

Izražaj i lokalizacija iNOS, BCL-2 i MMP-9 u sinovijalnoj ovojnici kuka u bolesnika s osteoartritisom

Čarić, Davor

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:668618>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-07**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

DAVOR ČARIĆ

**IZRAŽAJ I LOKALIZACIJA iNOS, BCL-2 I MMP-9 U
SINOVIJALNOJ OVOJNICI KUKA U BOLESNIKA S
OSTEOARTRITISOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

DAVOR ČARIĆ

**IZRAŽAJ I LOKALIZACIJA iNOS, BCL-2 I MMP-9 U
SINOVIJALNOJ OVOJNICI KUKA U BOLESNIKA S
OSTEOARTRITISOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021.

Doktorska disertacija je napravljena u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Zavodu za ortopediju i traumatologiju KBC Split i Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split.

Voditeljica rada: prof.dr.sc. Katarina Vukojević, dr. med.

Zahvala

Zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Katarini Vukojević, dr. med. na iznimnoj pomoći, podršci i ustrajnosti tijekom izrade Doktorske disertacije.

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta u Splitu na nesebičnoj pomoći, posebno izv. prof.dr.sc Nataliji Filipović i dr.sc. Benjaminu Benzoni.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Sandri Zekić Tomaš, dr. med sa Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split i izv. prof. dr. sc. Violeti Šolić, dr. med. sa Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Mostaru.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem supruzi Ani, kćeri Dori, sinovima Marku i Ivanu kao i svojim roditeljima jer su mi bili podrška u svim životnim razdobljima.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Definicija osteoartritisa	1
1.2.	Sastav i struktura zglobne hrskavice.....	1
1.3.	Etiologija i učestalost osteoartritisa.....	3
1.4.	Patogeneza OA.....	4
1.4.1	Upalne i histološke promjene u osteoartritisu.....	8
1.4.2	Matriks metaloproteinaze u osteoartritisu.....	10
1.4.3	Dušik oksid (NO) u osteoartritisu.....	11
1.5.	Apoptoza.....	12
1.5.1.	BCL-2 u apoptozi.....	13
1.5.2.	Putovi apoptoze	14
1.5.3.	BCL-2 u reumatoidnom artritisu i osteoartritisu.....	14
2.	HIPOTEZE I CILJEVI RADA.....	15
3.	ISPITANICI I POSTUPCI.....	16
3.1.	Ispitanici.....	16
3.2.	Bodovanje i razvrstavanje u skupine.....	16
3.3	Sakupljanje uzoraka.....	20
3.4.	Uklapanje i rezanje tkiva.....	21
3.5.	Patohistološka analiza i metoda dvostruke imunofluorescencije.....	21
3.5.1.	Detekcija i izračun dvostruko pozitivnih stanica.....	26
3.6.	Statistička analiza.....	26
3.7.	Etička načela.....	26

4.	REZULTATI.....	27
4.1.	Klinička, radiološka i patohistološka obilježja istraživanih skupina.....	27
4.2.	Semikvantitativna i kvantitativna analiza dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja.....	30
5.	RASPRAVA.....	41
6.	ZAKLJUČCI.....	44
7.	SAŽETAK.....	45
8.	SUMMARY.....	46
9.	LITERATURA.....	47
10.	ŽIVOTOPIS.....	56

POPIS OZNAKA I KRATICA

ATP	adenozin trifosfat (<i>engl. adenosine-5-triphosphate</i>)
BCL-2	B-stanični protein limfoma 2 (<i>engl. B-cell lymphoma protein 2</i>)
CAD	kaspazom aktivirana DN-aza (<i>engl. Caspase Activated Dnase</i>)
cGMP	aktivni ciklički gvanozin monofosfat (<i>engl. cyclic guanosine monophosphate</i>)
COX-2	ciklooksigenaza 2 (<i>engl. cyclooxygenase-2</i>)
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
ECM	ekstracelularni matriks
GTP	gvanozin trifosfat (<i>engl. guanosine -5- triphosphate</i>)
HHS	zbroj po Harris-u (<i>engl. Harris Hip Score</i>)
HIF-2α	hipoksija-inducibilni faktor 2 alfa (<i>engl. hypoxia-inducible factor-2α</i>)
iNOS	inducibilna dušik oksid sintetaza (<i>engl. inducibile nitric oxide synthase</i>)
K-L	Kellgren-Lawrence ljestvica
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (<i>engl. mitogen-activated protein kinase</i>)
MMP	matriks metaloproteinaza enzim (<i>engl. matrix metalloproteinase</i>)
NO	dušik oksid
NF-κB	nuklearni faktor kappa-pojačivač lakog lanca aktiviranih B stanica (<i>engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
OA	osteoartritis
OARSI	Međunarodno udruženje za istraživanje osteoartritisa (<i>engl. Osteoarthritis Research Society International</i>)
PBS	fosfatni puffer (<i>engl. Phosphate Buffer Saline</i>)
SSF	sinoviociti slični fibroblastima
sGC	solubilna gvanozin ciklaza (<i>engl. soluble guanylyl cyclase</i>)

TGF-β	tumorski faktor rasta beta (<i>engl. transforming growth factor beta</i>)
TNF-α	tumorski nekrotizirajući faktor alfa (<i>engl. tumor necrosis factor alpha</i>)
VAS	vizualno-analogna ljestvica (<i>engl. visual-analogue scale</i>)
Wnt	signalni put transdukcije signala (<i>engl. wingless-related intrgration site</i>)
WOMAC	<i>engl. Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index</i>

1. UVOD

1.1. Definicija osteoartritisa

Osteoarthritis (OA) je degenerativna bolest zglobova koja uzrokuje progresivno oštećenje zglobne hrskavice i okolnih struktura zgloba te je čest uzrok boli i invaliditeta starije populacije (1-3). OA kuka je jedan od najčešćih oblika OA i znatno utječe na kvalitetu života oboljelih, a ima i značajan negativan ekonomski učinak na društvo zbog smanjene sposobnosti radno aktivnog stanovništva i troškova liječenja (4, 5). Prevalencija simptomatskog OA kuka iznosi 9,2% u populaciji starijoj od 45 godina (6). OA je definiran kao kronična bolest cijelog zgloba što uključuje zglobnu hrskavicu, podležeću subhondralnu kost, sinovijalnu ovojnicu, ligamente i okolne tetive. Patološke promjene uključuju razgradnju hrskavice, upalu sinovijalne ovojnice, sklerozaciju subhondralne kosti, stvaranje osteofita te degeneraciju ligamenata i tetiva (2, 3).

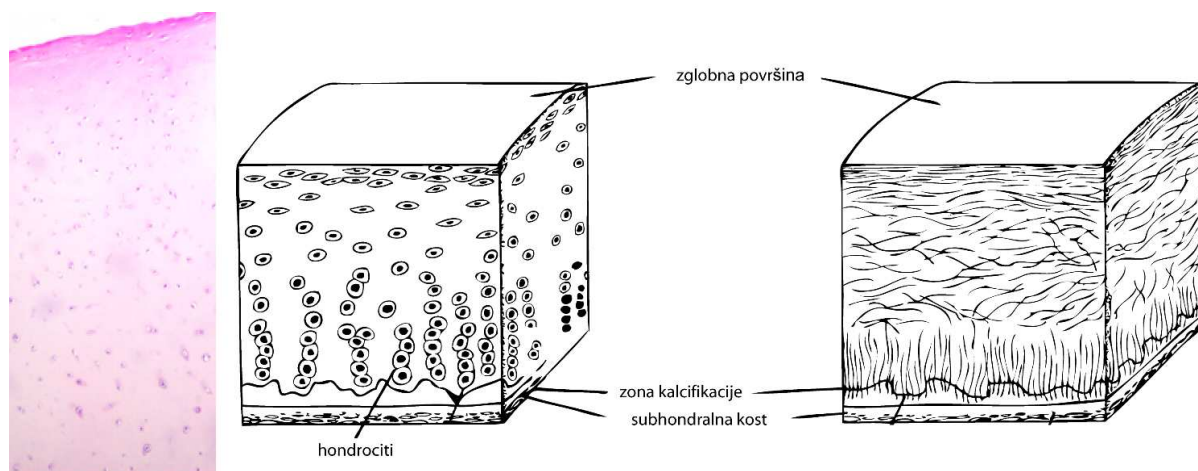
1.2. Sastav i struktura zglobne hrskavice

Zglobna hrskavica sadrži samo jednu vrstu stanica, hondrocite koji sačinjavaju tek 1% volumena hrskavice (7). Ne sadrži krvne i limfne žile niti živce. Hondrociti različitih zona hrskavice razlikuju se oblikom i veličinom te su okruženi ekstracelularnim matriksom (ECM) koji sprječava međusobni kontakt hondrocita. Zreli hondrociti su sferičnog oblika i sintetiziraju kolagen tip II, proteoglikane i nekolagenske bjelančevine. Starenjem hondrocita, smanjuje se njihova sposobnost proizvodnje proteoglikana kao i odgovor na djelovanje anaboličkih faktora (8). Normalna homeostaza ECM se odvija tako da se razgrađene komponente matriksa zamjenjuju novima koje sintetiziraju hondrociti. Ostarjeli hondrociti ne mogu ispuniti tu funkciju te dolazi do razgradnje i promjene sastava ECM.

