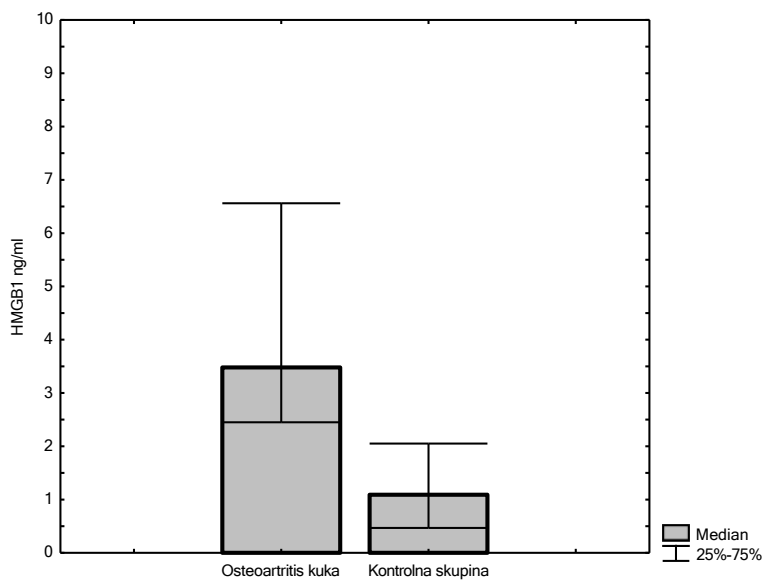
Tablica 2 Razlike serumskih koncentracija kod pacijenata s osteoartritisom kuka/koljena u odnosu na kontrolne ispitanike

	Kuk M±sd	Koljeno M±sd	Kontrola M±sd	Test1 Kuk- kontrola	Test2 Koljeno - kontrola
sRage ng/ml	566.76±223.89	499.97±187.11	1273.87±589.82	Z=-7.18 p<0.001	Z=-7.13 p<0.001
HMGB1 ng/ml	7.11±14.64	21.72±35.08	1.64±2.45	Z=7.22 p<0.001	Z=7.17 p<0.001
Human S100a8/A9 ng/ml	664.88±389.09	1227.06±1753.48	678.02±471.03	Z=0.19 p=0.84	Z=-0.35 p=0.72

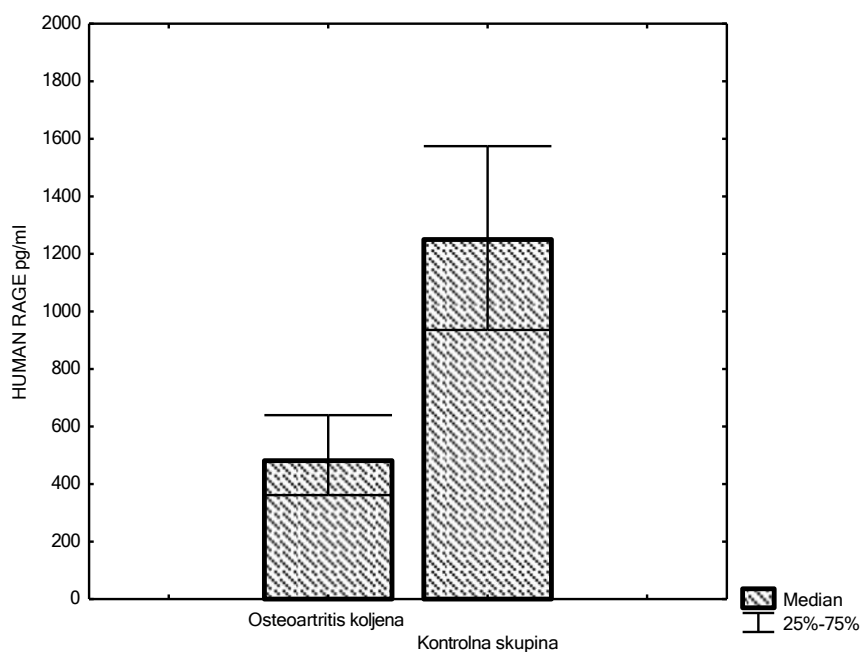
Slika 1. Koncentracija sRAGE (pg/ml) kod pacijenata s osteoartritisom kuka i kontrolne skupine



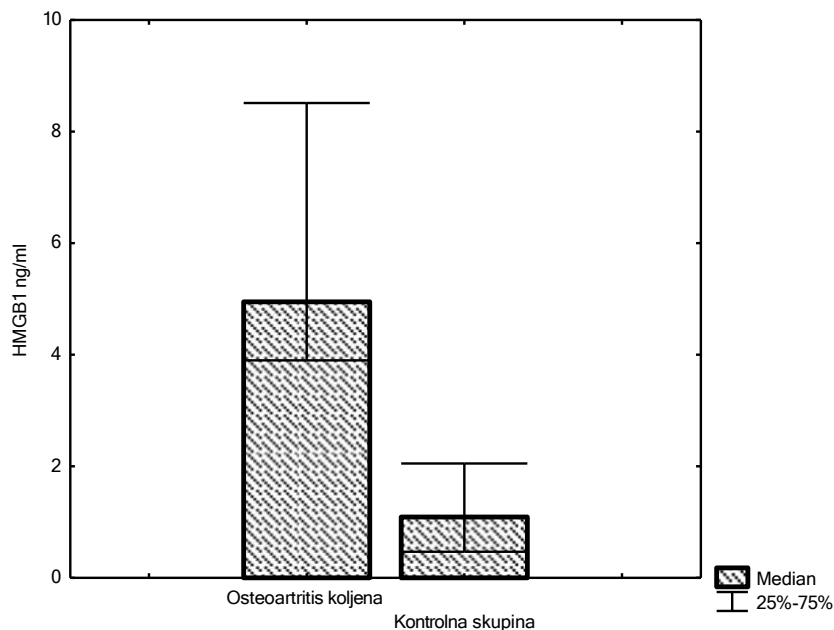
Slika 2. Koncentracija HMGB1 (ng/ml) kod pacijenata s osteoartritisom kuka i kontrolne skupine



Slika 3. Koncentracija Human Rage (pg/ml) kod pacijenata s osteoartritisom koljena i kontrolne skupine



Slika 4. Koncentracija HMGB1 (ng/ml) kod pacijenata s osteoartritisom koljena i kontrolne skupine



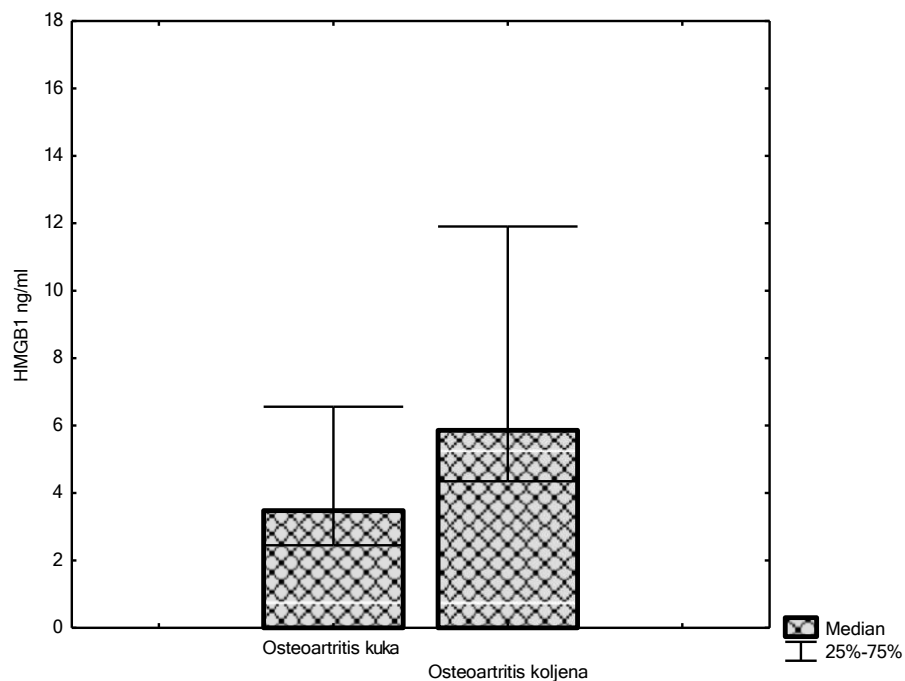
KUK - KOLJENO

U usporedbi serumskih koncentracija u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena neovisno o stupnju težine bolesti dobivene su značajne razlike za HMGB1 (Tablica 3). Pacijenti s osteoartritisom koljena imaju značajno veće serumske koncentracije HMGB1 ($Z=-3.12$, $p<0.01$) od pacijenata sa osteoartritisom kuka (Slika 5).

Tablica 3. Razlike serumskih koncentracija kod pacijenata s osteoartritisom kuka i koljena

	Kuk M±sd	Koljeno M±sd	Test1 Kuk-koljeno
HUMAN RAGE ng/ml	566.76±223.89	499.97±187.11	Z=1.16 p=0.24
HMGB1 ng/ml	7.11±14.64	21.72±35.08	Z=-3.12 p<0.01*
Human S100a8/A9 ng/ml	664.88±389.09	1227.06±1753.48	Z=0.59 p=0.55

Slika 5. Koncentracija HMGB1 (ng/ml) kod pacijenata s osteoartritisom kuka i koljena



Usporedbe obzirom na Kellgren - Lawrence skalu

U usporedbi kliničkih podataka bolesnika s blagim stupnjem osteoartritisa kuka i oeoartritisom koljena (stupanj 1. i 2. prema Kellgren - Lawrence skali) s pacijentima s teškim stupnjem osteoartritisa kuka i koljena (stupanj 3. i 4. prema Kellgren - Lawrence skali) nisu dobivene značajne razlike u nijednom parametru (Tablica 4).

Tablica 4. Usporedbe kliničkih podataka bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena obzirom na stupanj osteoartritisaprema Kellgren - Lawrence skali

	Kellgren - Lawrence skala				Z	P
	1.i 2.		3.i 4.			
SE mm/h	17.61	10.04	19.17	14.25	-0.27	0.79
CRP mg/L	3.17	3.76	5.64	17.65	-0.67	0.50
Hematokrit L/L	0.41	0.03	0.41	0.04	0.45	0.65
TRC $\times 10^9/L$	251.72	55.56	253.66	63.72	-0.35	0.72
L $\times 10^9/L$	6.73	1.60	7.40	2.85	-0.86	0.39
Albumin g/L	46.13	6.88	45.93	8.16	0.56	0.58
Alfa 1 globulini g/L	3.11	0.55	3.22	0.72	-0.37	0.71
Alfa 2 globulini g/L	8.05	1.40	8.31	2.03	-0.32	0.75
Beta globulini g/L	8.74	1.63	8.92	1.65	-0.52	0.60
Gama globulini g/L	12.95	5.79	11.14	2.40	1.36	0.17
Omjer A/G	1.46	0.18	1.48	0.26	-0.33	0.74
VAS boli	5.42	2.16	5.06	2.06	0.72	0.47
WOMAC bol	9.47	4.07	9.44	3.94	0.24	0.81
WOMAC ukočenost	3.67	1.79	3.73	1.91	-0.21	0.84
WOMAC ASŽ	30.11	11.92	33.77	13.32	-1.35	0.18
HUMAN RAGE ng/ml	534.14	212.10	538.50	210.35	-0.36	0.72
HMGB1 ng/ml	21.84	35.68	8.93	18.64	1.11	0.27
Human S100a8/A9 Heterodimer ng/ml	1182.16	1507.35	763.54	1025.68	1.02	0.31

Abbreviations: SE - ; CRP - ; TRC - ; A/G - ; VAS - ; WOMAC - ; KL -

U analizi rezultata navest ćemo i povišenu koncentraciju albumina (g/L):

Vrijednosti su značajno povišene kod OA koljena u usporedbi s OA kuka (48.89 ± 9.30 naspram 43.38 ± 4.31 , $p=0.02^*$).

Alfa 1 globulini (g/L): značajno su povišeni kod OA koljena u usporedbi s OA kuka (3.45 ± 0.74 naspram 2.92 ± 0.43 , $p<0.001$).

Alfa 2 globulini (g/L): značajno povišeni kod OA koljena (9.15 ± 1.88) naspram OA kuka 7.35 ± 1.16 , $p<0.001$).

Beta globulini (g/L): više vrijednosti u OA koljena (9.66 ± 1.79) naspram OA kuka (8.11 ± 1.05 , $p<0.001$).

Gama globulini (g/L): značajno viši kod OA koljena (13.41 ± 5.51 naspram OA kuka ($z0.56 \pm 1.91$, $p<0.001$).

Povišene vrijednosti globulina mogu odražavati imunološku aktivaciju i sistemska upalu, izraženiju kod OA koljena.

HMGB1 (ng/ml): značajno viša koncentracija HMGB1 u pacijenata s OA koljena u usporedbi s OA kuka (21.72 ± 35.08 naspram 7.11 ± 14.64 , $p < 0.001$).

Ovo ukazuje na veću upalnu aktivnost i tkivnu destrukciju u OA koljena. Parametri bez značajne razlike između OA kuka i koljena su:

sRAGE (ng/ml): vrijednosti su slične između OA kuka (566.76 ± 223.89) i OA koljena (499.97 ± 187.11), bez statistički značajne razlike ($p = 0.24$).

Ovo sugerira da razina sRAGE nije specifično povezana s razlikama u zglobnim lokacijama kod OA.

Human S100A8/A9 Heterodimer (ng/ml):

Nema značajne razlike između OA kuka (664.88 ± 389.09) i OA koljena (1227.06 ± 1753.48), $p = 0.55$.

Ovo ukazuje na varijabilnost ovog biomarkera bez jasne povezanosti s lokalizacijom OA.

VAS boli, WOMAC skale:

Parametri boli, ukočenosti i funkcionalnog statusa (VAS, WOMAC bol, ukočenost i ASŽ) pokazali su značajne razlike između 1. i 3. stupnja OA kuka i koljena prema Kellgren - Lawrence skali u odnosu na 2. i 4. stupanj.

Postoje značajne razlike u povišenju SE albumina, alfa 1, alfa 2, beta i gama globulina u 1 i 3 fazi OA kuka i koljena u odnosu na 2 i 4 fazu prema Kellgren -Lawrence klasifikaciji.

5. RASPRAVA

Kao što smo u uvodu naveli, osteoarthritis (OA) se svrstava u neupalne artritise, no dihotomija između upalnog i degenerativnog artritisa postaje sve manje jasna s prepoznavanjem obilja tekućih imunoloških procesa unutar OA zgloba i sinovije. Sinovitis je upala sinovijalne membrane i karakteristična je za klasične upalne artritise i sve se više priznaje prisutnost sinovitisa u značajnom udjelu pacijenata s primarnim OA. Klinički OA nije jedna bolest, nego konačni "zajednički put" koji je sekundaran mnogim predisponirajućim čimbenicima, osobito starosti, traumi u zglobovima, promijenjenoj biomehanici i pretilosti [Sokolove i sur., 2013]. U ovom istraživanju bilo je uključeno 94 ispitanika podijeljenih u 4 skupine prema Kellgren - Lawren klasifikaciji: prva skupina je obuhvaćala ispitanike 1. i 2. stupnja OA kuka prema Keellgren - Lawren klasifikaciji, druga skupina 1. i 2. stupanj OA koljena, 3. skupina ispitanike s 3. i 4. stupnja OA kuka i četvrta skupina ispitanike s 3. i 4. stupnjem OA koljena. Kontrolnu skupinu činilo je 96 ispitanika kod kojih su isključni kriteriji bili istovremena prisutnost simptoma OA kuka i koljena, povišene vrijednosti upalnih laboratorijskih vrijednosti (SE, CRP), OA šaka u evolutivnoj fazi, recentna mišićno - koštana trauma i upalna reumatska bolest, čime su se isključili ispitanici s mogućim povećanim upalnim parametrima i procese koji bi mogli utjecati na povišenje koncentracije ispitivanih proteina u plazmi ispitanika.