Osnovne sastavnice ECM su voda i strukturne molekule u koje se ubrajaju proteoglikani u nakupinama (agregati), kolageni i glikoproteini. Oko 80% mase hrskavice jest voda. Mehanička svojstva hrskavice ovise o načinu vezanja vode sa makromolekulama (9). Negativno nabijenim molekulama proteoglikana protutežu čine pozitivno nabijeni kationi; pretežno kationi natrija koji se nalaze u vodenoj komponenti ekstracelularnog matriksa (10).

Najzastupljenija makromolekula ECM jest kolagen koji sačinjava mrežu vlakana, a koja hrskavici daje oblik i vlačnu čvrstoću. S mrežom kolagena se vežu proteoglikani i glikoproteini. Udio kolagena tip II u ukupnom kolagenu zglobne hrskavice iznosi 90-95%. Ostali tipovi kolagena su tipovi III, VI, IX, X, XI XII i XIV (11). Kolagen čini oko 2/3 ukupne mase hrskavice. Proteoglikani se sastoje od proteinske jezgre i jednog ili više lanaca negativno nabijenih glikozaminoglikana. Glikozaminoglikani zglobne hrskavice su: dermatan sulfat, hondroitin sulfat, hijaluronska kiselina, keratan sulfat i heparan sulfat. Veliki proteoglikani u nakupinama, odnosno agregati, čine oko 90 % glikozaminoglikana, dok su ostatak manji proteoglikani kao što su biglikan i fibromodulin (12).

Zglobna hrskavica je organizirana u 4 zone: površinsku, prijelaznu, duboku i zonu kalcificirane hrskavice (Slika 1). Hondrociti pojedinih zona se razlikuju oblikom, veličinom i orijentacijom. Kolagena vlakna i hondrociti površinske zone su paralelni sa zglobnom površinom, a prema dubljim zonama orijentacija je sve okomitija. Sadržaj vode i proteoglikana kao i mehanička svojstva hrskavice su različiti među zonama. Tako je primjerice u površinskoj zoni najveći sadržaj vode i kolagena, a najmanji proteoglikana.



Slika 1. Zone zdrave zglobne hrskavice s prostornom organizacijom hondrocita i kolagenih vlakana (shema); patohistološki i shematski prikaz.

Ekstracelularni matriks se dijeli u tri zone: pericelularni matriks, teritorijalni i ekstrateritorijalni matriks. Pericelularni i teritorijalni matriks povezuju stanične membrane hondrocita s molekulama proteoglikana i štite hondrocite prilikom deformacije hrskavice

uzrokovane opterećenjem. Uloga interteritorijalnog matriksa je pružanje mehaničke potpore hrskavici (7).

1.3. Etiologija i učestalost osteoartritisa

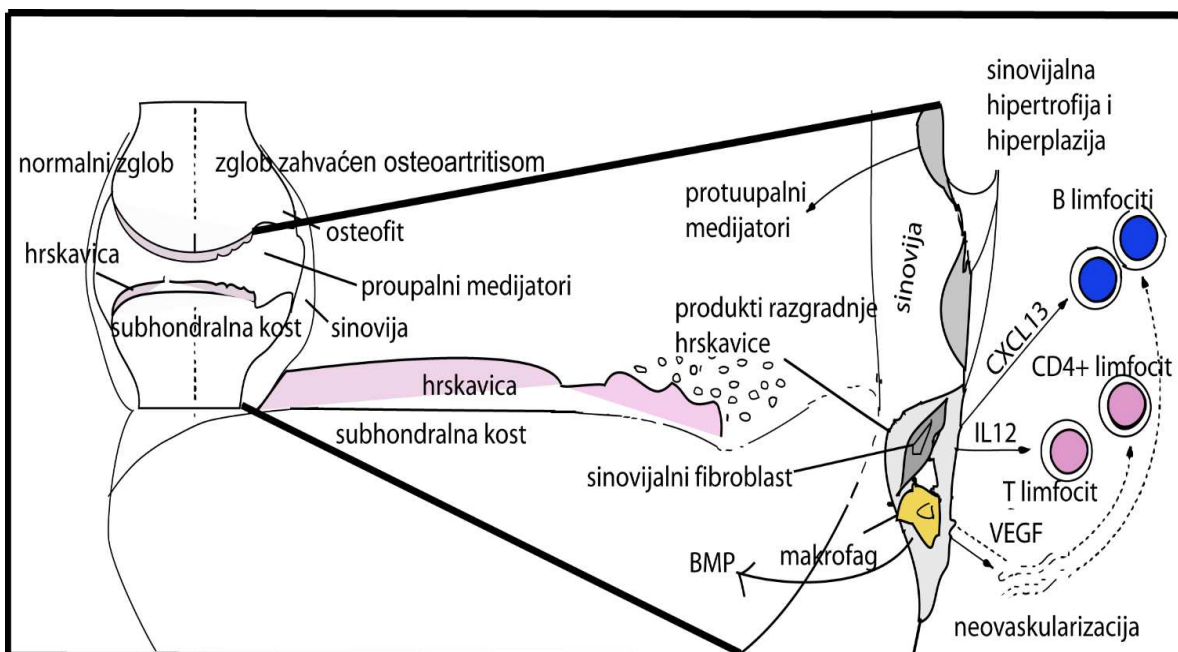
Osteoartritis se dijeli na primarni i sekundarni. Uzrok primarnog OA je nepoznat, a etiologija je multifaktorijalna. Čimbenici rizika su dob, spol, prekomjerna tjelesna težina i genetska predispozicija (13, 14). Znatno je češći u starijoj dobi, većina populacije starije od 65 godina, ima radiološki pozitivan OA jednog ili više zglobova (15). Učestalost je veća u žena, vjerojatno zbog različitih hormonskih utjecaja. Kod pretilih osoba OA se razvija u ranijoj dobi i ima težu kliničku sliku, a ishod operacija aloartroplastičnih zamjena zglobova je lošiji. Vjerojatni je razlog, osim povećanog opterećenja zglobova, povišena koncentracija adipokina, cirkulirajućih hormona masnog tkiva (16). Debljina doprinosi sustavnoj upali niskog stupnja te su u cirkulaciji pretilih osoba pronađene povišene koncentracije TNF- α (*engl. tumor necrosis factor alpha*) i interleukina IL-1 β , IL-6, IL-8 koji mogu povećati ekspresiju enzima matriks metaloproteinaza (MMP) (17).

Uzrok sekundarnog OA su stanja koja oštećuju zglobnu hrskavicu ili mijenjaju fiziološku biomehaniku zgloba. Najčešći oblik je posttraumatski OA. U uzroke posttraumatskog OA se ubrajaju zglobni prijelomi sa zaostalim inkongruentnim zglobnih površinama i ozljedom hrskavice, izvanzglobni prijelomi s poremećajem mehaničke osovine i posljedičnom promjenom resultantne sile koja djeluje na zglob te ozljede meniska i ukriženih ligamenata (zglob koljena) koji mijenjanju normalnu biomehaniku i uzrokuju početak upalne reakcije (18).

Drugi uzroci sekundarnog OA su: infekcije koje uzrokuju razgradnju zglobne hrskavice, koštano-zglobne displazije s poremećajem strukture i građe zglobova i hrskavice, aseptična nekroza kosti, bolesti nakupljanja kao što je Gaucherova bolest, Pagetova bolest, akromegalija, Ehlers-Danlos sindrom i druge (7).

1.4. Patogeneza OA

Bez obzira na uzrok, primarni poremećaj se očituje gubitkom svojstava ekstracelularnog matriksa (7). Zglobna hrskavica se sastoji od hondrocita i ekstracelularnog matriksa čije su sastavnice pretežno voda, kolagen tip II te proteoglikani u nakupinama odnosno agrekani, uz vrlo malu količinu kalcijevih soli (19). Svojstva i sastav zglobne hrskavice ovise o ravnoteži proizvodnje ECM, što je funkcija hondrocita i razgradnje proteolitičkim enzimima. Proces pregradnje ekstracelularnog matriksa je vrlo spor što se mijenja tijekom OA. Hondrociti imaju receptore za komponente ECM, dio kojih je osjetljiv i na mehaničke podražaje. U OA dolazi do izražaja hondrocitnih citokinskih receptora i receptora za MMPe, kao i pojačanog izražaja niza gena koji djeluju imunomodulacijski na upalne i kataboličke procese uključujući gene za ciklooksigenazu 2 (COX-2) i inducibilnu dušik oksid sintetazu (iNOS). Stimulacija hondrocitnih receptora dovodi do stimulacije proizvodnje pro-upalnih citokina i MMP. Na aktivnost hondrocita utječu polipeptidni čimbenici rasta, citokini kao i mehanički podražaji, a određen utjecaj imaju i sastavnice matriksa (20). Aktivacija hondrocita mehaničkim podražajima i pro-upalnim čimbenicima se odvija putem NF- κ B (*engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i MAPK (*engl. mitogen-activated protein kinase*) signalnih putova te je aktivacija NF- κ B puta neophodna za izražaj većine receptora na stanicama (19). U patogenezi OA ulogu imaju i HIF-2 α (*engl. hypoxia-inducible factor-2 α*) poticanjem sinteze MMP (21), te Wnt signalni put koji potiče hipertrofiju hondrocita (22). Čini se kako je prvi patogenetski poremećaj nesposobnost hondrocita pri održavanju homeostaze ECM (23). Upalni proces ili mehaničko oštećenje, primjerice nakon traume, povećavaju enzimsku aktivnosti i aktiviraju makrofage čiji razgradni produkti utječu na hondrocite potičući lučenje proteolitičkih enzima (13,14). Makrofagi, koji se pretežno nalaze u zglobnoj sinovijalnoj ovojnici fagocitiraju proizvode razgradnje kolagena i proteoglikana što uzrokuje proizvodnju i oslobađanje pro-upalnih citokina: TNF- α i interleukina IL-1 i IL-6 (15) (Slika 2.). Citokini se vežu za receptorska mjesta na hondrocitima nakon čega dolazi do povećane sinteze i oslobađanja MMP, ali i promjena u proizvodnji kolagena tipa II (16). Razgradni produkti bjelancevina ECM, kao što su fibronektin, mali proteoglikani i kolagen, mehanizmom povratne sprege izazivaju daljnju razgradnju ECM stimulirajući proizvodnju citokina i MMP (24), a mogu stimulirati i mehanizam prirodene imunosti kao i aktivaciju komplementa.



Slika 2. Shematski prikaz patofizioloških mehanizama u osteoartritisu; produkti razgradnje hrskavice potiču stanice sinovijalne ovojnice na lučenje pro-upalnih medijatora.

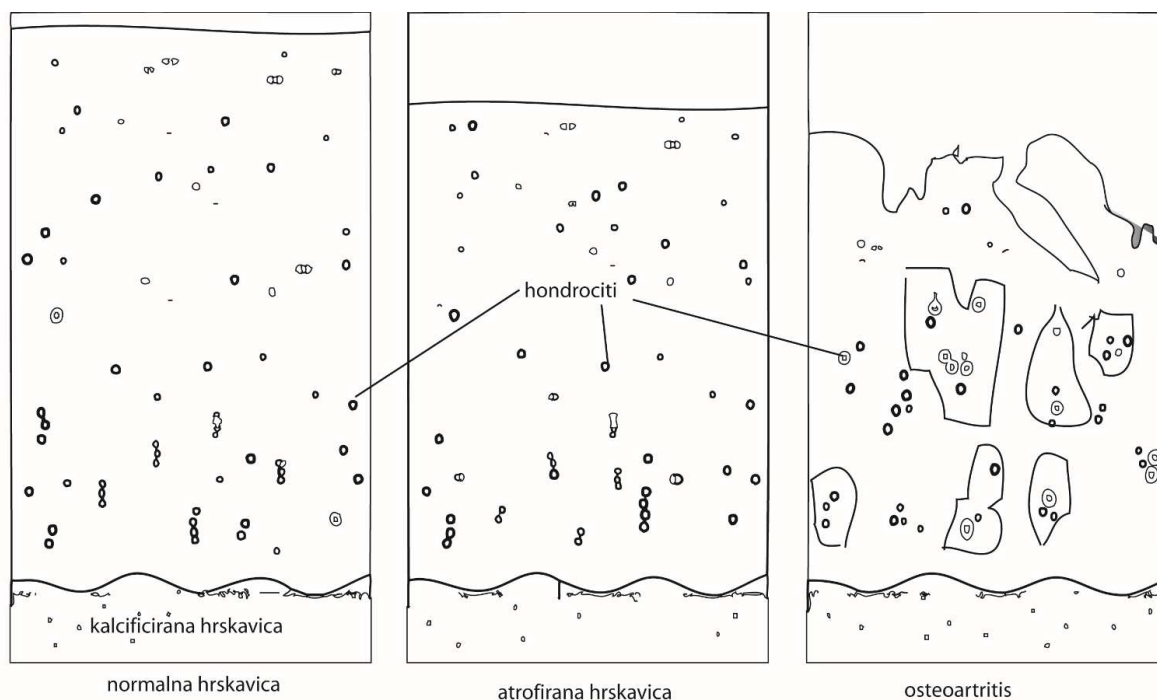
Hondrociti reagiraju na promjenu okoliša i prisustvo pro-upalnih čimbenika nastalih prekomjernim opterećenjem ili traumom zgloba umnožavanjem i grupiranjem u skupine kao i sintezom molekula ECM. Istovremeno se povećava sinteza enzima koji razgrađuju ECM pretežno MMP (25).

U hrskavici se povećava sadržaj vode, smanjuje sadržaj agrekana i duljina lanaca proteoglikana. Sadržaj ukupnog kolagena je povećan uz smanjenje sinteze kolagena tip II i sintezu kolagena tip I, netipičnog za zglobnu hrskavicu (26). Sve navedeno dovodi do smanjenja čvrstoće hrskavice, uz promjenu permeabilnosti i osmolarnosti ECM. In vitro studije učinka kompresivne sile na ozljede hrskavice na animalnim modelima su pokazale kako dio hondrocita umire procesom apoptoze (27). Sličan mehanizam je moguć u humanom OA. Biomehanički stres uzrokuje i oštećenje pericelularnog matriksa, mehanizmom u kojem posreduje enzima serin proteaza (28).

Povećava se opseg apoptoze, odnosno programirane stanične smrti hondrocita. U početnim stadijima osteoartritisa pojačani anabolički kompenzacijski mehanizmi kao što su povećanje sinteze komponenti matriksa (13) te proliferacija hondrocita u dubljim slojevima hrskavice uspijevaju nadvladati kataboličke promjene. Oštećenje površinske zone i smanjenje sadržaja agrekana povećavaju opterećenje preostale mreže kolagenih vlakana. U ovoj fazi OA,

katabolički procesi su još uvijek kompenzirani anaboličkim procesima pojačane sinteze molekula ECM i proliferacijom hondrocita. U trenutku kad hondrociti ne uspijevaju pojačanom sintezom nadvladati kataboličke procese, bilo zbog smanjenja aktivnosti uslijed gubitka okolnog ECM koji ih štiti ili zbog smanjenog odgovora hondrocita na anaboličke citokine, dolazi do progresije bolesti (7). Konačno, gubitak i smanjenje funkcije hondrocita kao i razgradnja ECM dovode do izraženog osteoartritisa karakteriziranog omekšanjem hrskavice, pojavom fisura, te stanjenjem (Slika 3.), a kasnije i potpunim nestankom zglobne hrskavice.