Potvrda navedenih isključnih kriterija vidi se u istraživanju Barreta i sur. 2020. gdje traumatske ozljede akumulirane tijekom vremena mogu dovesti do otpuštanja DAMP-a hrskavice koji potom mogu aktivirati reakciju lokalnog urođenog imunološkog sustava. Posljedično, upalni putevi se mogu aktivirati u rezidentnim stanicama i matricama što dovodi do regulacije nekoliko matriksa hrskavice koje razgrađuju proteaze kao što su matrične metaloproteaze (MMP)-1, MMP-3, MMP-13 i ADAMTS agrekanaze, dok također smanjuju regulaciju agrekana i kolagena tipa II, obrazac koji se općenito vidi u OA hondrocitni fenotip. Obrasci ekspresije ovog gena unutar zglobnih hondrocita posredovani su višestrukim unutarstaničnim putovima, kao što su MAC, MAP kinaze i putevi nuklearnog faktora- κ B. Ovo međudjelovanje između mehaničkih trauma, okolišnih čimbenika, potenciranih genetskom predispozicijom i drugim čimbenicima rizika, uzrokovano upalom potaknutom urođenim imunološkim odgovorom i poremećenim popravkom hrskavice, jedna je od promjena paradigme teorije o patogenezi OA.

HMGB1 i S100A8/A9 su povećani kao neposredan odgovor na traumu koljena. Iako dijele mnoge značajke u upalnim i imunoregulacijskim mehanizmima, S100A8/A9 i HMGB1 povezani su s različitim nizvodnim odgovorima, koji mogu utjecati na napredovanje OA nakon akutnih ozljeda koljena (Aulin i sur., 2022).

Kao što je prethodno navedeno, osvrnut ćemo se i na druge slične spoznaje. Yang i suradnici 2022. ukazuju da izvanstanična DNA vezanu na HMGB1 stanice može endocitizirati putem RAGE kako bi dospjele do srodnih DNA receptora poput endosomalnog TLR9 ili citoplazmatskog cGAS-a ili AIM2 inflammasomskog kompleksa. Ova biologija može imati štetne učinke kod izbijanja lupusa ili kao odgovor na veliku traumu. Sustav staničnog uvoza potpomognut HMGB1/RAGE stoga obavlja važnu zadaću upozoravajući stanice na opasno okruženje. HMGB1 je alarm s dvostrukom funkcijom - upozorava izvanstaničnu okolinu o stanicama u nevolji i obavještava stanice o opasnoj izvanstaničnoj okolini.

Rad Delrue i suradnika iz 2023. godine analizira moguću ulogu sRAGE u upalnim reumatskim bolestima. Krajnji proizvodi napredne glikacije (AGE) su klasa spojeva nastalih neenzimskim interakcijama između reducirajućih šećera i proteina, lipida ili nukleinskih kiselina. AGE mogu promijeniti strukturu proteina i aktivirati jedan od svojih receptora, posebno receptor za napredne krajnje proizvode glikacije (RAGE). Ovi fenomeni oštećuju funkcije stanica, izvanstaničnog matriksa i tkiva. RAGE se izražava u raznim stanicama i povezuje se s kroničnim upalnim autoimunim poremećajima kao što su reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus i Sjögrenov sindrom. Topljivi (s)RAGE produkt je cijepanja od 48 kDa koji zadržava mjesto vezanja liganda, ali gubi transmembransku i signalnu domenu. Djelujući kao mamac, ovaj topljivi receptor inhibira proupalne procese posredovane RAGE-om i njegovim ligandima. sRAGE smanjuje imunološki upalni odgovor uzrokovan HMGB-1. Nadalje, mezenhimalne matične stanice (MSC) su privlačna sredstva za staničnu terapiju RA. Iako su MSC imunosupresivi u upalnim poremećajima, oni također igraju ulogu u upalnom procesu i indukciji imunoloških odgovora. U eksperimentalnom mišjem modelu upalnog artritisa, sRAGE-MSC-i su generirani DNA transfekcijom MSC-a izvedenih iz ljudskog masnog tkiva (Ad-hMSCs). sRAGE-MSC proizvodi značajno manje proupalnih molekula (faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF), interleukin-1 (IL-1), IL-6 i HMGB-1) u usporedbi s MSC u upalnim stanjima. sRAGE-MSC oslabili su reumatoidnu upalu recipročnom regulacijom Th17 i Treg stanica. Ovi nalazi sugeriraju da prekomjerna ekspresija sRAGE-a u

Ad-hMSC može inhibirati upalu i pospješiti imunoregulacijsku funkciju uz očuvanje njihovih jedinstvenih svojstava.

HMGB1 je uključen u različite autoimune bolesti, kao što su sistemski eritematozni lupus (SLE), idiopatske upalne miopatije i reumatoidni artritis (Dong i sur., 2022).

U našem istraživanju određen je HMGB1 te S100 A8/A9 i njihov receptor sRAGE u perifernoj krvi metodom ELISE. Prema dobivenim rezultatima utvrđena je povišena serumska koncentracija HMGB1 kod osteoartritisa koljena u odnosu na ispitanike s osteoartritisom kuka te povišena koncentracija HMGB1 u ispitanika s osteoartritisom kuka i koljena u odnosu na kontrolnu skupinu.

Koljeno je površinom veći zglob te sam proces OA i DAMP molekule koje se oslobađaju kod koljena su povišene razine. To pokazuje i istraživanje Rosenberg i suradnika iz 2017. godine prema kojima zglob koljena doživljava više mehaničkog opterećenja, degeneracije hrskavice i upale nego zglob kuka. To bi moglo pridonijeti povećanoj incidenciji OA u zglobu koljena. Molekularni obrasci povezani s oštećenjem (DAMP), uključujući box-1 skupine visoke pokretljivosti, receptor za napredne krajnje produkte glikacije i alarmine (S100A8 i S100A9), otpuštaju se u zglobu kao odgovor na oštećenje hondrocita i hrskavice uzrokovano stresom. To olakšava povećanu degradaciju hrskavice i upalu u zglobu. Studije su dokumentirale ulogu DAMP-a u patogenezi OA; međutim, usporedba DAMP-a i njegov utjecaj na OA nije raspravljana. Analizirajući DAMP između OA zglobova koljena i kuka, pronašli smo značajnu razliku u razinama DAMP izraženih u zglobu koljena u usporedbi s zglobom kuka. Povećane razine DAMP-a ukazuju na razliku u temeljnoj patogenezi OA u koljenu i kuku i ističu DAMP-ove kao potencijalne terapijske mete za OA u budućnosti.

Povišena razina HMGB1 i sRAGE može ukazivati na upalnu patogenezu osteoartritisa, što dokazuje da proupalni alarmin HMGB1 i sRAGE kao medijatori prirođenog imunogenog odgovora mogu biti uključeni u imunopatogenezu osteoartritisa. Terada i sur. navode da na taj način dobiveni rezultati doprinose mišljenju da imunogeni sustav sudjeluje u imunopatogenetskom mehanizmu osteoartritisa.

HMGB1 je multifunkcionalni protein ovisan o položaju (Chen i sur., 2022). Unutar stanice, nuklearni HMGB1 regulira strukturu i funkciju kromosoma, dok citoplazmatski HMGB1

održava autofagiju. Izvan stanice, HMGB1 je posrednik upale, imuniteta i metaboličkog odgovora. Otpuštanje HMGB1 povezano je s aktivnim ili pasivnim procesima i može se prilagoditi na različitim razinama. Konkretno, ROS i redoks signali igraju središnju ulogu u pokretanju sekrecije i otpuštanja HMGB1 spajanjem različitih posttranslacijskih modifikacija. U OA koncentracija HMGB1 posredovana s IL-1 β značajno je povišena u zglobnim tkivima i hondrocitima. Apoptoza stanica je inhibirana molekulom HMGB1. Smanjena koncentracija HMGB1 otvara prostor za prekomjernu ekspresiju mRNA, putem TLR povećava ekspresiju matriksmetaloproteinaze (MMP) i potiče upalu u hondrocitima [Wang i sur., 2020]. Ekspiriranjem u izvanstanični prostor HMGB1 potiče upalu aktiviranjem puta NF- κ B i vezanjem na TLR2, TLR4, TLR9 i RAGE [Roh i sur., 2018; Sun i sur., 2016]

Palumbo i suradnici (2023) također su utvrdili kako alarmini igraju ključnu ulogu u patogenezi OA, odnosno, HMGB1, IL-33 i S100B ukazuju na veći izražaj u hondrocitima OA u usporedbi s normalnom hrskavicom. Važno je da postoji mnogo više podataka dostupnih u znanstvenoj literaturi za HMGB1 nego za druge alarmine, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se dublje utvrdili njihovi mehanizmi u kaskadi bolesti.

HMGB1 može se smatrati novim prozorom u patogenezi, fokusirajući se na otkrivanje, praćenje, upravljanje i liječenje OA.

Osvrnut ćemo se i na druga provedena istraživanja. Fu i sur. (2016) su istraživali protuupalne učinke i mehanizam HMGB1 inhibitora HMGB1 A-box na ljudske hondroците stimulirane IL-1 β i dokazali da prekomjerni izražaj HMGB1 A-boxa inhibira napredovanje bolesti slabljenjem ekspresije MMP-a i medijatore upale u hondrocitima izazvanim IL-1 β putem HMGB1/TLR4/NF- κ B puta. Navedeno istraživanje je prvo koje pokazuje protuupalnu aktivnost prekomjernog izražaja HMGB1 A-boxa u ljudskim hondrocitima. Prekomjerni izražaj HMGB1 A-boxa smanjila je IL-1 β -inducirani izražaj MMP-a i proizvodnju upalnih medijatora u ljudskim hondrocitima.

Zhong i sur. (2020) su utvrdili da HMGB1 ne samo da je povećao ekspresiju RAGE-a u citoplazmi i plazma membrani, već je također povećao ekspresiju TLR4 u plazma membrani. Izbacivanje RAGE-a dovelo je do smanjene aktivacije MAPK, ekspresije TLR4 stanične membrane i odgovarajućeg stvaranja upalnih citokina. U međuvremenu, inhibicija MAPK aktivacije također je smanjila površinsku ekspresiju TLR4. Ovi rezultati pokazuju da se

HMGB1 može vezati na RAGE receptore stanične površine na površini stanice, što dovodi do aktivacije MAPK, čime se potiče translokacija TLR4 na površini stanice, ali ne regulira njegovu transkripciju i translaciju. Nasuprot tome, TLR4 može povećati transkripciju i translaciju RAGE, koji se prenosi na površinu stanice i može se vezati za više HMGB1. Receptori na površini stanice TLR4 i RAGE vežu se za HMGB1, što dovodi do transkripcije i izlučivanja upalnih citokina. Isti rezultati bili su u modelu pseudofraktuure kod miševa, koji je usko povezan s upalnim odgovorom izazvanim HMGB1. Svi ovi rezultati pokazali su da je međudjelovanje između RAGE i TLR4 kritično za upalni odgovor izazvan HMGB1.

Nadalje, Xiao i suradnici (2021) ističu kako dosadašnji rezultati daju novi uvid u ulogu lučenja HMGB1 u patogenezi KOA. Trenutačni *in vitro* eksperimenti pokazali su da NLRP1 i NLRP3 upalom posredovana FLS piroptoza pojačava izlučivanje HMGB1. Stoga, smanjenje FLS piroptoze inhibicijom aktivacije NLRP1 i NLRP3 inflamasoma i kaspaze-1 može biti učinkovita strategija za liječenje KOA.

Uz navedeno, rezultati istraživanja koje su proveli Shao i suradnici (2023) godine, pokazuju da je HMGB1 potencijalni biljeg za predviđanje ozbiljnosti TMJOA. Intraartikularna injekcija HA ima pozitivan terapijski učinak na TMJOA, međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdio njegov terapijski učinak u kasnoj fazi tretmana viskosuplementacije.

U našem istraživanju pratili smo koncentraciju sRAGE. RAGE je multiligandni stanični površinski receptor za prepoznavanje uzoraka koji pripada superobitelji imunoglobulina. Krajnji produkti napredne glikacije (AGE), koji nastaju iz neenzimske glikacije i oksidacije proteina, lipida i nukleinskih kiselina, prvi su opisani ligandi RAGE, po čemu je ovaj receptor dobio ime. Tijekom godina nakon otkrića postalo je sve više priznato da RAGE veže i razne druge ligande, uključujući molekule izvedene iz stresiranih ili oštećenih stanica — npr. amiloidni β peptid, visokomobilna skupina box 1 (HMGB1) i S100 proteini — zajednički poznati kao molekularni obrasci povezani s oštećenjem (DAMP), molekule stanične adhezije — npr. β 2 integrin MAC-1 — i molekule koje potječu iz bakterija, virusa i parazita. Kao takav, RAGE igra važnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru i kao medijator proupalnih procesa. Nakon vezanja liganda, unutarstanična signalizacija posredovana RAGE-om može dovesti do povećanja proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i do kontinuirane aktivacije faktora transkripcije NF κ B. Potonji stimulira ekspresiju proupalnih

modulatora (npr. IL1- β , VCAM-1 i TNF- α) i samog RAGE, čime se osigurava mehanizam pozitivne povratne sprege za pojačavanje upalnog odgovora (Erusalimsky, 2021).

U našem istraživanju dobili smo smanjenu koncentraciju sRAGE u serumu ispitanika s osteoartritisom kuka i koljena u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlika u koncentraciji u serumu ispitanika sa zglobom kuka u odnosu na zglob koljena nije statistički značajna.

U istraživanju autora Chayanupatkul i Honsawek (2010) trideset i šest ispitanika s OA i 15 zdravih kontrolnih ispitanika bilo je uključeno u ovu studiju. Klasifikacija OA provedena je pomoću Kellgren-Lawrenceove klasifikacije. Razine sRAGE u plazmi i sinovijalnoj tekućini analizirane su enzimski imunoanalizom. Rezultati su ukazali kako su razine sRAGE u plazmi bile značajno niže u pacijenata s OA nego u zdravih kontrola. Razine sRAGE u plazmi bile su statistički značajno više u odnosu na uparenu sinovijalnu tekućinu. Dodatno, koncentracije sRAGE u plazmi i sinovijalnoj tekućini pokazale su značajnu inverznu korelaciju s težinom bolesti. Daljnja analiza je pokazala da postoji jaka pozitivna korelacija između plazme i sinovijalne koncentracije sRAGE.

Sun i sur, 2016 proveli su istraživanje ekspresije proteina B1 skupine visoke pokretljivosti (HMGB1) i receptora za krajnji produkt napredne glikacije (RAGE) kod osteoartrisa koljena (KOA) i njegovog kliničkog značaja. U eksperimentalnu skupinu uključeno je ukupno 108 sinovijalnih tkiva odabranih od bolesnika s KOA. U kontrolnu skupinu uključeno je 75 sinovijalnih tkiva zglobova koljena, odabranih od bolesnika kod kojih je klinički i patološki potvrđeno da nema lezije zglobova. Ekspresije mRNA i proteina HMGB1 i RAGE određene su pomoću RT-PCR odnosno imunohistokemije. Western blot je korišten za mjerenje relativne ekspresije proteina. Broj pozitivnih stanica i intenzitet pozitivne ekspresije HMGB1 i RAGE u sinovijalnom tkivu bili su veći u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj skupini. PI za ekspresiju HMGB1 i RAGE u bolesnika s KOA bio je u pozitivnoj korelaciji s kliničkom klasifikacijom rendgenskih nalaza ($P < 0,05$). Ekspresija HMGB1 i RAGE mRNA, kao i relativna ekspresija proteina HMGB1 i RAGE u sinovijalnom tkivu, bile su veće u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj skupini (sve $P < 0,05$). Osjetljivost HMGB1 proteina, RAGE proteina, HMGB1 mRNA i RAGE mRNA bila je 76,9%, 64,8%, 86,1%, odnosno 64,8%; a specifičnost je bila 100%, 96%, 74,7%, odnosno 80%. Ekspresija proteina i mRNA HMGB1 i RAGE povećana je u bolesnika s KOA, što sugerira da su uključeni u KOA.

U radu Schen i suradnika krajnji produkti napredne glikacije (AGE) nastaju neenzimatskim modifikacijama makromolekula (proteina, lipida i nukleinskih kiselina) pomoću saharida (glukoza, fruktoza i pentoza) putem Maillardove reakcije. Formirane AGE molekule mogu se katabolizirati i očistiti glioksalazom I i II u proksimalnim tubularnim stanicama bubrega. Bolesti povezane sa starošću uključuju fiziološko starenje, neurodegenerativne/neuroupalne bolesti, dijabetes melitus (DM) i njegove komplikacije, autoimune/reumatske upalne bolesti, degenerativne bolesti kostiju i kronične bubrežne bolesti. AGEs, vezanjem na receptore za AGE (RAGE), mijenjaju urođene i adaptivne imunološke odgovore kako bi potaknuli upalu i imunosupresiju putem stvaranja proupalnih citokina, reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i reaktivnih dušikovih intermedijera (RNI). Ove patološke molekule uzrokuju oštećenje vaskularnih endotelnih/glatkih mišićnih/stanica vezivnog tkiva i mezangijalnih/endotelnih/podocitnih stanica bubrega u bolestima povezanim s AGE-om.

Temeljem svega prethodno navedenog, može se zaključiti zaštitna uloga sRAGE-a: smanjenje razine sRAGE ukazuje na proupalne procese inhibicijom ključnih signalnih puteva. sRAGE također može ograničiti oksidativni stres, koji je ključan u patogenezi OA.

U našem istraživanju snižene su razine u serumu ispitanika s osteoartritisom kuka i koljena što zahtijeva dodatna istraživanja radi pojašnjenja uloge sRAGE-a u procesu razvoja osteoartritisa, no prema dosadašnjim istraživanjima možemo postaviti tezu da snižene razine sRAGE mogu kontrolirati aktivnost proupalnih liganada i usporavanje procesa razgradnje zglobne hrskavice.

Proteini S100A8 i S100A9 (također poznati kao MRP8 odnosno MRP14) su proteini koji vežu Ca^{2+} i pripadaju obitelji S100. Često postoje u obliku heterodimera, dok homodimera ima vrlo malo zbog stabilnosti. S100A8/A9 se konstitutivno izražava u neutrofilima i monocitima kao Ca^{2+} senzor, sudjelujući u preuređenju citoskeleta i metabolizmu arahidonske kiseline. Tijekom upale, S100A8/A9 se aktivno oslobađa i ima ključnu ulogu u modulaciji upalnog odgovora stimuliranjem regrutiranja leukocita i induciranjem izlučivanja citokina. S100A8/A9 služi kao biomarker kandidat za dijagnozu i praćenje, kao i prediktivni pokazatelj terapijskih odgovora na bolesti povezane s upalom. Kako blokada aktivnosti

S100A8/A9 uporabom inhibitora malih molekula ili antitijela poboljšava patološka stanja u mišjim modelima, heterodimer ima potencijal kao terapijska meta. U ovom radu pružamo sveobuhvatan i detaljan pregled distribucije i bioloških funkcija S100A8/A9 i ističemo njegovu primjenu kao dijagnostički i terapijski cilj u bolestima povezanim s upalom.

Upala je osnovni obrambeni mehanizam u ljudskom tijelu. Razni imunociti i molekule tvore ogromnu regulatornu mrežu tijekom upale, eliminirajući endogene i egzogene patogene tvari kako bi zaštitili tijelo. Međutim, neravnoteža mreže, kao što su prekomjerne upalne reakcije i produljeni upalni status, mogu dovesti do daljnjeg oštećenja tkiva. Već je potvrđeno kako S100A8 i S100A9 igraju odlučujuću ulogu u razvoju upale. Pripadaju obitelji S100, čiji su članovi prvi put ekstrahirani kao neuralni proteini iz goveđeg mozga 1965. Ovi proteini od približno 10 000 Da nazvani su S100 zbog svoje topljivosti u 100% zasićenom amonijevom sulfatu. Ljudski S100A8 i S100A9 sastoje se od 93, odnosno 113 aminokiselinskih ostataka, a S100A9 ima skraćenu izoformu sa 110 aminokiselina. S100A8 i S100A9 otpuštaju neutrofile i monocite, a oni mogu formirati stabilan heterodimer ili homodimer i *in vitro* i *in vivo*. I S100A8 i S100A9 imaju motiv spirala-petlja-heliks s nabijenim aminokiselinskim ostacima, što je uobičajena značajka među članovima obitelji S100, što rezultira njihovim visokim afinitetom za dvovalentne ione, kao što su Ca^{2+} i Zn^{2+} . Kombinacija s dvovalentnim ionima mijenja konformaciju S100A8/A9, što je osnova za vršenje njegovih odgovarajućih funkcija. Štoviše, S100A8/A9 ima dvostruke, ali povezane funkcije u unutarstaničnom i izvanstaničnom mikrookruženju (Wang i sur., 2018).

U našem istraživanju nije povišena koncentracija proteina S100 A8A9 u ispitanika s osteoartritisom kuka i osteoartritisom koljena u odnosu na kontrolnu skupinu.

Alarmini S100A8 i A9 dugo se smatraju markerima destruktivnih procesa u zglobovima. Prethodno poznati kao MRP8 i MRP9 (protein povezan s mijeloidom), ovi su čimbenici pronađeni u visokim razinama u sinovijalnoj tekućini, odražavaju aktivnost leukocita i podudaraju se s progresijom oštećenja zglobova kod reumatoidnog artritisa. Sada postaje jasno kako su ti alarmini također medijatori upale i kako mogu signalizirati putem TLR4. Autori su utvrdili kako je destrukcija hrskavice u eksperimentalnom artritisu smanjena kada je model induciran u miševima s nedostatkom S100A8/9. Nadalje, ekspresija ovih proteina bila je značajno pojačana u artritičnoj hrskavici, a *in vitro* S100A8 pokazuje izravnu moć

stimuliranja kondrocita da proizvode MMP i izazivanja degradacije peristaničnog matriksa posredovane agrekanazom (van den Berg, 2011).

U istraživanju osteoartritisa izazvanom kolagenazom, koji pokazuje izraženu sinovijalnu aktivaciju, S100A8 i S100A9 bili su snažno pojačani u sinoviju 7. dana i ostali su visoki 14., 28. i 42. dana. Nasuprot tome, IL-1 β je eksprimiran samo u ranim fazama. Koristeći S100A9 kod miševa, autori su otkrili veliki utjecaj S100A8 i A9 na sinovijalnu aktivaciju i uništavanje OA hrskavice. Sinovijalna aktivacija bila je 62% manja 42. dana. Razaranje hrskavice bilo je značajno manje na svim površinama i kretalo se od 45% smanjenja u lateralnoj tibiji do 73% smanjenja u femuru. Kada su primarni mišji hondrociti stimulirani sa S100A8 ili S100A9, pronađena je snažna regulacija posebno razine mRNA MMP-3 što ukazuje na izravnu ulogu S100A8/A9 u razaranju hrskavice. Nasuprot tome, u modelu DMM u kojem je sinovijalna zahvaćenost oskudna, nije pronađena uloga S100A8/A9 za žarišnu destrukciju hrskavice (van Lent i sur., 2012).

U radu Schelbergen i sur.¹ veličina osteofita drastično je smanjena koncentracija S100A9 kod miševa u ligamentima i na medijalnoj bedrenoj bedrenoj kosti i tibii u 21. i 42 OA-a inducirane kolagenom, u kojima je sinovirusna aktivacija visoka. Nasuprot tome, veličina osteofita nije smanjena u drugoj skupini S100A9 miševa tijekom destabiliziranog medijalnog meniskusa OA, u kojem je sinovirusna aktivacija oskudna što potvrđuje različite mehanizme u nastanku OA. S100A8 povećana ekspresija i aktivacija matrične metaloproteinaze tijekom mikromasne hondrogeneze, čime se može povećati remodeliranje matrice hrskavice omogućujući veće osteofite. Zanimljivo je kako su rani simptomatski sudionici OA ispitivanja CHECK s progresijom osteofita nakon 2 i 5 godina imali povišene razine S100A8/A9 u plazmi na početku, dok C-reaktivni protein, brzina sedimentacije eritrocita i protein oligemernog matriksa hrskavice nisu bili povišeni na početku.

Zreiqat i suranici (2010) su utvrdili kako izvanstanični homodimeri S100A8 i S100A9 mogu stimulirati degradativni odgovor u zglobnim hondrocitima. Disregulacija sinteze i otpuštanja ova dva proteina od strane hondrocita mogla bi igrati ulogu u razaranju hrskavice kod artritisa. Međutim, studije koje uspoređuju kirurški izazvanu OA s AIA u miševa, sugeriraju da iako S100A8 i S100A9 mogu imati ulogu u pokretanju rane degradacije hrskavice u obje

artropatije, malo je vjerojatno kako će imati značajnu ulogu u tekućoj degradaciji hrskavice u kroničnom/kasnom stadiju OA. Definiranje razlika u patofiziološkim putovima i mehanizmima u različitim artritičnim stanjima i u različitim stadijima bolesti važno je za osmišljavanje boljih terapija.

Možemo zaključiti da S100A8/A9 može pogoršati stvaranje osteofita u eksperimentalnom OA s visokom sinovijalnom aktivacijom i može se koristiti za predviđanje napretka stvaranja osteofita u ranom simptomatnom ljudskom OA.

Osvrnut ćemo se na istraživanje u kojem su artroskopski uzete biopsije sinovije od pacijenata u ranoj simptomatskoj OA. Analizom je identificirana značajna ekspresija mRNA i proteina S100A8 i A9 i razine u korelaciji s debljinom sinovijalne ovojnice, celularnošću u subintimi i destrukcijom zgloba. Razine proteina S100A8/A9 u serumu bile su značajno povećane na početnoj liniji kod pacijenata koji pokazuju izraženu progresiju razaranja zglobova u 2 godine. Alarmini S100A8/S100A9 ključni su proteini uključeni u upali u sinoviji zgloba s AO i razaranje hrskavice tijekom OA, a visoke razine mogu predvidjeti destrukciju zglobova kod OA kod ljudi (van Lent i sur., 2012)

S100A8/S100A9 igraju ključnu ulogu u formiranju osteofita u modelu OA koji pokazuje jasnu sinovijalnu uključenost, vjerojatno stimulacijom hondrogeneze. Uzimajući u obzir i štetan učinak S100A8/A9 na razaranje zglobova kod OA, ciljanje ovih alarmina tijekom OA može biti vrlo obećavajuće. (Schelbergen i sur., 2013)

Van Kooten i suradnici u novijem istraživanju iz 2024. godine navode kako su makrofagi dominantna subpopulacija leukocita u sinoviji OA. Stanični sastav, uključujući prisutnost podtipova makrofaga u sinoviji pacijenata u završnoj fazi OA, određen je protočnom citometrijom i multipleksnom imunohistokemijom. Uglavnom su imali fenotip sličan M2, iako je većina također izražavala biljege makrofaga slične M1. Dugotrajna izloženost S100A9 tijekom diferencijacije monocita u makrofage povećala je makrofagne markere poput M2 CD163 i CD206 u diferenciranim stanicama sličnim M1 i M2. U skladu s ovim mješovitim fenotipom, S100A9 stimulacija umjereno je povećala ekspresiju i lučenje proupalnih markera i kataboličkih enzima, ali također je povećala ekspresiju i lučenje protuupalnih/anaboličkih markera. U skladu s regulacijom markera makrofaga sličnih M2, S100A9 je povećao fagocitnu aktivnost. Uočila se snažna povezanost između ekspresije S100A8 i S100A9 i omjera makrofaga sličnih M2/M1 u sinoviji OA u završnoj fazi. Dakle, kronična izloženost S100A8/A9 tijekom diferencijacije monocita u makrofag pogoduje diferencijaciji prema

fenotipu makrofaga sličnom M2. Svojstva ovih stanica mogu pomoći u objašnjenju kataboličkog/anaboličkog dualizma u uspostavljenim OA zglobovima s niskim stupnjem upala.

Stimulacija s IL-1 povećala je razinu mRNA i proteina kondrocita S100A8 i S100A9. Došlo je do povećane ekspresije mRNA hondrocita S100A8 i S100A9 u ranoj, ali ne i kasnoj mišjoj OA. Međutim, gubitak bojenja S100A8 u hondrocitima dogodio se kako je mišji OA napredovao, za razliku od pozitivne reaktivnosti za S100A8 i S100A9 u kondrocitima kod upalnog artritisa kod miševa. Homodimerni S100A8 i S100A9, ali ne i heterodimerni kompleks, značajno su povećali ekspresiju gena *Adamts1*, *Adamts4* i *Adamts 5*, *Mmp1*, *Mmp3* i *Mmp13* u hondrocitima, dok su mRNA kolagena II i agrekana značajno smanjene.

Zaključci su kako S100A8 i S100A9 izvedeni iz kondrocita mogu imati stalnu ulogu u razgradnji hrskavice kod upalnog artritisa. Nasuprot tome, dok ovi proteini mogu imati ulogu u pokretanju rane razgradnje hrskavice u OA-u pojačanom regulacijom MMP-a i agrekanaza, njihova smanjena ekspresija u kasnim stadijima OA-e sugerira da oni nemaju stalnu ulogu u razgradnji hrskavice u ovoj neupalnoj artropatiji (Zreiqat i sur., 2010).

Wang i sur. (2024) ukazali su na metformin koji je pokazao zaštitni učinak protiv OA u štakora izazvanih šećernom bolešću tipa 2, usporavajući progresiju OA koljena inhibicijom ekspresije S100A8, S100A9 i S100A12. Ovi nalazi sugeriraju potencijalne biološke mete za buduće tretmane OA. Metformin inhibira osteoarthritis koljena izazvan šećernom bolešću tipa 2 kod štakora.

U istraživanju van den Boscha S100A9 stimulacija OA u mišjim koljenim zglobovima i sinovijalnog tkiva povećala je proizvodnju proupalnih citokina interleukina (IL) 1 β , IL-6, IL-8 i faktora nekroze tumora- α . Dodatno, različiti MMP su regulirani prema gore nakon stimulacije S100A9. Eksperimenti kojima se utvrđivalo koji je tip stanica odgovoran za ove učinke otkrili su da uglavnom stimulacija GM-CSF-diferenciranih makrofaga i u manjoj mjeri M-CSF-diferenciranih makrofaga sa S100A9 povećava ekspresiju ovih proupalnih citokina i MMP-a. Nasuprot tome, stimulacija fibroblasta sa S100A9 nije utjecala na njihovu ekspresiju. Konačno, stimulacija GM-CSF-diferenciranih, ali ne i M-CSF-diferenciranih makrofaga sa S100A9 aktivirala je kanoničku Wnt signalizaciju, dok je inkubacija OA sinovija s inhibitorom S100A9 paquinimod smanjila aktivaciju kanoničke Wnt prosljeđivanja signala u

stanicu. Zaključno, pretežno posredovan makrofagima sličnim M1, alarmin S100A9 stimulira proizvodnju proupalnih i kataboličkih medijatora i aktivira kanoničko Wnt signaliziranje u OA sinoviji (van den Bosch i sur., 2016).