Najranije morfološke promjene zglobne hrskavice su: razlistavanje površinske zone koje se šire u tranzicijsku zonu, smanjenje intenziteta bojanja proteoglikana u površinskoj i tranzicijskoj zoni i urastanje krvnih žila iz subhondralne kosti. Napredovanjem bolesti nastaju dublji rascijepi koji se postupno šire do subhondralne kosti. Mekani dijelovi oštećene hrskavice se otpuštaju u zglobni prostor, a hrskavica se uslijed razgradnje stanjuje.



Slika 3. Usporedba zdrave, atrofirane (početak osteoartritisa) i hrskavice uznapredovalog osteoartritisa. Stanjenje hrskavice na slici s prikazom atrofične hrskavice; pojava fisura, hipertrofičnih hondrocita i gubitak ekstracelularnog matriksa na slici s prikazom osteoartritisa.

Česta pojava je kalcifikacija hrskavice i meniska. Kristali se sastoje od kalcij pirofosfata ili kalcij hidroksiapatita. Kristali hidroksiapatita mogu stimulirati nastanak IL-1 i IL-18.

Promjene zahvaćaju i subhondralnu kost te je nejasno prethode li promjenama hrskavice ili se javljaju nakon njih. Subhondralna kost se sastoji od kortikalne kosti, ispod koje je spongiozna kost i koštana moždina. Tijekom razvoja osteoartritisa dolazi do modeliranja i remodeliranja subhondralne kosti u skladu s Wolffovim zakonom koji tvrdi kako je rast kosti uvjetovan veličinom i smjerom rezultantne sile koja na kost djeluje (29). Kortikalna kost zadeblja uslijed odlaganja osteoida, a ispod nje nastaju oštećenja koštane moždine koja se kasnije razvijaju u koštane ciste. Mijenja se arhitektura trabekularne kosti, a na rubnim dijelovima zgloba nastaju osteofiti (30). U izraženom stadiju OA nastaju područja aseptične nekroze kosti te dolazi do pojave hrskavičnih čvorića odnosno fibrozno-hrskavičnih područja nastalih metaplazijom prouzročenom djelovanjem čimbenika rasta sinovijalne tekućine (31). U subhondralnoj kosti se povećava sadržaj kolegena tip I, ali je taj kolagen sastavom drugačiji, s većim udjelom alfa-1 lanaca u odnosu na alfa-2 lance. Takav kolagen je

zbog utjecaja TGF- β (*engl. transforming growth factor beta*) na osteoblaste slabije mineraliziran, ali kako je volumen kosti veći, s više trabekula, doima se čvršćim. U koštanoj srži dolazi do pojave edema, nekroze i fibrozacije, čije je prisustvo povezano s pojavom i progresijom oštećenja obližnje zglobne hrskavice (32).

1.4.1. Upalne i histološke promjene u osteoartritisu

Promjene koje zahvaćaju sinovijalnu ovojnicu uključuju zadebljanje, pojačanu vaskularizaciju, infiltraciju monocitima i limfocitima (33). Sinovijalna ovojnica se sastoji od dva sloja: intime i subintime (34). Intima je duboki sloj sinovijalne ovojnice, u neposrednom kontaktu sa zglobnom tekućinom. Stanice intime su sinoviociti slični fibroblastima (SSF) koji proizvode hijaluronsku kiselinu i lubrikin te makrofagi poredani u dva do tri sloja (35, 36). Subintima se sastoji od fibroznog tkiva, krvnih žila, uz nešto makrofaga i limfocita (37). Makrofagi sinovijalne ovojnice fagocitiraju razgradne proizvode hrskavice te aktiviraju medijatore upale koji pojačavaju desktrukciju hrskavice (38, 39). Stanice sinovijalne ovojnice luče citokine, adipokine i enzime kao što su inducibilna dušik oksid sintetaza – iNOS (*engl. inducible nitric oxide synthase*), ciklooksigenaza 2 (COX-2) i MMPe. Obzirom na njihovu ulogu u upalnom procesu i razgradnji zglobne hrskavice, možemo zaključiti kako sinovijalna ovojnica ima važnu ulogu u patogenezi OA (38, 40-42). Količina fibrina u sinoviji kao i citokina osteopontina koreliraju s izraženošću bolesti. Histološke promjene sinovijalne ovojnice se izražavaju zbrojem po Krennu (Tablica 1.)

Tablica 1. Histološke promjene sinovijalne ovojnice kategorizirane u zbroju po Krennu.

A. Hiperplazija / zadebljanje epitela
➤ Odsutno - 0 ➤ Blago zadebljanje (dva ili tri sloja stanica), gigantske stanice vrlo rijetke - 1 ➤ Umjereno (četiri do pet slojeva stanica), prisutno nešto gigantskih stanica, limfocita - 2 ➤ Izraženo zadebljanje (više od 6 slojeva stanica), učestale gigantske stanice i limfociti - 3
B. Upalni infiltrat
➤ Odsutan - 0 ➤ Blagi upalni infiltrat (raštrkane pojedinačne stanice i male perivaskularne nakupine (agregati) limfocita i/ili plazma stanica - 1 ➤ Umjeren upalni infiltrat (perivaskularni i/ili površinske nakupine (agregati) limfocita, mogu se zamijetiti mali limfatički folikuli bez zametnog središta - 2 ➤ Jaki upalni infiltrat (limfatički folikuli sa zametnim središtem i/ili subsinovijalnim konfluirajućim infiltratom) - 3
C. Aktivacija sinovijalne strome/ formiranje panusa
➤ Odsutan – 0 ➤ Blaga aktivacija sinovijalne strome (niska celularnost s blagim edemom, blaga fibrozacije s nešto fibroblasta, bez gigantskih stanica – 1 ➤ Umjerema aktivacija sinovijalne strome (umjerena celularnost, umjerena učestali fibroblasti, stanice endotela, ponešto gigantskih stanica – 2 ➤ Jaka aktivacija sinovijalne strome (visoka celularnost s velikom gustoćom fibroblasta stanica endotela, obilje gigantskih stanica) - 3 maksimalni mogući zbroj = 9

Promjene se javljaju i na meniscima u kojima se smanjuje sadržaj kolagena tipa I i II, a povećava sadržaj proteoglikana (43). Nastaju fibrilacije, fisure te dolazi do promjena mehaničkih svojstava meniska (44).

Obzirom na histološke promjene sinovije, infiltraciju makrofagima i limfocitima te povećan sadržaj pro-upalnih čimbenika u sinovijalnoj ovojnici kao i u zglobnoj tekućini, OA se može smatrati upalnom bolesti (45). Recentni radovi pokazuju ulogu SSF sinovijalne ovojnice kao djelatne stanice upalno promijenjene sinovije. SSF proizvode NO, pro-upalne citokine i prostaglandin E₂, a koji koreliraju s kliničkim simptomima bolesti (46). Tijekom razvoja OA zglobna hrskavica i sinovijalne ovojnice proizvode NO (41). NO posreduje u ekspresiji upalnih čimbenika, inhibira sintezu kolagena i proteoglikana te inducira apoptozu hondrocita kao i osjet boli (47).

1.4.2. Matriks metaloproteinaze u osteoartritisu

MMPe su enzimi koji razgrađuju ECM. U zglobovima zahvaćenim osteoartritisom su pronađene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, MMP-14 (MT1-MMP) (48). Proizvode ih stanice sinovije i hondrociti. MMPe razgrađuju kolagene tip II, IX i XI kao i proteoglikane, pretežno agrekan. Dokazana je uloga MMP u angiogenezi; sudjeluju u odvajanju pericita od proliferirajućih krvnih žila, stimuliraju migraciju i proliferaciju stanica endotela te u optužtanju angiogenetskih čimbenika (48). MMPe su enzimi iz skupine endopeptidaza koji imaju sposobnost razgradnje svih sastavnica ECM. Djeluju izrazito katabolički te je izražaj gena koji kodiraju MMPe strogo reguliran, osim u prilikama gdje je potrebna brza pregradnja tkiva, kao primjerice tijekom embrionalnog razvoja ili procesa cijeljenja rane. MMPe sudjeluju u pregradnji zdrave zglobne hrskavice.

U zdravoj zglobnoj hrskavici odraslih osoba izražene su četiri matriks metaloproteinaze: MMP-1, MMP-2, MMP-13, MMP-14, a u patološkim stanjima su izražene MMP-3, MMP-8 i MMP-9 (49). MMP-1 razgrađuje kolagene tip I, II i III. U embrionalnom razvoju enzim je aktivan u područjima enhondralne i intramembranozne osifikacije. Izražaj MMP-1 je povišen u zglobnoj hrskavici u OA.