U istraživanju Mahler i sur. (2015) prosječna dob pacijenata s OA bila je 56 godina, 71% bile su žene, a 61% je imalo Kellgren i Lawrence (K&L) rezultat ≥ 2 . Razina S100A8/A9 u serumu nije se razlikovala između bolesnika s OA koljena, kuka i šake te nije pronađena povezanost između serumskog S100A8/A9 i kliničkih karakteristika. Razina S100A8/A9 u serumu bila je negativno povezana s ukupnim rezultatom osteofita nakon prilagodbe za spol i indeks tjelesne mase (BMI) [prilagođeni β -0,015, 95% interval pouzdanosti (CI) -0,030 do 0,001, $p = 0,062$] i pozitivno povezana s brzinom sedimentacije eritrocita (ESR) > 12 mm/h. Za pacijente s OA šake pronađena je negativna povezanost S100A8/A9 sa zbrojem rezultata suženja zglobnog prostora (prilagođeni β -0,007, 95% CI -0,016 do 0,001, $p = 0,099$). Rezultati ove eksplorativne studije presjeka ne podupiru važnu ulogu razina S100A8/A9 u serumu kao biomarkera za kliničke i strukturne karakteristike u bolesnika s OA koljena, kuka i šake. Obrnuta povezanost sa strukturnim abnormalnostima i pozitivna povezanost s ESR-om mogu odražavati upalne sinovijalne procese u bolesnika s OA prije nego što se pojave strukturalne abnormalnosti (Mahler i sur., 2015).

U našem istraživanju povišena je koncentracija HMGB1 u prvom, drugom i četvrtom stadiju osteoartritisa kuka i koljena u odnosu na treći stadij osteoartritisa kuka i koljena prema Kellgren – Lawrence klasifikaciji.

To povećanje djelomično je povezano i s povišenim intezitetom boli u 1. i 3. stupnju OA, ukočenosti prema WOMAC upitniku kao i otežanijem ASŽ u 1. i 3. stadiju u odnosu na 2. i 4. stadij.

Prema dosadašnjim spoznajama kod osteoartritisa (OA), HMGB1 se oslobađa iz oštećenih ili umirućih stanica zgloba, poput hondrocita i sinovijalnih stanica, te doprinosi patofiziološkom procesu tako što aktivira sinovijalne fibroblaste, makrofage i hondrocite putem receptora kao što su RAGE i TLR. Ova aktivacija rezultira povećanom stvaranjem pro-upalnih citokina, poput IL-1 β , TNF- α , MMP koji razgrađuju zglobnu hrskavicu. Također, povećane razine HMGB1 pridonose razgradnji matriksa zglobne hrskavice putem indukcije enzima, uključujući: MMP-13, ključni enzim za razgradnju kolagena tipa II, ADAMTS-4 i ADAMTS-5, koji razgrađuju agrekan.

Ekstracelularni HMGB1 sudjeluje u razvoju sinovitisa, stanja koje se često javlja kod osteoartritisa kuka i koljena. Sinovitis dodatno ubrzava propadanje zgloba (Palumbo i sur., 2023).

U radu Li i suradnika analizirane su razine HMGB-1 u sinovijalnoj tekućini (SF) i serumu prema KL klasifikaciji. Pacijenti s OA imali su više razine SF HMGB-1 u usporedbi s kontrolama. Višestruke usporedbe među pacijentima s različitim KL stupnjevima pokazale su kako su razine SF HMGB-1 bile znatno više u KL 4 podskupine u usporedbi s KL2 ($P < 0,01$) i KL3 ($P < 0,05$) podskupine. Razine HMGB-1 u podskupini KL3 nisu se značajno razlikovali od onih u KL2 podskupina i razine HMGB-1 u serumu nisu se značajno razlikovale između bolesnika s OA i kontrolne skupine.

U istraživanju Ke i suradnika munohistokemijska analiza sinovije otkrila je da HMGB-1 pokazuje striktno nuklearnu lokalizaciju u kontrolama; međutim, i nuklearna i citoplazmatska distribucija bile su prisutne u bolesnika s OA. Postotak HMGB-1 pozitivnih stanica, kao i citoplazmatska populacija HMGB-1 stanica u bolesnika s OA, bili su viši od onih u kontrolnih skupina (42,5% naspram 39,7% i 24,0% naspram 5,7%). Razine HMGB-1 u sinoviji i sinovijalnoj tekućini u pacijenata s OA bile su značajno više od kontrolnih. U bolesnika s OA HMGB-1 u skupini KL2/3 bio je viši nego u skupini KL4. Osim toga, razine sinovijalne tekućine HMGB-1 u bolesnika s OA bile su pozitivno povezane s težinom sinovitisa, boli i dnevnim aktivnostima

Uz navedeno treba navesti kako je prema našem istraživanju značajno viša koncentracija HMGB1 u pacijenata s OA koljena u plazmi ispitanika nego u ispitanika s OA kuka.

Zglobovi kuka i koljena najveći su zglobovi u tijelu sa značajnim anatomskim razlikama koje mogu utjecati na razvoj i učinkovitost biomehaničkih tretmana. Konkretno, kuk je kuglasti zglob, a koljeno je složeniji bikondilarni zglobni zglob. Anatomske razlike između zgloba kuka i koljena vjerojatno podupiru zašto je nepravilan položaj faktor rizika za OA koljena, ali ne i OA kuka. Osteoartritis se djelomično smatra mehaničkom bolešću, a biomehaničke strategije za poboljšanje simptoma i usporavanje progresije bolesti visoko su cijenjen istraživački prioritet za OA. Opterećenja zglobova često se neizravno procjenjuju tijekom

analize hoda, pri čemu se najčešće navode vanjski momenti. Za razliku od OA koljena, nisu pronađeni dokazi koji bi poduprli longitudinalnu povezanost između parametara opterećenja zgloba kuka i progresije bolesti. Stoga postoji nekoliko tretmana OA kuka usmjerenih na opterećenje zgloba kuka, što je u oštroj suprotnosti s obiljem biomehaničkih intervencija (npr. bočni klinovi, ponovno osposobljavanje hoda, steznik za koljeno) za OA koljena.

Koliko znamo, studije koje su izravno uspoređivale biomehaniku hoda između ljudi s OA kuka i koljena rijetke su i ograničene na sagitalnu ravninu. Kinematičke razlike uključuju veću fleksiju koljena i manju fleksiju kuka kod OA kuka u usporedbi s OA koljena. Sustavni pregledi i meta-analize pokazuju da se vanjski zglobni momenti razlikuju kod ljudi s OA kuka i koljena u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom. U odnosu na kontrole, momenti zgloba kuka u frontalnoj i sagitalnoj ravnini manji su kod OA kuka, dok su momenti zgloba koljena u frontalnoj ravnini veći kod OA koljena. Smatra se kako donji dio kuka kod OA kuka odražava adaptivnu strategiju za ublažavanje sile iz bolnog osteoartritskog zgloba u skladu s intenzivnim opisom iskustva boli koje opisuju ljudi s OA kuka. Za razliku od OA kuka, neusklađenost frontalne ravnine ključni je pokretač većeg opterećenja zgloba koljena kod OA koljena. Sporno slaganje između vanjskog zglobnog momenta i unutarnjih zajedničkih kontaktnih sila možda dovodi u pitanje valjanost vanjskih zglobnih momenata. Međutim, presječne studije koje su koristile neuromišićno-koštane modele utemeljene na elektromiografiji za koje se smatra da bolje odražavaju opterećenja zgloba koljena *in vivo* također su primijetile niže kontaktne sile zgloba kuka kod OA kuka i veće kontaktne sile zgloba koljena kod OA koljena. Općenito, relevantnost tretmana usmjerenih na opterećenje zgloba kuka za liječenje OA kuka nije sigurna s obzirom na primjetan nedostatak longitudinalnih biomehaničkih studija u OA kuka. U kliničkoj prezentaciji osobe s OA kuka obično su mlađe (60,4 godine) od osoba s OA koljena (66,3 godine) i imaju kraće trajanje simptoma u trenutku pojave (2,7 godina [95% CI 1,6, 5,6 godina]) u usporedbi s osobama s OA koljena (3,9 godina [95% CI 2, 8 godina]). Iako je nejasno zašto bi trajanje simptoma moglo biti kraće s OA kuka, druge razlike u kliničkoj prezentaciji OA kuka i OA koljena mogu dati uvid u ciljeve liječenja specifične za zglobove, kao što su ograničeni opseg pokreta i nestabilnost zgloba. Ograničeni raspon pokreta zgloba obično je problematičniji s OA kuka u usporedbi s OA koljena, tako da klinička procjena i dijagnoza OA usmjerava pozornost na ograničeni raspon pokreta u mnogo većoj mjeri na kuku nego na koljenu. Nasuprot tome, ograničena fleksija i ekstenzija koljena obično ne igra ulogu u kliničkoj dijagnozi OA koljena. Nestabilnost zgloba, opisana kao osjećaj savijanja ili popuštanja, često se javlja kod OA

koljena, ali ne često kod ljudi s OA kuka. Vjerojatnost nestabilnosti zgloba kuka vjerojatno je manja od nestabilnosti zgloba koljena zbog anatomske strukture zgloba kuka. Nasuprot tome, koljeni zglob se oslanja na ligamente za stabilnost, a ozljeda prednjeg križnog ligamenta je među najčešćim ozljedama koljena i snažan je faktor rizika za OA koljena koji također može doprinijeti nestabilnosti koljena kod OA koljena. Stoga vježbe fleksibilnosti mogu biti učinkovitije za OA kuka, dok poboljšanje neuromuskularne kontrole miškulature koljena s ili bez biomehaničke intervencije (npr. stezanje) može biti korisnije za OA koljena (Hall i sur., 2022)

Ovo ukazuje na veću upalnu aktivnost i tkivnu destrukciju u OA koljena. Moguće objašnjenje je kako je zglob koljena izloženiji značajnijim biomehaničkim stresovima zbog svoje funkcije nosivog zgloba i veće pokretljivosti.

Mikrotraume, česta preopterećenja i nepravilna biomehanika (npr. kod pretilosti ili nepravilnog poravnanja zgloba) uzrokuju češće oštećenje hondrocita i zglobnog matriksa, što dovodi do većeg oslobađanja HMGB1.

Prema Jiang i sur. (2012), meta-analiza pokazuje kako rizik od osteoartritisa koljena raste s indeksom tjelesne mase i postoji odnos doze i odgovora. Povećanje BMI od 5 jedinica značajno je povezano s povećanim rizikom od razvoja osteoartritisa koljena (RR: 1,35; 95% CI: 1,21, 1,51). To jest, svako povećanje BMI-a od 5 jedinica povezano je s 35% većim rizikom od osteoartritisa koljena. Postoji pozitivna povezanost između povećanog BMI i rizika od osteoartritisa koljena.

Zglob kuka također nosi težinu tijela, zglob kuka ima stabilniju anatomsku strukturu i veću sposobnost apsorpcije opterećenja. Manja razina mikrotrauma i stabilnija biomehanika smanjuju učestalost oštećenja stanica i otpuštanja HMGB1.

Meta-analiza pokazuje kako rizik od OA kuka raste proporcionalno s indeksom tjelesne mase i kako postoji odnos doza-odgovor. Povećanje BMI od 5 jedinica značajno je povezano s povećanim rizikom od osteoartritisa kuka (RR: 1,11; 95% CI: 1,07, 1,16). To jest, povećanje BMI od 5 jedinica povezano je s 11% većim rizikom od OA kuka (Jiang i i sur., 2011).

U radu Mei i sur. (2021) istraživao se molekularni mehanizam koji pokreće piroptozu sinoviocita (FLS) sličnih sinovijalnim fibroblastima i oslobađanje proteina 1 (HMGB1) skupine visoke mobilnosti u štakorskom modelu osteoartritisa koljena (KOA). HMGB1 potiče

sinovijalne fibroblaste i makrofage na oslobađanje proupalnih citokina (IL-1 β , TNF- α), a taj proces je obično izraženiji u koljenu, što povećava razinu HMGB1.

Ispravno je zaključiti da postoji i razlika u reparativnim procesima. U koljenu se može javiti intenzivniji pokušaj organizma da popravi oštećeno tkivo, što uključuje povećanu aktivaciju signalnih puteva povezanih s HMGB1. Također, kuk može imati sporiji reparativni odgovor zbog svoje strukture i manje upalne aktivnosti, što rezultira nižim razinama HMGB1.

Rezultati Aulina i sur. (2020) sugeriraju da bi alarmin HMGB1 mogao biti nova meta za razvoj OA terapije jer smo mogli promatrati nenormalnu ekspresiju HMGB1 u mišjim OA zglobovima, stimulaciju hondrocita s rHMGB1 induciranom proizvodnjom citokina i smanjenom proizvodnjom matriksa i konačno kako je blokada HMGB1 suzbila progresiju bolesti.

Sun i sur. (2016) navode genetske i sistemske faktore, npr. neki pacijenti mogu imati različite genetske predispozicije za intenzivniju aktivaciju upalnih puteva u određenim zglobovima. Sistemski faktori, poput pretilosti, također mogu različito utjecati na koljeno i kuk jer koljena trpe veća izravna mehanička opterećenja. Veće razine HMGB1 u koljenu ukazuju na to da OA koljena može biti povezan s izraženijim upalnim i destruktivnim procesima, što sugerira potrebu za specifičnim terapijskim pristupima usmjerenim na modulaciju upale u tom zglobu. Ovo je istraživanje provedeno s ciljem istraživanja ekspresije proteina B1 skupine visoke pokretljivosti (HMGB1) i receptora za krajnji produkt napredne glikacije (RAGE) kod osteoartritisa koljena (KOA) i njegovog kliničkog značaja. U eksperimentalnu skupinu uključeno je ukupno 108 sinovijalnih tkiva odabranih od bolesnika s KOA. U kontrolnu skupinu uključeno je 75 sinovijalnih tkiva zglobova koljena, odabranih od bolesnika kod kojih je klinički i patološki potvrđeno da nema lezije zglobova. Ekspresije mRNA i proteina HMGB1 i RAGE određene su pomoću RT-PCR odnosno imunohistokemije. Western blot je korišten za mjerenje relativne ekspresije proteina. Nacrtana je ROC krivulja za procjenu dijagnostičke vrijednosti HMGB1 i RAGE za KOA. Broj pozitivnih stanica i intenzitet pozitivne ekspresije HMGB1 i RAGE u sinovijalnom tkivu bili su veći u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj skupini. PI za ekspresiju HMGB1 i RAGE u bolesnika s KOA bio je u pozitivnoj korelaciji s kliničkom klasifikacijom rendgenskih filmova ($P < 0,05$). Ekspresija HMGB1 i RAGE mRNA, kao i relativna ekspresija proteina HMGB1 i RAGE u sinovijalnom

tkivu, bile su veće u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj skupini. Ekspresija proteina i mRNA HMGB1 i RAGE povećana je u bolesnika s KOA, što sugerira da su uključeni u KOA.

U bolesnim stanjima, posebno kardiometaboličkim, upalnim ili bolestima povezanim sa starenjem, ekspresija receptora za napredne krajnje produkte glikacije (RAGE) povećava se u različitim tipovima stanica zbog povišenih razina liganda povezanih s tim stanjima. Alternativno gledište u vezi s ulogom topljivog receptora za krajnje produkte napredne glikacije (sRAGE) u ljudskoj patofiziologiji jest da on možda ne služi samo kao zaštitni protuupalni agens. Dok se široko vjeruje kako djeluje kao receptor mamac za blokiranje štetnih interakcija, studije pokazuju da čak i u nedostatku membranski vezanog RAGE-a, topljivi bijes (sRAGE) još uvijek može inhibirati određene upalne reakcije, što ukazuje na složenu ulogu u regulaciji upale (Jorge, Erusalimsky 2021).

ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem potvrdila se povišena koncentracija HMGB1 i snižena sRAGEa u serumu bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena te statistički neznačajno povišenje proteina S100A8/A9 u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena.

Prema specifičnim ciljevima dokazane su:

1. povišene serumske koncentracije HMGB1 i snižene sRAGEa u bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena neovisno o stupnju težine bolesti s kontrolnom skupinom;
2. povišena serumska koncentracija HMGB1 u bolesnika s prvim i drugim i četvrtim stupnjem osteoartritisa kuka i osteoartritisom koljena i snižena koncentracija sRAGEa u svim stadijima osteoartritisa kuka i koljena.
3. povećana je serumska koncentracija HMGB1 i snižena sRAGEa neovisno o stupnju težine osteoartritisa koljena u odnosu na serumsku koncentraciju istih molekula u bolesnika s osteoartritisom kuka.

Hipoteza ovog rada djelomično je potvrđena, dokazana je prisutnost visoke koncentracije HMGB1 i snižena koncentracija sRAGEa u serumu bolesnika s osteoartritisom kuka i koljena, što upućuje na njihovu ulogu u imunopatogenezi osteoartritisa.

Do sada je provedeno vrlo malo istraživanja molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva HMGB1 i S100A8/A9 te receptora sRAGE kojima bi bili obuhvaćeni ispitanici s dijagnozom OA kuka i koljena te su spoznaje na ovu temu nedostatne i manjkave. Pokušaj rasvjetljavanja značenja navedenih molekula u imunopatogenezi upalnog procesa kod osteoartritisa koljena i kuka te usmjeravanja daljnjih istraživanja prema prirođenoj imunosti u liječenju osteoartritisa iznimno je važna. Iako je ispitivana uloga molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva u različitim upalnim i autoimunim bolestima, klinička ispitivanja iz područja OA još uvijek su manje zastupljena. Uvođenje novih strategija liječenja, kao što je blokada proteina HMGB1 mogao bi biti putokaz k zaliječenju koji će omogućiti dugoročnu remisiju u bolesnika s OA.

5. PRILOG – KRATICE

ADAMTS- extracelularni proteaza enzim,
dezintegrini metaloproteinaza s trombospondinom
AGE - proizvod uznapredovale glikacije
A β - amiloid beta
ASC- matične stanice iz masnog tkiva
Ca²⁺ - kalcij
CIOA- kolagen induciran eksperimentalni osteoartritis
COMP - protein oligomernog matriksa hrskavice
CRTAC1 - glikolizirani izvanstanični protein matriksa
DAMP - molekularni uzoroci povezani s oštećenjem
DMM- destabilizacija medijalnog mensikusa
esRAGE - endogeno izlučni topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije
FAI - femoroacetabularni udar
FFV - fiksni prikaz fleksije
FLS - sinoviociti nalik fibroblastu
GMCFS- granulocitni stimulirajući makrofag,
monomernični glikoprotein
HMGB1 -high-mobility group box 1
HOA - osteoartritis kuka
HSP - protein toplinskog šoka
IL 17 - interleukin 17
IL 22-22R1 – receptor1 interleukina 22
IL-1 β - interleukin-1 beta
IL-22 - interleukin 22
IL6 - interleukin 6
ITG α - integrin α
kB-kappaBnuklearni transkripcijski faktor
KOA - osteoartritis koljena
LBP - lipopolisaharid vezujući protei
LPA - lizofosfatidna kiselina
MAPK - protein kinaze aktivirane mitogenom

MetS - metabolički sindrom
MMP - matriksmetaloproteinaza
MMP1 - matriks metaloproteinaza 1
MRI - magnetska rezonancija
MRP8 - protein-8 povezan s mijeloidom
MSC – mezenhimalne matične stanice
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NET - neutrofilne izvanstanične zamke
NLR - nod-like receptor
NLRP1 - n terminaln pyrin domena
NLRP3- obitelj pirin domene
NO - dušikovog oksida
OA - osteoartritis
PAMP - molekularni uzoroci povezani s patogenom
PRR - specifični receptor alarmina
PS - fosfatidilserin
RA - reumatoidni artritis
RAGE - receptor naprednih krajnjih proizvoda glikacije
ROS - reaktivni kisikovi radikali
R-SO₃ H – sulfonat
R-SOH - sulfenska kiselina
RTG - radiogram
SAA - serumski amiloid A
-SH - tiolna skupina
SF – sinovijalna tekućina
sRAGE - topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije
THBS5 - trombospodin 5
TKR - totalna zamjena koljena
TLR4 - toll-like receptor 4
TMJOA- osteoartritis temporomandibularnog zgloba
TNF - faktor nekroze tumora
TNF- α - faktor tumorske nekroze alfa

TRP - ionski kanali prijelaznog receptorskog potencijala

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta

Zn²⁺ - Cink

6. LITERATURA

1. Addimanda O, Pulsatelli L, Vogl T, Roth J, Mancarella L, Assirelli E, Ramonda R, Fioravanti A, Meliconi R. Elevated serum levels of alarmin S100A8/A9 in patients with hand osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Sep-Oct;37(5):885. Epub 2019 May 7. PMID: 31074722.
2. Aitken A, Learmonth M. Protein identification by in-gel digestion and mass spectrometric analysis. *Mol Biotechnol*. 2002 Jan;20(1):95-7. doi: 10.1385/MB:20:1:095. PMID: 11876303.
3. Alissa EM, Alzughabi LS, Marzouki ZM. Relationship between serum resistin, body fat and inflammatory markers in females with clinical knee osteoarthritis. *Knee*. 2020 Jan;27(1):45-50. doi: 10.1016/j.knee.2019.12.009. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31926675.
4. Alshuft HM, Condon LA, Dineen RA, Auer DP. Cerebral Cortical Thickness in Chronic Pain Due to Knee Osteoarthritis: The Effect of Pain Duration and Pain Sensitization. *PLoS One*. 2016 Sep 22;11(9):e0161687. doi: 10.1371/journal.pone.0161687. PMID: 27658292; PMCID: PMC5033394.
5. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986 Aug;29(8):1039-49. doi: 10.1002/art.1780290816. PMID: 3741515.
6. Amin AR, Islam AB. Genomic analysis and differential expression of HMG and S100A family in human arthritis: upregulated expression of chemokines, IL-8 and nitric oxide by HMGB1. *DNA Cell Biol*. 2014 Aug;33(8):550-65. doi: 10.1089/dna.2013.2198. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24905701; PMCID: PMC4117271.
7. Antoine DJ, Harris HE, Andersson U, Tracey KJ, Bianchi ME. A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Mol Med*. 2014 Mar 24;20(1):135-7. doi: 10.2119/molmed.2014.00022. PMID: 24531895; PMCID: PMC3966994.
8. Ashraf JM, Haque QS, Tabrez S, Choi I, Ahmad S. Biochemical and immunological parameters as indicators of osteoarthritis subjects: role of OH-collagen in auto-

- antibodies generation. *EXCLI J.* 2015 Sep 23;14:1057-66. doi: 10.17179/excli2014-423. PMID: 26933405; PMCID: PMC4763472.
9. Aulin C, Larsson S, Vogl T, Roth J, Åkesson A, Swärd P, Heinbäck R, Erlandsson Harris H, Struglics A. The alarmins high mobility group box protein 1 and S100A8/A9 display different inflammatory profiles after acute knee injury. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022 Sep;30(9):1198-1209. doi: 10.1016/j.joca.2022.06.009. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35809846.
 10. Aulin C, Lassacher T, Palmblad K, Erlandsson Harris H. Early stage blockade of the alarmin HMGB1 reduces cartilage destruction in experimental OA. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020 May;28(5):698-707. doi: 10.1016/j.joca.2020.01.003. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31982563.
 11. Babatunde OM, Danoff JR, Patrick DA Jr, Lee JH, Kazam JK, Macaulay W. The Combination of the Tunnel View and Weight-Bearing Anteroposterior Radiographs Improves the Detection of Knee Arthritis. *Arthritis.* 2016;2016:9786924. doi: 10.1155/2016/9786924. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26925264; PMCID: PMC4746274.
 12. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, Kraus VB, Lohmander LS, Abbott JH, Bhandari M, Blanco FJ, Espinosa R, Haugen IK, Lin J, Mandl LA, Moilanen E, Nakamura N, Snyder-Mackler L, Trojian T, Underwood M, McAlindon TE. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019 Nov;27(11):1578-1589. doi: 10.1016/j.joca.2019.06.011. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31278997.
 13. Barroso J, Vigotsky AD, Branco P, Reis AM, Schnitzer TJ, Galhardo V, Apkarian AV. Brain gray matter abnormalities in osteoarthritis pain: a cross-sectional evaluation. *Pain.* 2020 Sep 1;161(9):2167-2178. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001904. PMID: 32379222; PMCID: PMC7745790.
 14. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Jan;21(1):16-21. doi: 10.1016/j.joca.2012.11.012. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23194896.
 15. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017 Jan;14(1):43-64. doi: 10.1038/cmi.2016.34. Epub 2016 Aug 29. PMID: 27569562; PMCID: PMC5214941.

16. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Oct;15(5):496-506. doi: 10.1016/j.gde.2005.08.007. PMID: 16102963.
17. Birghila, Semaghiul, Mihaela Mirela Bratu, Corina Prajitura, Florentina Nicoleta Roncea and Ticuța Negreanu-Pîrjol. “Spectrophotometric Method for the Determination of Total Proteins in Egg White Samples.” (2015).
18. Blikman T, Rienstra W, van Raay JJAM, Dijkstra B, Bulstra SK, Stevens M, van den Akker-Scheek I. Neuropathic-like symptoms and the association with joint-specific function and quality of life in patients with hip and knee osteoarthritis. *PLoS One.* 2018 Jun 14;13(6):e0199165. doi: 10.1371/journal.pone.0199165. PMID: 29902245; PMCID: PMC6002060.
19. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2017 Sep 14;60(17):7213-7232. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00058. Epub 2017 May 19. PMID: 28482155; PMCID: PMC5601361.
20. Braaten JA, Banovetz MT, DePhillipo NN, Familiari F, Russo R, Kennedy NI, LaPrade RF. Biomarkers for Osteoarthritis Diseases. *Life (Basel).* 2022 Nov 7;12(11):1799. doi: 10.3390/life12111799. PMID: 36362955; PMCID: PMC9697481.
21. Braun HJ, Gold GE. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone.* 2012 Aug;51(2):278-88. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.019. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22155587; PMCID: PMC3306456.
22. Carrión M, Juarranz Y, Martínez C, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford).* 2013 Dec;52(12):2177-86. doi: 10.1093/rheumatology/ket315. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24056519.
23. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2711-9. doi: 10.1172/JCI62423. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22850880; PMCID: PMC3408740.
24. Chaney S, Vergara R, Qiryaqoz Z, Suggs K, Akkouch A. The Involvement of Neutrophils in the Pathophysiology and Treatment of Osteoarthritis. *Biomedicines.*

- 2022 Jul 6;10(7):1604. doi: 10.3390/biomedicines10071604. PMID: 35884909; PMCID: PMC9313259.
25. Chayanupatkul M, Honsawek S. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in plasma and synovial fluid is inversely associated with disease severity of knee osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2010 Sep;43(13-14):1133-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.07.007. Epub 2010 Jul 11. PMID: 20627100.
26. Conaghan PG, Hunter DJ, Cohen SB, Kraus VB, Berenbaum F, Lieberman JR, Jones DG, Spitzer AI, Jevsevar DS, Katz NP, Burgess DJ, Lufkin J, Johnson JR, Bodick N; FX006-2014-008 Participating Investigators. Effects of a Single Intra-Articular Injection of a Microsphere Formulation of Triamcinolone Acetonide on Knee Osteoarthritis Pain: A Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled, Multinational Study. *J Bone Joint Surg Am.* 2018 Apr 18;100(8):666-677. doi: 10.2106/JBJS.17.00154. PMID: 29664853; PMCID: PMC5916484.
27. Convill JG, Tawy GF, Freemont AJ, Biant LC. Clinically Relevant Molecular Biomarkers for Use in Human Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cartilage.* 2021 Dec;13(1_suppl):1511S-1531S. doi: 10.1177/1947603520941239. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32680434; PMCID: PMC8808945.
28. Correia, L.C.; Lima, J.C.; Gerstenblith, G.; Magalhães, L.P.; Moreira, A.; Barbosa, O.; Dumet, J.; Passos, L.C.; D'Oliveira, J.A.; Esteves, J.P. Correlation between turbidimetric and nephelometric methods of measuring C-reactive protein in patients with unstable angina or non-ST elevation acute myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol.* 2003, 81, 129-133. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2003001000002>
29. Cremers NAJ, van den Bosch MHJ, van Dalen S, Di Ceglie I, Ascone G, van de Loo F, Koenders M, van der Kraan P, Sloetjes A, Vogl T, Roth J, Geven EJW, Blom AB, van Lent PLEM. S100A8/A9 increases the mobilization of pro-inflammatory Ly6C^{high} monocytes to the synovium during experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017 Sep 29;19(1):217. doi: 10.1186/s13075-017-1426-6. PMID: 28969686; PMCID: PMC5623958.
30. Crews FT, Walter TJ, Coleman LG Jr, Vetreno RP. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology (Berl).* 2017 May;234(9-10):1483-1498. doi: 10.1007/s00213-017-4560-6. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28210782; PMCID: PMC5420377.

31. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol.* 2000;149:III-IV, 1-413. doi: 10.1385/1592590497. PMID: 11028258.
32. da Costa BR, Pereira TV, Saadat P, Rudnicki M, Iskander SM, Bodmer NS, Bobos P, Gao L, Kiyomoto HD, Montezuma T, Almeida MO, Cheng PS, Hincapié CA, Hari R, Sutton AJ, Tugwell P, Hawker GA, Jüni P. Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis. *BMJ.* 2021 Oct 12;375:n2321. doi: 10.1136/bmj.n2321. PMID: 34642179; PMCID: PMC8506236.
33. Dell'Isola A, Pihl K, Turkiewicz A, Hughes V, Zhang W, Bierma-Zeinstra S, Prieto-Alhambra D, Englund M. Risk of Comorbidities Following Physician-Diagnosed Knee or Hip Osteoarthritis: A Register-Based Cohort Study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2022 Oct;74(10):1689-1695. doi: 10.1002/acr.24717. Epub 2022 Jun 22. PMID: 34086422.
34. Delrue C, Speeckaert R, Delanghe JR, Speeckaert MM. The Potential Influence of Advanced Glycation End Products and (s)RAGE in Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2894. doi: 10.3390/ijms24032894. PMID: 36769213; PMCID: PMC9918052.
35. Di Ceglie I, Kruisbergen NNL, van den Bosch MHJ, van Lent PLEM. Fc-gamma receptors and S100A8/A9 cause bone erosion during rheumatoid arthritis. Do they act as partners in crime? *Rheumatology (Oxford).* 2019 Aug 1;58(8):1331-1343. doi: 10.1093/rheumatology/kez218. PMID: 31180451.
36. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013 Jan;13(1):24-57. PMID: 22834835; PMCID: PMC3707951.
37. Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2022 Jul 29;13:931473. doi: 10.3389/fimmu.2022.931473. PMID: 35967420; PMCID: PMC9373849.
38. Dong Y, Ming B, Dong L. The Role of HMGB1 in Rheumatic Diseases. *Front Immunol.* 2022 Feb 17;13:815257. doi: 10.3389/fimmu.2022.815257. PMID: 35250993; PMCID: PMC8892237.
39. Drinda S, Franke S, Schmidt S, Stoy K, Lehmann T, Wolf G, Neumann T. AGE-RAGE Interaction Does Not Explain the Clinical Improvements after Therapeutic