MMP-2 razgrađuje kolagen tip IV i važna je u procesu cijeljenja rane. Njezin izražaj je, slično izražaju MMP-1, nizak u zdravoj zglobnoj hrskavici, a povišen tijekom OA (50).

MMP-3 razgrađuje kolagene tipa II, III, IV, IX, X kao i elastin, fibronektin te razne proteoglikane. Sudjeluje u procesu cijeljenja rane, a njenom izražaju u SSF prethodi povećan

izražaj pro-upalnih čimbenika. To bi moglo objasniti visok izražaj MMP-3 u hrskavici i sinovijalnoj ovojnici tijekom OA (51). Odsutna je u zdravoj zgloboj hrskavici.

MMP-8 djeluje u procesu cijeljenja rane, a izgleda kako je njena uloga u zglobovima kod OA protektivna; kod miševa s nedostatkom gena za MMP-9, uočena je nagla progresija upalnog sinovitisa u OA uz obilan neutrofilni infiltrat zahvaljujući inhibiciji procesa apoptoze u neutrofilima koju uzrokuje MMP-9 (52).

MMP-9 je aktivna u embriološkom razvoju i prilikom cijeljenja rane. U oba procesa djeluje pro-angiogenetski. Tijekom ranog razvoja ima ključnu ulogu u apoptozi hipertrofičnih hondrocita ploče rasta. U zglobovima je proizvode makrofagi i monociti sinovijalne ovojnice. Otpuštanje MMP-9 iz leukocita u OA inhibiraju hondrociti koji imaju regulatornu ulogu u izražaju MMP-9 (53). MMP-13 je glavni čimbenik razgradnje kolagena tip II u zgloboj hrskavici tijekom OA. Razgrađuje i kolagene tip IV i IX, osteonektin i proteoglikane. Sudjeluje u pregradnji zdrave zglobne hrskavice (54). MMP-14 razgrađuje agrekan te sudjeluje u inhibiciji tumorske neo-angiogeneze. Važan je čimbenik formiranja kosti potičući osteogenezu i hondrogenezu (55). Izražaj MMP-14 u hrskavici kod OA je pojačan. Sposobna je aktivirati druge matriks metaloproteinaze (MMP-2 i MMP-13) (56).

1.4.3. Dušik oksid (NO) u osteoartritisu

NO nastaje pretvorbom L-arginina, preko NOH (*engl. N omega-hydroxyl*)-arginina u L-citrulin i NO. Reakciju katalizira enzim dušik oksid sintetaza – NOS (*engl. nitric oxide synthase*) koja oksidira dušik gvanozin arginin u anhidroksi arginin koji dalje oksidira u citrulin i NO (57). NO aktivira enzim solubilnu gvanozin ciklazu (sGC) koja katalizira pretvorbu gvanozin trifosfata - GTP (*engl. guanosine -5- triphosphate*) u aktivni ciklički gvanozin monofosfat – cGMP (*engl. cyclic guanosine monophosphate*). cGMP vezanjem za bjelančevine kao što su protein kinaze i fosfodiesteraze ostvaruje svoje biološke učinke.

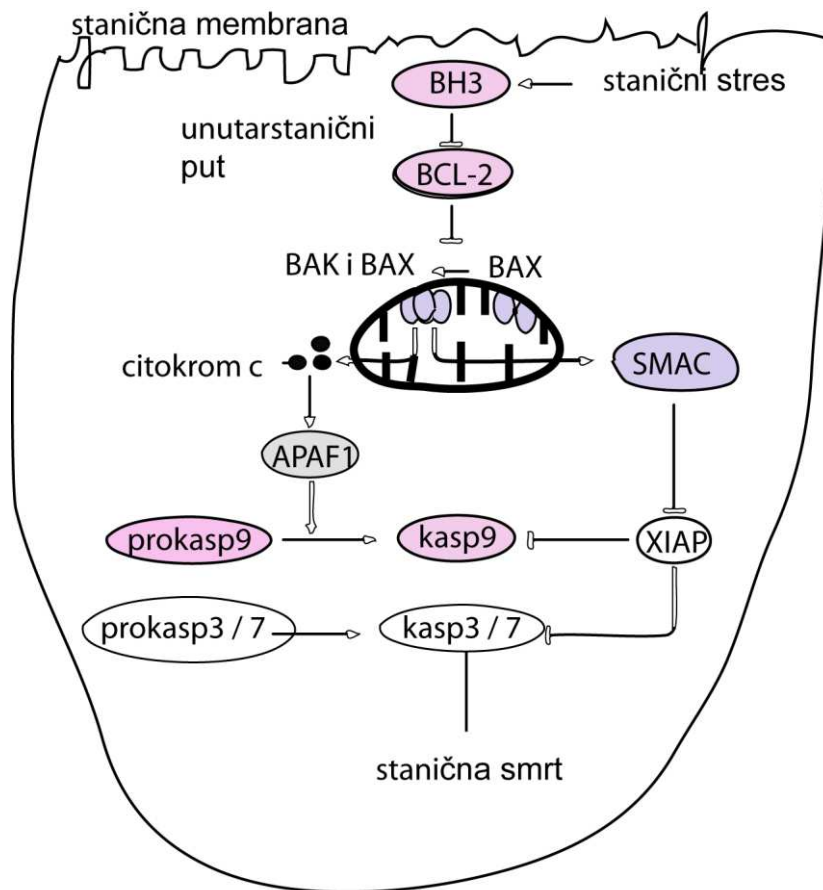
Hondrociti u osteoartritisu proizvode NO, istovremeno se u OA povećava broj iNOS receptora na membrani hondrocita što zajedno podržava lučenje pro-upalnih citokina (58). NO posreduje u apoptozi hondrocita, aktivira MMPe, smanjuje sintezu proteoglikana i kolagena. Dokazano je kako medijatori upale kao što se TNF- α i IL-1 β mogu inducirati iNOS, dok NO posreduje u djelovanju navedenih pro-upalnih citokina. NO pospješuje izražaj MMP i na taj način djeluje na proces pregradnje matriksa. NF- κ B je čimbenik koji sudjeluje u transkripciji pro-upalnih gena TNF- α , IL-1 β , iNOS i gena MMP. Za trajnu i održivu aktivaciju NF- κ B

potreban je NO (41). U bolesnika s osteoartritisom iNOS iz sinovijalne ovojnice i hrskavice proizvodi znatne količine NO (59). Selektivna inhibicija iNOS smanjuje razinu kataboličkih čimbenika u tkivu, dakle NO ima kataboličku ulogu u OA (60).

1.5. Apoptoza

Apoptoza je genetski kontroliran proces programirane stanične smrti koji se odvija receptorskom ili vanjskim putem i mitohondrijskim ili unutarnjim putem (Slika 4.). Obilježje je normalnog razvoja u kojem apoptoza uzrokuje nestanak prijelaznih tipova tkiva, kao i prastanica te je najviše aktivna tijekom embrionalnog razvoja. Apoptoza ima važnu ulogu pri održavanju homeostaze tkiva, preobrazbi i obnavljanju tkiva kao i atrofiji tkiva ovisnoj u hormonima (61, 62). Proces apoptoze ne uzrokuje upalni odgovor organizma (63). Značajke apoptoze su: kondenzacija citoplazme i kromatina, fragmentacija stanice i konačno, stvaranje apoptotskih tjelešaca (64, 65). Među pokretačima apoptoze su: čimbenici rasta, citokini, hormoni, ionizacijsko zračenje, virusi, neki lijekovi i brojni drugi agensi (66). Proces se odvija u četiri faze: početna faza, faza prijenosa i integracije signala, izvršna faza i faza uklanjanja fragmenata stanice.

Prvu fazu započinju egzogeni čimbenici, primjerice, dušik oksid ili ultraljubičasto zračenje kao i brojni drugi čimbenici (67, 68). Druga faza apoptoze je obilježena pojačanjem ili zaustavljanjem unutarstaničnog prijenosa signala ovisno o aktivaciji pro-apoptotskih ili anti-apoptotskih mehanizama. Najvažniji enzimi druge faze su kaspaze, a ključnu ulogu u kontroli prijenosa signala imaju mitohondrijske bjelančevine iz obitelji BCL-2 proteina (69). U izvršnoj fazi apoptoze enzimi kaspaze razgrađuju dijelove stanice nakon čega nastaju apoptotska tjelešca. Makrofazi fagocitiraju apoptotska tjelešca, čime se završava četvrta faza (70).