- Fasting in Osteoarthritis. *Complement Med Res.* 2018;25(3):167-172. doi: 10.1159/000486237. Epub 2017 Feb 13. PMID: 29433120.
40. Egaña-Gorroño L, López-Díez R, Yepuri G, Ramirez LS, Reverdatto S, Gugger PF, Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. *Front Cardiovasc Med.* 2020 Mar 10;7:37. doi: 10.3389/fcvm.2020.00037. PMID: 32211423; PMCID: PMC7076074.
41. Erusalimsky JD. The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. *Redox Biol.* 2021 Jun;42:101958. doi: 10.1016/j.redox.2021.101958. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33839083; PMCID: PMC8113049.
42. Evans JT, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet.* 2019 Feb 16;393(10172):647-654. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31665-9. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30782340; PMCID: PMC6376618.
43. Fingleton C, Smart K, Moloney N, Fullen BM, Doody C. Pain sensitization in people with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Jul;23(7):1043-56. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.163. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25749012.
44. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Jul;3(7):382-90. doi: 10.1038/ncprheum0531. PMID: 17599072.
45. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology (Oxford).* 2018 May 1;57(suppl_4):iv43-iv50. doi: 10.1093/rheumatology/kex419. PMID: 29267879.
46. Fu Y, Lei J, Zhuang Y, Zhang K, Lu D. Overexpression of HMGB1 A-box reduced IL-1 β -induced MMP expression and the production of inflammatory mediators in human chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2016 Nov 15;349(1):184-190. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.014. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27771306.
47. Fu Y, Lei J, Zhuang Y, Zhang K, Lu D. Overexpression of HMGB1 A-box reduced IL-1 β -induced MMP expression and the production of inflammatory mediators in

- human chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2016 Nov 15;349(1):184-190. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.014. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27771306.
48. Ganz R, Parvizi J, Beck M, Leunig M, Nötzli H, Siebenrock KA. Femoroacetabular impingement: a cause for osteoarthritis of the hip. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 Dec;(417):112-20. doi: 10.1097/01.blo.0000096804.78689.c2. PMID: 14646708.
49. Ge X, Arriazu E, Magdaleno F, Antoine DJ, Dela Cruz R, Theise N, Nieto N. High Mobility Group Box-1 Drives Fibrosis Progression Signaling via the Receptor for Advanced Glycation End Products in Mice. *Hepatology.* 2018 Dec;68(6):2380-2404. doi: 10.1002/hep.30093. Epub 2018 Nov 13. PMID: 29774570; PMCID: PMC6240507.
50. Geng Y, Ma Q, Liu YN, Peng N, Yuan FF, Li XG, Li M, Wu YS, Li BL, Song WB, Zhu W, Xu WW, Fan J, Su L. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis. *J Hepatol.* 2015 Sep;63(3):622-33. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.010. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25931416.
51. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015 Jul 25;386(9991):376-87. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25748615.
52. Gold GE, Cicuttini F, Crema MD, Eckstein F, Guermazi A, Kijowski R, Link TM, Maheu E, Martel-Pelletier J, Miller CG, Pelletier JP, Peterfy CG, Potter HG, Roemer FW, Hunter DJ. OARSI Clinical Trials Recommendations: Hip imaging in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 May;23(5):716-31. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.004. PMID: 25952344; PMCID: PMC4430132.
53. Goldring JPD. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2019;1855:31-39. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_3. PMID: 30426404.
54. Gombault A, Baron L, Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 2013 Jan 8;3:414. doi: 10.3389/fimmu.2012.00414. PMID: 23316199; PMCID: PMC3539150.
55. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020 Feb;20(2):95-112. doi: 10.1038/s41577-019-0215-7. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31558839.

56. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020 Jun;1867(6):118677. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118677. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32057918.
57. Grimsley GR, Pace CN. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci.* 2004 Nov;Chapter 3:3.1.1-3.1.9. doi: 10.1002/0471140864.ps0301s33. PMID: 18429266.
58. Hall M, Bennell KL, Wrigley TV, Metcalf BR, Campbell PK, Kasza J, Paterson KL, Hunter DJ, Hinman RS. The knee adduction moment and knee osteoarthritis symptoms: relationships according to radiographic disease severity. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017 Jan;25(1):34-41. doi: 10.1016/j.joca.2016.08.014. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27616685.
59. Hall M, van der Esch M, Hinman RS, Peat G, de Zwart A, Quicke JG, Runhaar J, Knoop J, van der Leeden M, de Rooij M, Meulenbelt I, Vliet Vlieland T, Lems WF, Holden MA, Foster NE, Bennell KL. How does hip osteoarthritis differ from knee osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage.* 2022 Jan;30(1):32-41. doi: 10.1016/j.joca.2021.09.010. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34600121.
60. Hattori T, Shimo K, Niwa Y, Katsura Y, Tokiwa Y, Ohga S, Matsubara T. Pain Sensitization and Neuropathic Pain-like Symptoms Associated with Effectiveness of Exercise Therapy in Patients with Hip and Knee Osteoarthritis. *Pain Res Manag.* 2022 Aug 29;2022:4323045. doi: 10.1155/2022/4323045. PMID: 36071945; PMCID: PMC9444422.
61. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, Liang MH, Kremers HM, Mayes MD, Merkel PA, Pillemer SR, Reveille JD, Stone JH; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):15-25. doi: 10.1002/art.23177. PMID: 18163481.
62. Hofman A, Simon A, Grković T, Jones M. *Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences.* Cambridge: Cambridge University, 2014;
63. Holden MA, Button K, Collins NJ, Henrotin Y, Hinman RS, Larsen JB, Metcalf B, Master H, Skou ST, Thoma LM, Wellsandt E, White DK, Bennell K. Guidance for Implementing Best Practice Therapeutic Exercise for Patients With Knee and Hip Osteoarthritis: What Does the Current Evidence Base Tell Us? *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2021 Dec;73(12):1746-1753. doi: 10.1002/acr.24434. PMID: 32860729.

64. Honsawek S, Chayanupatkul M. Correlation of plasma and synovial fluid adiponectin with knee osteoarthritis severity. *Arch Med Res.* 2010 Nov;41(8):593-8. doi: 10.1016/j.arcmed.2010.11.007. PMID: 21199727.
65. Hsu H, Siwiec RM. Knee Osteoarthritis. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507884/>
66. Huang C, Zhang Z, Chen Y, Zhang Y, Xing D, Zhao L, Lin J, Mei Y, Lin HY, Zheng Y, Tsai WC, Liu S, Jiang Q, Liu Y, Chen J, Ye Z, Chen M, Chen Y, Chu CQ, Gao M, He L, Lin J, Wu L, Xu J, Yang P, Zhang X, Jiang Q, Lei G, Li M, Yang W, Gu X, Zhou Y, He D, Liu W, Zhang W, Ding C, Zeng X. Erratum to development and formulation of the classification criteria for osteoarthritis. *Ann Transl Med.* 2020 Dec;8(23):1630. doi: 10.21037/atm-2020-29. Erratum for: *Ann Transl Med.* 2020 Sep;8(17):1068. doi: 10.21037/atm-20-4673. PMID: 33437829; PMCID: PMC7791258.
67. Huang ZY, Perry E, Huebner JL, Katz B, Li YJ, Kraus VB. Biomarkers of inflammation - LBP and TLR- predict progression of knee osteoarthritis in the DOXY clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018 Dec;26(12):1658-1665. doi: 10.1016/j.joca.2018.08.005. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30144513; PMCID: PMC6263786.
68. Hudson BI, Lippman ME. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annu Rev Med.* 2018 Jan 29;69:349-364. doi: 10.1146/annurev-med-041316-085215. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29106804.
69. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9. PMID: 31034380.
70. Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission. *Lancet.* 2020 Nov 28;396(10264):1711-1712. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32230-3. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33159851.
71. Iidaka T, Muraki S, Akune T, Oka H, Kodama R, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N. Prevalence of radiographic hip osteoarthritis and its association with hip pain in Japanese men and women: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Jan;24(1):117-23. doi: 10.1016/j.joca.2015.07.017. Epub 2015 Aug 1. PMID: 26241774.

72. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 5;22(5):2619. doi: 10.3390/ijms22052619. PMID: 33807695; PMCID: PMC7961389.
73. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 5;22(5):2619. doi: 10.3390/ijms22052619. PMID: 33807695; PMCID: PMC7961389.
74. Jiang L, Tian W, Wang Y, Rong J, Bao C, Liu Y, Zhao Y, Wang C. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2012 May;79(3):291-7. doi: 10.1016/j.jbspin.2011.05.015. Epub 2011 Jul 30. PMID: 21803633.
75. Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X, Zhao Y. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2011 Mar;78(2):150-5. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.04.011. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20580591.
76. Erusalimsky JD. The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. *Redox Biol.* 2021 Jun;42:101958. doi: 10.1016/j.redox.2021.101958. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33839083; PMCID: PMC8113049.
77. Kalaydzhev, H, Ivanova, P, Uzunova, G, Manolov, I, Chalova, V. Biuret and Bradford Methods Suitability for Protein Quantification in Rapeseed Meal. *Contemp Agricul* 2018, 67:87-92. doi:10.2478/contagri-2018-0013
78. Kan H, Arai Y, Kobayashi M, Nakagawa S, Inoue H, Hino M, Komaki S, Ikoma K, Ueshima K, Fujiwara H, Kubo T. Radiographic Measurement of Joint Space Width Using the Fixed Flexion View in 1,102 Knees of Japanese Patients with Osteoarthritis in Comparison with the Standing Extended View. *Knee Surg Relat Res.* 2017 Mar 1;29(1):63-68. doi: 10.5792/ksrr.16.046. PMID: 28231651; PMCID: PMC5336370.
79. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA.* 2021 Feb 9;325(6):568-578. doi: 10.1001/jama.2020.22171. PMID: 33560326; PMCID: PMC8225295.
80. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20404851.

81. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):317-37. doi: 10.1093/intimm/dxp017. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246554; PMCID: PMC2721684.
82. Ke X, Jin G, Yang Y, Cao X, Fang R, Feng X, Lei B. Synovial Fluid HMGB-1 Levels are Associated with Osteoarthritis Severity. *Clin Lab.* 2015;61(7):809-18. doi: 10.7754/clin.lab.2015.141205. PMID: 26299081.
83. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957 Dec;16(4):494-502. doi: 10.1136/ard.16.4.494. PMID: 13498604; PMCID: PMC1006995.
84. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020 Apr 1;2020(4):102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269. PMID: 32238597.
85. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* 2013 Jul;94(1):55-68. doi: 10.1189/jlb.1012519. Epub 2013 Mar 29. PMID: 23543766.
86. Knox PJ, Coyle PC, Pugliese JM, Pohlig RT, Sions JM, Hicks GE. Hip osteoarthritis signs and symptoms are associated with increased fall risk among community-dwelling older adults with chronic low back pain: a prospective study. *Arthritis Res Ther.* 2021 Mar 3;23(1):71. doi: 10.1186/s13075-021-02455-5. PMID: 33658074; PMCID: PMC7927382.
87. Kohl TO, Ascoli CA. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc.* 2017 Jul 5;2017(7):pdb.prot093740. doi: 10.1101/pdb.prot093740. PMID: 28679705.
88. Kohl TO, Ascoli CA. Immunoassays. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017 Jul 5;2017(7):pdb.top093690. doi: 10.1101/pdb.top093690. PMID: 28679720.
89. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2016 Aug;474(8):1886-93. doi: 10.1007/s11999-016-4732-4. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26872913; PMCID: PMC4925407.
90. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmagel AK, Thoma LM,

- Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020 Feb;72(2):149-162. doi: 10.1002/acr.24131. Epub 2020 Jan 6. Erratum in: *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2021 May;73(5):764. doi: 10.1002/acr.24615. PMID: 31908149; PMCID: PMC11488261.
91. Kosor S, Grazio S. Patogeneza osteoartritisa. *Med Jad* 2013;43:33-45.
92. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation, Ur: Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, 2002; str.15-21.
93. Kumar V, Agrawal R, Pandey A, Kopf S, Hoeffgen M, Kaymak S, Bandapalli OR, Gorbunova V, Seluanov A, Mall MA, Herzig S, Nawroth PP. Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. *EMBO J*. 2020 Jun 2;39(11):e103477. doi: 10.15252/embj.2019103477. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32338774; PMCID: PMC7265245.
94. Kumavat R, Kumar V, Malhotra R, Pandit H, Jones E, Ponchel F, Biswas S. Biomarkers of Joint Damage in Osteoarthritis: Current Status and Future Directions. *Mediators Inflamm*. 2021 Mar 9;2021:5574582. doi: 10.1155/2021/5574582. PMID: 33776572; PMCID: PMC7969115.
95. Kwiatkowska B, Raciborski F, Kłak A, Maślińska M, Gryglewicz J. Early diagnosis of rheumatic diseases: an evaluation of the present situation and proposed changes. *Reumatologia*. 2015;53(1):3-8. doi: 10.5114/reum.2015.50550. Epub 2015 Apr 10. PMID: 27407218; PMCID: PMC4847309.
96. Latijnhouwers DAJM, Vlieland TPMV, Marijnissen WJ, Damen PJ, Nelissen RGHH, Gademan MGJ; Longitudinal Leiden Orthopaedics Outcomes of Osteoarthritis Study (LOAS) Group. Sex differences in perceived expectations of the outcome of total hip and knee arthroplasties and their fulfillment: an observational cohort study. *Rheumatol Int*. 2023 May;43(5):911-922. doi: 10.1007/s00296-022-05240-y. Epub 2022 Nov 28. PMID: 36437310; PMCID: PMC10073060.
97. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8. doi: 10.1373/clinchem.2005.051532. Epub 2005 Sep 22. PMID: 16179424.

98. Lespasio MJ, PiuZZi NS, Husni ME, Muschler GF, Guarino A, Mont MA. Knee Osteoarthritis: A Primer. *Perm J.* 2017;21:16-183. doi: 10.7812/TPP/16-183. PMID: 29035179; PMCID: PMC5638628.
99. Lespasio MJ, Sultan AA, PiuZZi NS, Khlopas A, Husni ME, Muschler GF, Mont MA. Hip Osteoarthritis: A Primer. *Perm J.* 2018;22:17-084. doi: 10.7812/TPP/17-084. PMID: 29309269; PMCID: PMC5760056.
100. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, Catz SD. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol.* 2018 Dec 7;3(30):eaat4579. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4579. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30530726.
101. Li D, Li S, Chen Q, Xie X. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in Relation to Age, Sex, Area, Region, and Body Mass Index in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2020 Jul 16;7:304. doi: 10.3389/fmed.2020.00304. PMID: 32766258; PMCID: PMC7378378.
102. Li Y, Collins DA, Grintzalis K. A Simple Biochemical Method for the Detection of Proteins as Biomarkers of Life on Martian Soil Simulants and the Impact of UV Radiation. *Life (Basel).* 2023 May 9;13(5):1150. doi: 10.3390/life13051150. PMID: 37240795; PMCID: PMC10222112.
103. Li YY, Feng YP, Liu L, Ke J, Long X. Inhibition of HMGB1 suppresses inflammation and catabolism in temporomandibular joint osteoarthritis *via* NF- κ B signaling pathway. *Eur J Histochem.* 2022 Jun 21;66(3):3357. doi: 10.4081/ejh.2022.3357. PMID: 35726537; PMCID: PMC9251613.
104. Li ZC, Cheng GQ, Hu KZ, Li MQ, Zang WP, Dong YQ, Wang WL, Liu ZD. Correlation of synovial fluid HMGB-1 levels with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Clin Invest Med.* 2011 Oct 1;34(5):E298. doi: 10.25011/cim.v34i5.15673. PMID: 21968272.
105. Liem Y, Judge A, Kirwan J, Ourradi K, Li Y, Sharif M. Multivariable logistic and linear regression models for identification of clinically useful biomarkers for osteoarthritis. *Sci Rep.* 2020 Jul 9;10(1):11328. doi: 10.1038/s41598-020-68077-0. PMID: 32647218; PMCID: PMC7347626.
106. Lin L, Luo P, Yang M, Wang J, Hou W, Xu P. Causal relationship between osteoporosis and osteoarthritis: A two-sample Mendelian randomized study. *Front*

- Endocrinol (Lausanne). 2022 Oct 21;13:1011246. doi: 10.3389/fendo.2022.1011246. PMID: 36339427; PMCID: PMC9633945.
107. Losina E, Weinstein AM, Reichmann WM, Burbine SA, Solomon DH, Daigle ME, Rome BN, Chen SP, Hunter DJ, Suter LG, Jordan JM, Katz JN. Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013 May;65(5):703-11. doi: 10.1002/acr.21898. PMID: 23203864; PMCID: PMC3886119.
108. Lu B, Wang H, Andersson U, Tracey KJ. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein Cell*. 2013 Mar;4(3):163-7. doi: 10.1007/s13238-012-2118-2. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23483477; PMCID: PMC4533838.
109. Lundbäck P, Stridh P, Klevenvall L, Jenkins RE, Fischer M, Sundberg E, Andersson U, Antoine DJ, Harris HE. Characterization of the Inflammatory Properties of Actively Released HMGB1 in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Apr 20;24(12):605-19. doi: 10.1089/ars.2014.6039. Epub 2015 Feb 6. PMID: 25532033; PMCID: PMC4841912.
110. Lynskey SJ, Macaluso MJ, Gill SD, McGee SL, Page RS. Biomarkers of Osteoarthritis-A Narrative Review on Causal Links with Metabolic Syndrome. *Life (Basel)*. 2023 Mar 8;13(3):730. doi: 10.3390/life13030730. PMID: 36983885; PMCID: PMC10051744.
111. Ma CA, Leung YY. Exploring the Link between Uric Acid and Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2017 Dec 13;4:225. doi: 10.3389/fmed.2017.00225. PMID: 29326934; PMCID: PMC5733531.
112. Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol Med*. 2014 Mar 24;20(1):138-46. doi: 10.2119/molmed.2013.00164. PMID: 24531836; PMCID: PMC3966993.
113. Mahir L, Belhaj K, Zahi S, Azanmasso H, Lmidmani F, El Fatimi A. Impact of knee osteoarthritis on the quality of life. *Ann Phys Rehabil Med* 2016;59:e159.
114. Mahler EA, Zweers MC, van Lent PL, Blom AB, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Roth J, Vogl T, Bijlsma JW, van den Ende CH, den Broeder AA. Association between serum levels of the proinflammatory protein S100A8/A9 and clinical and structural characteristics of patients with established knee, hip, and hand osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 2015;44(1):56-60. doi: 10.3109/03009742.2014.918176. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25179566.

115. Mahler EA, Zweers MC, van Lent PL, Blom AB, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Roth J, Vogl T, Bijlsma JW, van den Ende CH, den Broeder AA. Association between serum levels of the proinflammatory protein S100A8/A9 and clinical and structural characteristics of patients with established knee, hip, and hand osteoarthritis. *Scand J Rheumatol.* 2015;44(1):56-60. doi: 10.3109/03009742.2014.918176. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25179566.
116. Martinotti S, Patrone M, Ranzato E. Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer. *Immunotargets Ther.* 2015 May 26;4:101-9. doi: 10.2147/ITT.S58064. PMID: 27471716; PMCID: PMC4918250.
117. Matta BM, Reichenbach DK, Blazar BR, Turnquist HR. Alarmins and Their Receptors as Modulators and Indicators of Alloimmune Responses. *Am J Transplant.* 2017 Feb;17(2):320-327. doi: 10.1111/ajt.13887. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27232285; PMCID: PMC5124552.
118. McDougall JJ. Osteoarthritis is a neurological disease - an hypothesis. *Osteoarthr Cartil Open.* 2019 Nov 1;1(1-2):100005. doi: 10.1016/j.ocarto.2019.100005. PMID: 36474723; PMCID: PMC9718286.
119. Mei W, Hong B, Huang G. [Mechanism of high expression of high mobility group protein 1 in a rat model of knee osteoarthritis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2021 Aug 20;41(8):1142-1149. Chinese. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.08.03. PMID: 34549703; PMCID: PMC8527223.
120. Metcalfe D, Perry DC, Claireaux HA, Simel DL, Zogg CK, Costa ML. Does This Patient Have Hip Osteoarthritis?: The Rational Clinical Examination Systematic Review. *JAMA.* 2019 Dec 17;322(23):2323-2333. doi: 10.1001/jama.2019.19413. PMID: 31846019; PMCID: PMC7583647.
121. Miller RJ, Malfait AM, Miller RE. The innate immune response as a mediator of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020 May;28(5):562-571. doi: 10.1016/j.joca.2019.11.006. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862470; PMCID: PMC6951330.
122. Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2019 Sep-Oct;37 Suppl 120(5):48-56. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31621566.
123. Morgan M, Nazemian V, Harrington K, Ivanusic JJ. Mini review: The role of sensory innervation to subchondral bone in osteoarthritis pain. *Front Endocrinol*

- (Lausanne). 2022 Dec 20;13:1047943. doi: 10.3389/fendo.2022.1047943. PMID: 36605943; PMCID: PMC9808033.
124. Murphy NJ, Eyles JP, Hunter DJ. Hip Osteoarthritis: Etiopathogenesis and Implications for Management. *Adv Ther* 2016;33:1921-46.
125. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007 May 1;581(9):1928-32. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.090. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17434489.
126. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasadam I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol.* 2022 Jul 4;13:907750. doi: 10.3389/fimmu.2022.907750. PMID: 35860250; PMCID: PMC9289681.
127. Noble JE. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes. *Methods Enzymol.* 2014;536:17-26. doi: 10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7. PMID: 24423263.
128. Osani MC, Bannuru RR. Efficacy and safety of duloxetine in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Korean J Intern Med.* 2019 Sep;34(5):966-973. doi: 10.3904/kjim.2018.460. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30871298; PMCID: PMC6718752.
129. Ostrand-Rosenberg S, Huecksteadt T, Sanders K. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Its Ligands S100A8/A9 and High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) Are Key Regulators of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancers (Basel).* 2023 Feb 6;15(4):1026. doi: 10.3390/cancers15041026. PMID: 36831371; PMCID: PMC9954573.
130. Palanissami G, Paul SFD. RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer-a Review. *Horm Cancer.* 2018 Oct;9(5):295-325. doi: 10.1007/s12672-018-0342-9. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29987748; PMCID: PMC10355895.
131. Palumbo A, Atzeni F, Murdaca G, Gangemi S. The Role of Alarmins in Osteoarthritis Pathogenesis: HMGB1, S100B and IL-33. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 29;24(15):12143. doi: 10.3390/ijms241512143. PMID: 37569519; PMCID: PMC10418664.

132. Panunzi S, Maltese S, De Gaetano A, Capristo E, Bornstein SR, Mingrone G. Comparative efficacy of different weight loss treatments on knee osteoarthritis: A network meta-analysis. *Obes Rev* 2021;22:e13230.
133. Pelletier JP, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum*. 1991 Jun;20(6 Suppl 2):12-25. doi: 10.1016/0049-0172(91)90024-t. PMID: 1866626.
134. Pola E, Papaleo P, Pola R, Gaetani E, Tamburelli FC, Aulisa L, Logroscino CA. Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Nov;13(11):1025-8. doi: 10.1016/j.joca.2005.07.011. Epub 2005 Sep 29. PMID: 16198603.
135. Poulsen E, Overgaard S, Vestergaard JT, Christensen HW, Hartvigsen J. Pain distribution in primary care patients with hip osteoarthritis. *Fam Pract*. 2016 Dec;33(6):601-606. doi: 10.1093/fampra/cmw071. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27538424.
136. Premaratne DR. Structure function relationship of recombinant sRAGE. *Biology* 2016;2016:12.
137. Primorac D, Molnar V, Matišić V, Hudetz D, Jeleč Ž, Rod E, Čukelj F, Vidović D, Vrdoljak T, Dobričić B, Antičević D, Smolić M, Miškulin M, Čaćić D, Borić I. Comprehensive Review of Knee Osteoarthritis Pharmacological Treatment and the Latest Professional Societies' Guidelines. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Mar 2;14(3):205. doi: 10.3390/ph14030205. PMID: 33801304; PMCID: PMC8001498.
138. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, Vrdoljak T, Hudetz D, Hajsok H, Borić I. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 26;11(8):854. doi: 10.3390/genes11080854. PMID: 32722615; PMCID: PMC7464436.
139. Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther*. 2016 Nov;167:120-131. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.015. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27492899.
140. Redmile-Gordon MA, Armenise E, White RP, Hirsch PR, Goulding KW. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol Biochem*. 2013 Dec;67(100):166-173. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.017. PMID: 24302786; PMCID: PMC3819989.

141. Richter M, Trzeciak T, Owecki M, Pucher A, Kaczmarczyk J. The role of adipocytokines in the pathogenesis of knee joint osteoarthritis. *Int Orthop*. 2015 Jun;39(6):1211-7. doi: 10.1007/s00264-015-2707-9. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25716111.
142. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):580-92. doi: 10.1038/nrrheum.2016.136. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27539668; PMCID: PMC5500215.
143. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018 Aug 13;18(4):e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27. PMID: 30181915; PMCID: PMC6117512.
144. Rondas GA, Macri EM, Oei EH, Bierma-Zeinstra SM, Rijkels-Otters HB, Runhaar J. Association between hip pain and radiographic hip osteoarthritis in primary care: the CHECK cohort. *Br J Gen Pract*. 2022 Jul 26;72(723):e722–8. doi: 10.3399/BJGP.2021.0547. Epub ahead of print. PMID: 36127152; PMCID: PMC9512408.
145. Rosenberg JH, Rai V, Dilisio MF, Sekundiak TD, Agrawal DK. Increased expression of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in osteoarthritis of human knee joint compared to hip joint. *Mol Cell Biochem*. 2017 Dec;436(1-2):59-69. doi: 10.1007/s11010-017-3078-x. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28573383.
146. Rosenberg JH, Rai V, Dilisio MF, Sekundiak TD, Agrawal DK. Increased expression of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in osteoarthritis of human knee joint compared to hip joint. *Mol Cell Biochem*. 2017 Dec;436(1-2):59-69. doi: 10.1007/s11010-017-3078-x. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28573383.
147. Rosenberg TD, Paulos LE, Parker RD, Coward DB, Scott SM. The forty-five-degree posteroanterior flexion weight-bearing radiograph of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:1479-83.
148. Rousseau JC, Chapurlat R, Garnero P. Soluble biological markers in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2021 Sep 29;13:1759720X211040300. doi: 10.1177/1759720X211040300. PMID: 34616494; PMCID: PMC8488516.

149. Runhaar J, Özbulut Ö, Kloppenburg M, Boers M, Bijlsma JWJ, Bierma-Zeinstra SMA. CREDO expert group. Diagnostic criteria for early hip osteoarthritis: first steps, based on the CHECK study. *Rheumatol* 2021;60:5158-64.
150. Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Meknavin S, Ngarmukos S, Tanpowpong T, Parkpian V. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2014 May;38(5):1099-104. doi: 10.1007/s00264-013-2192-y. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24297611; PMCID: PMC3997768.
151. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018 Jan;72(1):32-42. doi: 10.1007/s11418-017-1144-z. Epub 2017 Nov 21. Erratum in: *J Nat Med*. 2018 Jan;72(1):43. doi: 10.1007/s11418-017-1163-9. PMID: 29164507; PMCID: PMC5775980.
152. Sandiford N, Kendoff D, Muirhead-Allwood S. Osteoarthritis of the hip: aetiology, pathophysiology and current aspects of management. *Ann Jt* [Internet]. AME Publishing Company; 2020 Aug 20];5. Available from: <https://aoj.amegroups.com/article/view/5539>
153. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*. 2006 Jun 1;396(2):201-14. doi: 10.1042/BJ20060195. PMID: 16683912; PMCID: PMC1462724.
154. Santoni G, Cardinali C, Morelli MB, Santoni M, Nabissi M, Amantini C. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *J Neuroinflammation*. 2015 Feb 3;12:21. doi: 10.1186/s12974-015-0239-2. PMID: 25644504; PMCID: PMC4322456.
155. Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(5):470. doi: 10.1186/s13075-014-0470-8. PMID: 25606597; PMCID: PMC4289196.
156. Schelbergen RF, de Munter W, van den Bosch MH, Lafeber FP, Sloetjes A, Vogl T, Roth J, van den Berg WB, van der Kraan PM, Blom AB, van Lent PL.

- Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016 Jan;75(1):218-25. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205480. Epub 2014 Sep 1. PMID: 25180294.
157. Schelbergen RF, de Munter W, van den Bosch MH, Lafeber FP, Sloetjes A, Vogl T, Roth J, van den Berg WB, van der Kraan PM, Blom AB, van Lent PL. Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016 Jan;75(1):218-25. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205480. Epub 2014 Sep 1. PMID: 25180294.
158. Schelbergen RF, van Dalen S, ter Huurne M, Roth J, Vogl T, Noël D, Jorgensen C, van den Berg WB, van de Loo FA, Blom AB, van Lent PL. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 Aug;22(8):1158-66. doi: 10.1016/j.joca.2014.05.022. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24928317.
159. Schelbergen RF, van Dalen S, ter Huurne M, Roth J, Vogl T, Noël D i sur. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:1158-66.
160. Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, Apuzzo T, De Marchis F, Pedotti M, Bachi A, Thelen M, Varani L, Mellado M, Proudfoot A, Bianchi ME, Ugucioni M. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 2012 Mar 12;209(3):551-63. doi: 10.1084/jem.20111739. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22370717; PMCID: PMC3302219.
161. Selim F, Ahmed R, Eid M, ElSaadany H, Nada DW. Role of serum adropin as a novel biomarker in primary knee osteoarthritis patients: Relation to the functional status, radiographic grading and ultrasonographic findings. *Egyptian Rheumatol* 2022 Mar 6 ;44:295-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2022.03.002>
162. Shao B, Xu Y, Jia M, Li CX, Gong ZC. Association of HMGB1 levels in synovial fluid with the severity of temporomandibular joint osteoarthritis. *BMC*

- Musculoskelet Disord. 2023 Mar 11;24(1):183. doi: 10.1186/s12891-023-06208-0. PMID: 36906519; PMCID: PMC10007792.
163. Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, Yu CL. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules*. 2020 Nov 27;25(23):5591. doi: 10.3390/molecules25235591. PMID: 33261212; PMCID: PMC7729569.
164. Simonian MH, Smith JA. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr Protoc Mol Biol*. 2006 Nov;Chapter 10:Unit 10.1A. doi: 10.1002/0471142727.mb1001as76. PMID: 18265371.
165. Simonian MH. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr Protoc Cell Biol*. 2002 Aug;Appendix 3:Appendix 3B. doi: 10.1002/0471143030.cba03bs15. PMID: 18228395.
166. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013 Apr;5(2):77-94. doi: 10.1177/1759720X12467868. PMID: 23641259; PMCID: PMC3638313.
167. Sprenkeler EGG, Zandstra J, van Kleef ND, Goetschalckx I, Verstegen B, Aarts CEM, Janssen H, Tool ATJ, van Mierlo G, van Bruggen R, Jongerius I, Kuijpers TW. S100A8/A9 Is a Marker for the Release of Neutrophil Extracellular Traps and Induces Neutrophil Activation. *Cells*. 2022 Jan 11;11(2):236. doi: 10.3390/cells11020236. PMID: 35053354; PMCID: PMC8773660.
168. Sun XH, Liu Y, Han Y, Wang J. Expression and Significance of High-Mobility Group Protein B1 (HMGB1) and the Receptor for Advanced Glycation End-Product (RAGE) in Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit*. 2016 Jun 20;22:2105-12. doi: 10.12659/msm.895689. PMID: 27320800; PMCID: PMC4918532.
169. Szilagyi IA, Vallerga CL, Boer CG, Schiphof D, Ikram MA, Bierma-Zeinstra SMA, van Meurs JBJ. Plasma proteomics identifies CRTAC1 as a biomarker for osteoarthritis severity and progression. *Rheumatology (Oxford)*. 2023 Mar 1;62(3):1286-1295. doi: 10.1093/rheumatology/keac415. PMID: 35924962; PMCID: PMC9977119.