Slika 4. Unutarnji ili mitohondrijski put apoptoze. Različiti stresni čimbenici aktiviraju apoptotske signale koji djeluju putem BCL-2 obitelji. Opuštanje citokroma c iz mitohondrijske membrane aktivira izvršne kaspaze sa rezultirajućom apoptotskom smrću stanice.

Apoptoza nije sinonim za programiranu staničnu smrt, naime postoje i drugi oblici programirane stanične smrti kao što su: keratinizacija, autofagija, Wallerova degeneracija ili kornifikacija (71, 72).

1.5.1. BCL-2 u apoptozi

BCL-2 obitelj proteina je glavni regulator aktivnosti enzima kaspaza (73). Nalaze se na vanjskoj membrani mitohondrija, a po učinku se dijele na anti-apoptotske i pro-apoptotske (74). Obitelj se dijeli na tri podskupine obzirom na funkciju i građu: prvu, anti-apoptotsku skupinu kojoj pripadaju: BCL-2, BCL-xL, MCL-1 i drugi. Pripadnici druge skupine: BID, BIM, PUMA, BMF i HRK su inicijatori apoptoze. Treća skupina je pro-apoptotska a neki od

članova su: BAX, BOK/Mtd i BAK (75, 76). BCL-2 vezanjem na BAX tvori dimere i na taj način štiti stanicu od apoptoze (77).

1.5.2. Putovi apoptoze

Apoptoza se aktivira mitohondrijskim (unutarnjim) ili vanjskim (receptorskim) putem. U mitohondrijskom putu dolazi do aktivacije pro-apoptotskih članova obitelji BCL-2, nakog čega se povećava propusnost mitohondrijske membrane te se otpušta citokrom c. Medijatorske molekule Apaf-1 i kaspaza-9 vežu se uz citokrom c i zajedno s molekulom ATP tvore apoptosom (78).

Drugi, receptorski put apoptoze pokreće vezanje liganda na receptore čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α). Jedan i drugi put uzrokuju aktivaciju proteolitičkih enzima kaspaze (citoplazmatske cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze) (*engl. caspase, cysteine aspartyl proteases*) s razlikom što receptorski put prvo aktivira kaspazu-8, a mitohondrijski put kaspazu-9. Kaspaza-8 i kaspaza-9 aktiviraju kaspazu-3, a ona nukleazu CAD (*engl. Caspase Activated Dnase*) (79). Mogućnost međusobne aktivacije kaspaza pojačava apoptotski signalni put što objašnjava brzinu kojom stanice umiru procesom apoptoze.

1.5.3. BCL-2 u reumatoidnom artritisu i osteoartritisu

BCL-2 protein je anti-apoptotički čimbenik koji ima važnu ulogu u održavanju homeostaze zgloba djelujući suprotno upalnim čimbenicima. Obitelj BCL-2 proteina regulira izvršnu fazu apoptoze, te je dokazana njihova pojačana ekspresija u sinovijalnoj zglobnoj ovojnici kod reumatoidnog artritisa (45). Manje je poznata uloga i ekspresija BCL-2 u sinovijalnoj ovojnici kod OA.

Prema dosadašnjim saznanjima ne postoje studije koje su analizirale ekspresiju i distribuciju BCL-2, iNOS i MMP-9 u sinovijalnoj ovojnici kod osteoartritisa kuka.

2. HIPOTEZE I CILJEVI RADA

Sinovijalno tkivo kuka kod osteoartritisa će biti popraćeno promjenom izražaja iNOS, BCL-2 i MMP-9 te promjenom intenziteta bojanja imunofluorescencijom.

Raspodjela navedenih biljega, kao i njihovo prostorno i vremensko preklapanje će biti različito u pojedinim strukturama sinovije (intima i subintima) u skupinama umjerenog i izraženog osteoartritisa te u kontrolnoj skupini.

Očekujemo pozitivnu korelaciju histološkog zbroja po Krennu s kliničkim zbrojevima i radiološkim stupnjem OA kao i različit izražaj pojedinih biljega među istraživanim skupinama.

Primarni cilj istraživanja je utvrditi izražaj i distribuciju iNOS, BCL-2 i MMP-9 u sinovijalnoj ovojnici kuka kod osteoartritisa.

Sekundarni ciljevi istraživanja su:

1. usporediti izražaj iNOS, BCL-2 i MMP-9 u sinoviji kuka kod OA s radiološkim i histološkim stupnjem OA te kliničkim zbrojevima OA kuka
2. utvrditi i kvantificirati prisustvo limfoidnog infiltrata u sinovijalnim ovojnicama OA kuka i stupanj histoloških promjena hrskavice te sinovije kuka u odnosu na stupanj izraženosti OA
3. metodom imunofluorescencije uz korištenje stanično specifičnih biljega definirati i kvantitativno analizirati prisutnost pojedinih vrsta stanica upalno promijenjene sinovijalne ovojnice u OA kuka
4. istražiti izražaj pro-upalnog biljega iNOS, anti-apoptotičkog biljega BCL-2 i biljega destrukcije tkiva MMP-9 između ispitivanih skupina (kontrolna skupina, skupina bolesnika s umjerenim i izraženim OA kuka)
5. ko-ekspresijom navedenih markera (iNOS, BCL-2 i MMP-9) s vimentinom, VEGFR1, aktinom, CD 3 i CD 68 biljezima ustanoviti povezanost pojedinih vrsta stanica s destruktivnim, angiogenetskim, upalnim i anti-apoptotskim procesima kod OA kuka te utvrditi njihovu razliku među ispitivanim skupinama
6. utvrditi razliku histološkog zbroja po Krennu između umjerenog i izraženog oblika OA te njegovu povezanost s kliničkim zbrojevima i radiološkim stupnjem OA kuka

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno kao presječna studija odobrena od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split. Sudjelovala su 32 ispitanika podijeljena u tri skupine: prva skupina su bolesnici s dijagnozom prijeloma vrata bedrene kosti (kontrolna skupina - 8 bolesnika), druga skupina su bolesnici s umjereno izraženim osteoartritisom kuka (6 bolesnika), dok su u trećoj skupini bolesnici s izraženim osteoartritisom zglobovom kuka (18 bolesnika).

3.2. Bodovanje i razvrstavanje u skupine

Bolesnici s osteoartritisom su bodovani po Harris Hip Score (HHS), Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index (WOMAC) (Tablica 2.) i vizualno-analognoj ljestvici (VAS). Napravljeno je radiološko stupnjevanje po Kellgren-Lawrence (K-L) ljestvici. HHS i WOMAC zbrojevi su dobiveni anketiranjem bolesnika putem upitnika od strane autora, do mjesec dana prije operacijskog zahvata. Stupnjevanje po K-L ljestvici (Tablica 3.) je napravljeno uvidom u standardnu AP snimku kukova snimljenu najviše 6 mjeseci prije operacije. Dijagnoza OA je dijagnosticirana sukladno kriterijima “American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip” (80).

Tablica 2. WOMAC zbroj (engl. Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index).