170. Taniguchi N, Kawakami Y, Maruyama I, Lotz M. HMGB proteins and arthritis. *Hum Cell*. 2018 Jan;31(1):1-9. doi: 10.1007/s13577-017-0182-x. Epub 2017 Sep 15. PMID: 28916968; PMCID: PMC6541443.
171. Teirlinck CH, Verhagen AP, van Ravesteyn LM, Reijneveld-van de Vendel EAE, Runhaar J, van Middelkoop M, Ferreira ML, Bierma-Zeinstra SM. Effect of exercise therapy in patients with hip osteoarthritis: A systematic review and cumulative meta-analysis. *Osteoarthr Cartil Open*. 2023 Jan 19;5(1):100338. doi: 10.1016/j.ocarto.2023.100338. Erratum in: *Osteoarthr Cartil Open*. 2024 Feb 26;6(2):100447. doi: 10.1016/j.ocarto.2024.100447. PMID: 36817089; PMCID: PMC9932106.
172. Teissier T, Boulanger É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology*. 2019 Jun;20(3):279-301. doi: 10.1007/s10522-019-09808-3. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30968282.
173. Terada C, Yoshida A, Nasu Y, Mori S, Tomono Y, Tanaka M, Takahashi HK, Nishibori M, Ozaki T, Nishida K. Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama*. 2011 Dec;65(6):369-77. doi: 10.18926/AMO/47262. PMID: 22189477.
174. Urits I, Orhurhu V, Powell J, Murthy A, Kiely B, Shipon S, Kaye RJ, Kaye AD, Arron BL, Cornett EM, Viswanath O. Minimally Invasive Therapies for Osteoarthritic Hip Pain: a Comprehensive Review. *Curr Pain Headache Rep*. 2020 Jun 6;24(7):37. doi: 10.1007/s11916-020-00874-8. PMID: 32506251.
175. van den Bosch MH, Blom AB, Schelbergen RF, Koenders MI, van de Loo FA, van den Berg WB, Vogl T, Roth J, van der Kraan PM, van Lent PL. Alarmin S100A9 Induces Proinflammatory and Catabolic Effects Predominantly in the M1 Macrophages of Human Osteoarthritic Synovium. *J Rheumatol*. 2016 Oct;43(10):1874-1884. doi: 10.3899/jrheum.160270. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27481901.
176. van den Bosch MH, Blom AB, Schelbergen RF, Vogl T, Roth JP, Slöetjes AW, van den Berg WB, van der Kraan PM, van Lent PL. Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in Murine Knee Joints: Implications for

- Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jan;68(1):152-63. doi: 10.1002/art.39420. PMID: 26360647.
177. van den Bosch MHJ. Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease? *Clin Exp Immunol.* 2019 Feb;195(2):153-166. doi: 10.1111/cei.13237. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30421798; PMCID: PMC6330652.
178. van Kooten NJT, Blom AB, Teunissen van Manen IJ, Theeuwes WF, Roth J, Gorris MAJ, Walgreen B, Sloetjes AW, Helsen MM, Vitters EL, van Lent PLEM, Koëter S, van der Kraan PM, Vogl T, van den Bosch MHJ. S100A8/A9 drives monocytes towards M2-like macrophage differentiation and associates with M2-like macrophages in osteoarthritic synovium. *Rheumatology (Oxford).* 2025 Jan 1;64(1):332-343. doi: 10.1093/rheumatology/keae020. PMID: 38216750; PMCID: PMC11701306.
179. van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Slöetjes A, Lafeber FP, Lems WF, Cats H, Vogl T, Roth J, van den Berg WB. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1466-76. doi: 10.1002/art.34315. PMID: 22143922.
180. van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Slöetjes A, Lafeber FP, Lems WF, Cats H, Vogl T, Roth J, van den Berg WB. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1466-76. doi: 10.1002/art.34315. PMID: 22143922.
181. van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Slöetjes A, Lafeber FP, Lems WF, Cats H, Vogl T, Roth J, van den Berg WB. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1466-76. doi: 10.1002/art.34315. PMID: 22143922.
182. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 2015 Aug 18;6:422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422. PMID: 26347745; PMCID: PMC4539554.
183. Veronese N, Cereda E, Maggi S, Luchini C, Solmi M, Smith T, Denkinger M, Hurley M, Thompson T, Manzano E, Sergi G, Stubbs B. Osteoarthritis and mortality:

- A prospective cohort study and systematic review with meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2016 Oct;46(2):160-167. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.04.002. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27179749.
184. Wang L, Wu J, Guo X, Huang X, Huang Q. RAGE Plays a Role in LPS-Induced NF- κ B Activation and Endothelial Hyperpermeability. *Sensors (Basel).* 2017 Mar 30;17(4):722. doi: 10.3390/s17040722. PMID: 28358333; PMCID: PMC5421682.
185. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol.* 2018 Jun 11;9:1298. doi: 10.3389/fimmu.2018.01298. PMID: 29942307; PMCID: PMC6004386.
186. Wang Y, Shen S, Li Z, Li W, Weng X. MIR-140-5p affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and inflammation by targeting HMGB1 in osteoarthritis. *Inflamm Res.* 2020 Jan;69(1):63-73. doi: 10.1007/s00011-019-01294-0. Epub 2019 Nov 11. PMID: 31712854.
187. Wang, X, Qiao, Y, Yuan, F, Liu, Y, Hu, J, Zhang, Q, Wang, F, Zhao, Z. Metformin inhibits knee osteoarthritis induced by type 2 diabetes mellitus in rats: S100A8/9 and S100A12 as players and therapeutic targets. *Open Chemistry.* 2024 22(1): 16072-2 DOI: <https://doi.org/10.1515/chem-2024-0013>
188. Wluka AE, Lombard CB, Cicuttini FM. Tackling obesity in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Apr;9(4):225-35. doi: 10.1038/nrrheum.2012.224. Epub 2012 Dec 18. PMID: 23247649.
189. Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res* 2020;38:253-7.
190. Wu J, Wang K, Xu J, Ruan G, Zhu Q, Cai J, Ren J, Zheng S, Zhu Z, Otahal P, Ding C. Associations between serum ghrelin and knee symptoms, joint structures and cartilage or bone biomarkers in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017 Sep;25(9):1428-1435. doi: 10.1016/j.joca.2017.05.015. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28602782.
191. Wu X, Shi X, Chen X, Yin Z. Epigallocatechin gallate (EGCG) can epigenetically regulate the receptor of advanced glycation end products (RAGE) to ameliorate Osteoarthritis. *J Funct Foods* 2023 July 31. 107:105682. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105682>

192. Xiao X, Yang C, Qu SL, Shao YD, Zhou CY, Chao R, Huang L, Zhang C. S100 proteins in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2020 Mar;502:293-304. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.019. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31794767.
193. Xiao Y, Ding L, Yin S, Huang Z, Zhang L, Mei W, Wu P, Wang P, Pan K. Relationship between the pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes and HMGB1 secretion in knee osteoarthritis. *Mol Med Rep*. 2021 Feb;23(2):97. doi: 10.3892/mmr.2020.11736. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33300062; PMCID: PMC7723153.
194. Yang H, Wang H, Chavan SS, Andersson U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol Med*. 2015 Oct 27;21 Suppl 1(Suppl 1):S6-S12. doi: 10.2119/molmed.2015.00087. PMID: 26605648; PMCID: PMC4661054
195. Yang Y, Liu G, Li F, Carey LB, Sun C, Ling K, Tachikawa H, Fujita M, Gao XD, Nakanishi H. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) mediates phagocytosis in nonprofessional phagocytes. *Commun Biol*. 2022 Aug 16;5(1):824. doi: 10.1038/s42003-022-03791-1. PMID: 35974093; PMCID: PMC9381800.
196. Yuan J, Wang D, Zhang Y, Dou Q. Genetically predicted obesity and risk of hip osteoarthritis. *Eat Weight Disord*. 2023 Feb 15;28(1):11. doi: 10.1007/s40519-023-01538-3. PMID: 36790552; PMCID: PMC9931853.
197. Yue Q, Song Y, Liu Z, Zhang L, Yang L, Li J. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): A Pivotal Hub in Immune Diseases. *Molecules*. 2022 Aug 2;27(15):4922. doi: 10.3390/molecules27154922. PMID: 35956875; PMCID: PMC9370360.
198. Zhang C, Yu W, Huang C, Ding Q, Liang C, Wang L, Hou Z, Zhang Z. Chrysin protects human osteoarthritis chondrocytes by inhibiting inflammatory mediator expression via HMGB1 suppression. *Mol Med Rep*. 2019 Feb;19(2):1222-1229. doi: 10.3892/mmr.2018.9724. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30535473.
199. Zhao J, Endoh I, Hsu K, Tedla N, Endoh Y, Geczy CL. S100A8 modulates mast cell function and suppresses eosinophil migration in acute asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2011 May 1;14(9):1589-600. doi: 10.1089/ars.2010.3583. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21142608.
200. Zheng S, Tu L, Cicuttini F, Zhu Z, Han W, Antony B, Wluka AE, Winzenberg T, Aitken D, Blizzard L, Jones G, Ding C. Depression in patients with knee

osteoarthritis: risk factors and associations with joint symptoms. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2021 Jan 7;22(1):40. doi: 10.1186/s12891-020-03875-1. PMID: 33413273; PMCID: PMC7791830.

201. Zhong HM, Zhao GF, Lin T, Zhang XX, Li XY, Lin JF, Zhao SQ, Pan ZJ. Intra-Articular Steroid Injection for Patients with Hip Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2020 Feb 24;2020:6320154. doi: 10.1155/2020/6320154. PMID: 32185212; PMCID: PMC7060863.
202. Zhou S, Liu G, Si Z, Yu L, Hou L. Glycyrrhizin, an HMGB1 inhibitor, Suppresses Interleukin-1 β -Induced Inflammatory Responses in Chondrocytes from Patients with Osteoarthritis. *Cartilage.* 2021 Dec;13(2_suppl):947S-955S. doi: 10.1177/1947603520934858. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32602358; PMCID: PMC8804755.
203. Zreiqat H, Belluoccio D, Smith MM, Wilson R, Rowley LA, Jones K, Ramaswamy Y, Vogl T, Roth J, Bateman JF, Little CB. S100A8 and S100A9 in experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R16. doi: 10.1186/ar2917. Epub 2010 Jan 27. PMID: 20105291; PMCID: PMC2875644.

7. ŽIVOTOPIS

(CURRICULUM VITAE)

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Sandra Rusac Kukić, dr. med.

Adresa: M. B. Rašana 2c, 52000 Pazin

Telefon:

+385 99 277 3440

+385 52 624 500

E-pošta: rusacs@gmail.com

Datum rođenja: 6. prosinca 1970.

Narodnost: Hrvatica

Spol: Ženski

ZAPOSLENJE

Specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije

Thalassotherapia Opatija, M. Tita 188, 51410 Opatija

RADNO ISKUSTVO

2011. – danas

Specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije, Thalassotherapia Opatija

2004. – 2011.

Specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije, Istarske toplice

2000. – 2003.

Specijalizacija iz fizikalne medicine i rehabilitacije

1998. – 1999.

Hitna medicinska pomoć, Pazin

1996. – 1998.

Pripravnički staž, Dom zdravlja Pazin i KBC Rijeka

OBRAZOVANJE

2016. – danas

Doktorski studij Zdravstveno i ekološko inženjerstvo

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2011. – 2018.

Dodatne edukacije:

edukacija iz izokinetike – Zagreb i Zürich (Švicarska)

edukacija iz ultrazvuka lokomotornog sustava – Sveučilišna bolnica Beč (Austrija)

edukacija iz muskuloskeletnog ultrazvuka – KBC Zagreb

edukacija iz kinezi-tapinga

2010.

Edukacija iz ultrazvuka lokomotornog sustava, Klinika za traumatologiju, Zagreb

2000. – 2003.

Specijalizacija iz fizikalne medicine i rehabilitacije, KBC Rijeka i KBC Zagreb

1989. – 1995.

Studij opće medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1978. – 1989.

Osnovna i srednja škola (gimnazija), Pazin

OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Poznavanje rada na računalu

Aktivno i pasivno znanje engleskog i talijanskog jezika

Dobre komunikacijske vještine

Timski rad

Organizacijske sposobnosti

ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI (BIBLIOGRAFIJA)

Rusac-Kukić, S.; Šupak, S.; Ravnić Marušić, B. i dr. A comparative isokinetic evaluation post HIIT training: STEMI patients vs. healthy counterparts. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*, 2025; 39 (3–4): 226

Rusac-Kukić, S.; Višnić, A.; Rogić Vidaković, M.; Bobek, D. Serum Levels of HMGB1, hS100A8/A9, and sRAGE in Patients with Knee and Hip Osteoarthritis: Inflammatory Biomarkers of Disease Activity. *Journal of Clinical Medicine*, 2025; 14(17).

Rogoznica, M.; Rusac Kukić, S.; Kehler, T. Rabdomioliza uslijed izokinetičkog treninga – prikaz slučaja. *Reumatizam*, 2024; 71 (Supp 1): 45–46.

Petric, N.; Brentin, M.; Dessardo, L.; Brentin, I.; Rusac Kukić, S. Omjer snage rotatora ramena kod profesionalnih plivača. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*, 2024; 38 (1–2): 81–82.

Arbanas, J.; Ivanac, D.; Vlahović, H.; Malnar Daniela, M.; Rusac-Kukić, S. Association between the strength of trunk flexors and extensors with the morphology of the psoas major muscle in patients with low back pain syndrome. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2023; 45: 1393–1393.

Kehler, T.; Petric, N.; Brentin, M.; Rusac-Kukić, S. Primjena izokinetičkog treninga u bolesnika s aksijalnim spondiloartritisom. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*, 2022; 36 (1–2): 56–57.

Miletić, B.; Rusac-Kukić, S.; Lekić, A.; Courteney, U. Pothranjenost u gerijatrijskoj populaciji – nezaobilazan čimbenik u suvremenom liječenju. 4. Hrvatski gerontološki i gerijatrijski kongres, 2020.

Rusac-Kukić, S.; Rusac, S.; Buljevac, M. Kvaliteta života i samoprocjena zdravstvenih i nekih aspekata kvalitete života starijih osoba s osteoartritisom koljena. *Journal of Applied Health Sciences*, 2020; 6 (1): 63–76.

Laskarin, G.; Kehler, T.; Peršić, V.; Rusac-Kukić, S. i dr. Granulysin mediated cytotoxicity and its serum concentration in patients with knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019; 78: 1869.

Kauzlarić-Živković, T.; Kirner, M.; Rusac-Kukić, S.; Legović, A.; Ružić-Baršić, A.; Beck, N.; Petrc, N.; Kehler, T. Posttraumatski promijenjena biomehanika ramenog zgloba. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*, 2018; 31 (1–2): 145–145.

Laškarin, G.; Peršić, V.; Rusac-Kukić, S.; Massari, D.; Legović, A.; Boban, M.; Miškulin, R.; Rogoznić, M.; Kehler, T. Can pain intensity in osteoarthritis joint be indicator of the impairment of endothelial function? *Medical Hypotheses*, 2016; 94: 15–19.

Kehler, T.; Rusac-Kukić, S.; Massari, D.; Legović, A.; Karlavaris, D.; Rogoznica, M. Balneoterapija – jučer i danas. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*, 2016; 28 (1–2): 313–314.

Legović, A.; Rusac-Kukić, S.; Legović, T. Application of a radiofrequency resonance in treatment of painful shoulder syndrome. *Medica Jadertina*, 2015; 45 (1–2): 39–47.

Rusac-Kukić, S.; Massari, D.; Legović, A.; Karlavaris, D.; Kehler, T. Izokinetika – brza i efikasnija rehabilitacija; primjena izokinetičkog sustava u rehabilitaciji bolesnika s neurološkim deficitom. *Medicina Fluminensis*, 2012; 48 (4): 504–509.