Ime i prezime _____ Datum rođenja: _____					
Broj statusa: _____ Datum ispunjavanja upitnika: _____ Datum operacije: _____					
Kuk koji se evaluira (molim zaokružiti): Lijevi kuk Desni kuk					
Prijeoperacijski pregled Postop kontrola nakon 3 mj 6 mj 12 mj 24 mj					
TEŠKOĆE TIJEKOM POSLJEDNIH MJESEC DANA					
BOL	0	1	2	3	4
Hod	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
Stepenice	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
Noću	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
U mirovanju	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
Kod opterećenja	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
ZAKOČENOST					
Jutarnja zakočenost	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
Zakočenost tijekom dana	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
TEŠKOĆE U OBAVLJANJU SLJEDEĆIH AKTIVNOSTI					
Spuštanje niz stepenice	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Penjanje uz stepenice	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ustajanje sa stolice	Nema	Blaga	Umjerena	Jaka	Izrazita
Stajanje	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Saginjanje do poda	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite

Hodanje po ravnom	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ulaženje i izlaženje iz auta	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Odlazak u kupovinu	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Oblačanje čarapa	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ustajanje iz kreveta	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Skidanje čarapa	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ležanje u krevetu	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ulaženje i izlaženje					
iz kade	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Sjedenje	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Sjedenje i podizanje s					
zahoda	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Teški kućanski poslovi	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Lakši kućanski poslovi	Nema	Blage	Umjerene	Jake	Izrazite
Ukupan zbroj bodova: _____ / 96 = _____%					

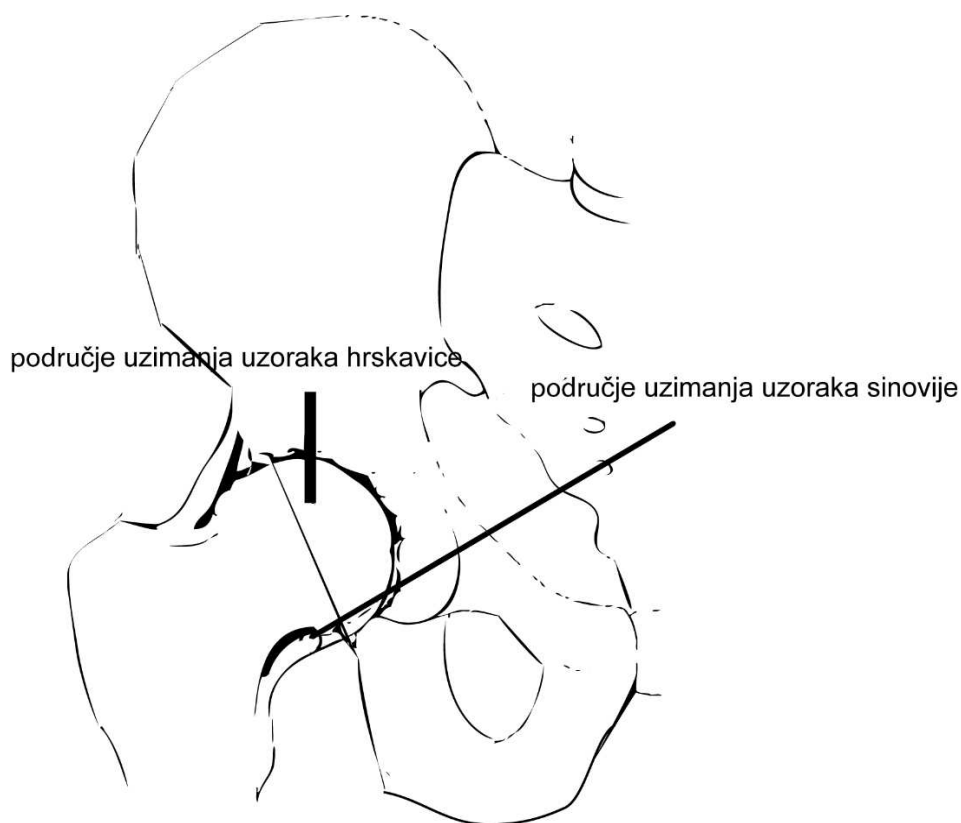
Kriterij za svrstavanje bolesnika u skupinu s izraženim OA bio je: Kellgren-Lawrence stupanj jednak ili veći od 3 te zbroj po Krennu jednak ili veći od 7. ($K-L \geq 3$, $Krenn \geq 7$). U skupinu s umjerenim OA svrstani su bolesnici s Kellgren-Lawrence zbrojem jednakim ili manjim od 2 i zbrojem po Krennu jednakim ili manjim od 6 ($K-L \leq 2$, $Krenn \leq 6$). Bolesnici s prijelomom vrata bedrene kosti su imali Kellgren-Lawrence stupanj 0 ili 1. Bolesnici su bili informirani o operacijskom zahvatu cilju i svrsi istraživanja, nakon čega su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Za svakog ispitanika su zabilježeni: dob, spol, indeks tjelesne mase (ITM), vrijeme trajanja simptoma i Kellgren-Lawrence stupanj.

Tablica 3. Kellgren-Lawrence klasifikacija

K-L stupanj	Radiološke promjene
0 Bez OA	Nema radioloških znakova osteoartritisa
1 Sumnja na OA	Sumnja na suženje zglobnog prostora, mogući osteofiti
2 Blagi OA	Sigurno suženje zglobnog prostora, osteofiti
3 Umjereni OA	Umjereno izraženi, multipli osteofiti suženje zglobnog prostora, sklerozacija subhondralne kosti, moguć deformitet kosti
4 Izraženi OA	Veliki osteofiti, izraženo suženje zglobnog prostora, izražena sklerozacija i deformitet kosti

3.3. Sakupljanje uzoraka

Kod svih bolesnika je napravljena operacija potpune aloartroplastike zgloba kuka (Pinnacle Acetabular Cup System and Corail Hip System by Depuy, Johnson and Johnson, USA) posterolateralnim pristupom u položaju na boku. Bolesnici su operirani na Odjelu za ortopediju, Zavoda za ortopediju i traumatologiju, Klinike za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od 2017.g. do 2020.g. Nakon reza tetiva malih rotatora kuka i stražnje zglobne čahure, zglob se luksira i oscilacijskom pilom 1,3 mm promjera (Trauma Reckon System by Synthes, Switzerland) se napravi osteotomija vrata bedrene kosti, a glava bedrene kosti odstrani. Istom pilom se uzme uzorak u obliku trokuta iz nosive površine glave bedrene kosti, neposredno uz najviše oštećeni dio glave, ali koji sadrži artrotski promijenjenu hrskavicu te podležću subhondralnu i spongioznu kost. Uzorak sinovijalne ovojnice se uzme kirurškim nožem s donje strane vrata bedrene kosti (Slika 5.)



Slika 5. Shema uzorkovanja hrskavice i sinovijalne ovojnice.

3.4. Uklapanje i rezanje tkiva

Uzorci se stave u formalin te se šalju u Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Formalinom fiksirana tkiva su dekalificirana s 14% EDTA u trajanju 4 mjeseca, uklopljena u parafin, nakon čega su rezana na presjeke debljine 5 μ m te je svaki deseti presjek bojan hematoksilinom i eozinom.

3.5. Patohistološka analiza i metoda dvostruke imunofluorescencije

Nakon postupka deparafinizacije presjeci su pripremljeni za imunohistokemijsku analizu rehidracijom u silaznim koncentracijama alkohola (81-84). Preparati su zagrijani u citratnom puferu (pH 6.0) u mikrovalnoj pećnici 12 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi isprana su s PBS (*engl. phosphate buffer saline*). Na rezove je postavljen blok protein na 30 minuta, nakon čega su inkubirana tijekom noći s prikladnom mješavinom primarnih protutijela (Tablica 4.). Sljedećeg dana stakalca su isprana s PBS nakon čega je primijenjen je prikladna mješavina sekundarnih protutijela (Tablica 4.). Stanične jezgre su bojane s 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) te su preparati namješteni u Immumont uređaj i prekriveni staklima. Stakalca su pregledana koristeći Olympus (Tokyo, Japan) BX51 mikroskop opremljen Nikon DS-Ri1 kamerom (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Slike su sklopljene koristeći Adobe Photoshop (Adobe Systems, MI, USA). Analizirali smo deset nepreklapajućih vidnih polja s 40 $\times$ povećanjem objektiva. Promjene hrskavice i subhondralne kosti su klasificirane OARSI klasifikacijom (Tablica 5.), a promjene sinovijalne ovojnice smo stupnjevali koristeći zbroj po Krennu (Tablica 1). Krennov zbroj 0-1 je stanje bez sinovitisa (upalni stadij 0), zbroj 2-3 je blagi sinovitis (upalni stadij 1), zbroj 4-6 je umjereni sinovitis (upalni stadij 2) te zbroj 7-9 odgovara jakom sinovitisu (upalni stadij 3).

Kako bi odredili broj pozitivnih stanica u površnom sloju (intima) i dubokom sloju (subintima) sinovijalne ovojnice koristili smo metodu dvostruke imunofluorescencije s primarnim protutijelima na iNOS, BCL-2 i MMP-9 u kombinaciji sa specifičnim markerima stanica (Tablica 4.).

Tablica 4. Korištena primarna i sekundarna protutijela.

Protutijela	Domaćin	Razrjeđenje	Strukture identificirane protutijelima	Izvor
ab59348 (poliklonalno protutijelo)	Kunić	1:500	BCL-2	Abcam (UK)
sc-651 (monoklonalno protutijelo)	Kunić	1:200	iNOS	Santacruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
A0150 (poliklonalno protutijelo)	Kunić	1:100	MMP-9	DAKO (Gloustrup, Denmark)
M0823 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:20	CD31 (stanice endotela krvnih žila)	DAKO (Gloustrup, Denmark)
M0851 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:40	Aktin (stanice glatkih mišića krvnih žila)	DAKO (Gloustrup, Denmark)
ab212369 (monoklonalno protutijelo)	Miš		VEGFR1	Abcam (UK)
M0725 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:50	Vimentin (fibroblasti)	DAKO (Gloustrup, Denmark)
M0876 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:75	CD68 (makrofagi)	DAKO (Gloustrup, Denmark)

M7254 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:50	CD3 (limfociti)	DAKO (Gloustrup, Denmark)
Rhodamine Goat AP124R	Miš	1:100	Sekundarno protutijelo	MerckMillipore (Billerica, MA, USA)
Fluorescein Goat AP132F	Kunić	1:100	Sekundarno protutijelo	MerckMillipore (Billerica, MA, USA)
M7254 (monoklonalno protutijelo)	Miš	1:50	CD3 (limfociti)	DAKO (Gloustrup, Denmark)
Rhodamine Goat AP124R	Miš	1:100	Sekundarno protutijelo	MerckMillipore (Billerica, MA, USA)
Fluorescein Goat AP132F	Kunić	1:100	Sekundarno protutijelo	MerckMillipore (Billerica, MA, USA)

Tablica. 5. OARSI zbroj

Stupanj (ključno svojstvo)	Povezani kriterij (tkivna reakcija)
Stupanj 0: intaktna površina, očuvana morfologija hrskavice	Matriks: očuvana arhitektura matriksa Stanice: očuvane, normalne orijentacije
Stupanj 1: intaktna površina	Matriks: površinski sloj hrskavice očuvan, edem i/ili površinske abrazije hrskavice, fokalno zgušnjavanje matriksa Stanice: umnožavanje, nekroza, hipertrofija.
Stupanj 2: površinska oštećena	Kao u 1. stupnju + narušen kontinuitet površinske zone matriksa (dublje fibrilacije) +/- smanjen sadržaj matriksa pri IH bojanju površinske trećine hrskavice +/- lokalizirano perihondrocitno pojačano IH bojanje prijelazne zone +/- poremećaj orijentacije kolumni hondrocita Stanice: nekroza, umnožavanje, hipertrofija
Stupanj 3: vertikalni rascijepi	Kao u 2. stupnju +/- vertikalni rascijepi u prijelaznoj zoni +/- smanjen sadržaj matriksa pri IH bojanju dublje 2/3 trećine hrskavice +/- stvaranje novog kolagena (polarizirana svjetlosna mikroskopija) Stanice: nekroza, nakupine hondrocita, hipertrofija
Stupanj 4: erozije	Gubitak hrskavičnog matriksa: ljuštenje površinskog sloja, formiranje cisti prijelaznog sloja Udubljenja hrskavice s nestankom matriksa površinskog i prijelaznog sloja

Stupanj 5: denudacija	Sklerotična kost ili reparativno fibrohrskavično tkivo u području bez hrskavice
Stupanj 6: deformitet	Remodeliranje kosti s deformitetom uključujući osteofite

3.5.1. Detekcija i izračun dvostruko pozitivnih stanica

Brojali smo samo stanice koje su pokazale prisustvo oba markera (crveni ili zeleni signal) u jezgri ili citoplazmi. Stanice smo brojali koristeći ImageJ softver (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Ukupni broj VEGFR1+/iNOS+, CD31+/iNOS+, aktin+/iNOS+, vimentin+/BCL-2+, CD68+/BCL-2+, CD3+/BCL-2+, vimentin+/MMP-9+, CD68+/MMP-9+, CD3+/MMP-9+ pozitivnih stanica je izračunat kao broj stanica po mm² u intimi i subintimi sinovijalne ovojnice. Ukupan konačni broj stanica po bolesniku smo izračunali kao prosjek od 20 rezova po bolesniku te ih uspoređivali među istraživanim skupinama.

3.6. Statistička analiza

Podatke smo obradili računalnim programom GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Kako bi utvrdili razlike između kontrolne skupine, skupine s blagim OA i izraženim OA u hrskavici, subhondralnom i sinovijalnom tkivu statistička analiza je napravljena koristeći jednosmjerni ANOVA test i Turkey *post hoc* test.

3.7. Etička načela

Za provedbu istraživanja ishodili smo suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split. Istraživanje je u skladu s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije kao i Helsinške deklaracije. Svaki ispitanik je potpisao pristanak za sudjelovanje u istraživanju nakon što je informiran o postupcima, tijeku i svrsi istraživanja.

4. REZULTATI

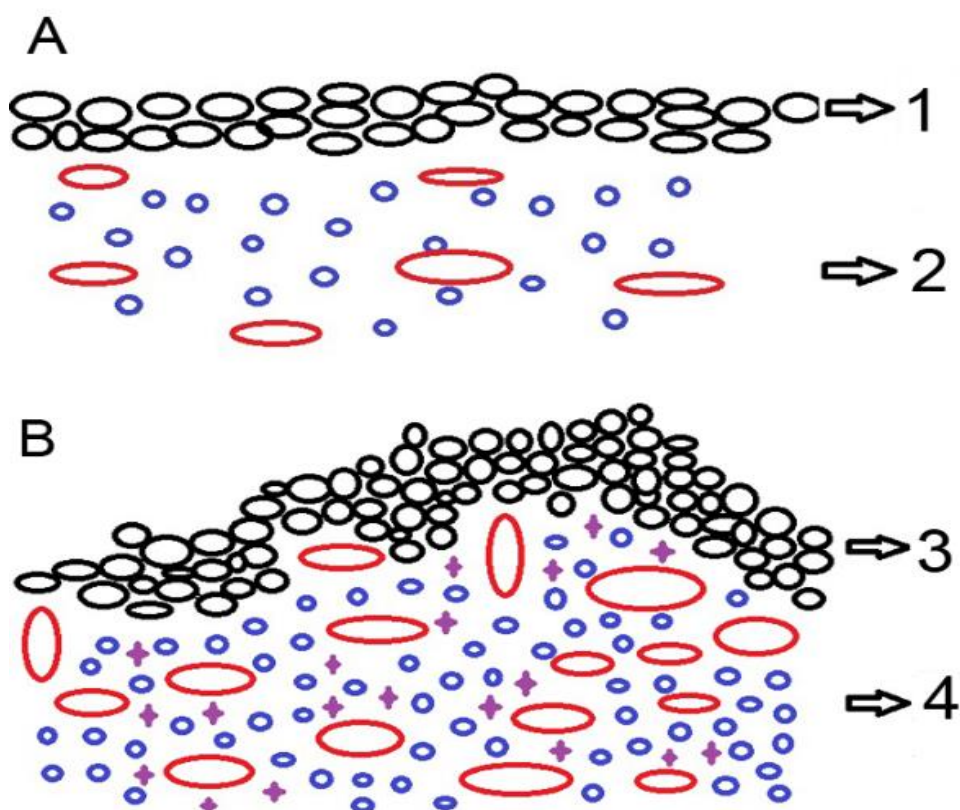
4. 1. Klinička, radiološka i patohistološka obilježja istraživanih skupina

U istraživanju su sudjelovala 32 ispitanika (9 muškaraca, 23 žene). Nije bilo statističke razlike između istraživanih skupina u odnosu na dob i ITM ($p=0.884$ i $p=0.055$) (Tablica 6.).

Tablica 6. Klinička, radiološka i patohistološka obilježja istraživanih skupina.

	Kontrola	Umjereni OA	Izraženi OA	*p
Dob (medijan±IQR, godine)	73 (72.25 – 76.75)	72 (63.5 – 75.5)	72 (67-77)	0.8848
ITM (medijan±IQR, kg/m ²)	25.67 (23.83 – 26.8)	24.9 (23.28 – 25.88)	26.9 (25.4– 29.53)	0.0557
K-L stupanj (medijan±IQR)	0.5 (0 – 1)	2 (2 – 2)	4 (3-4)	<0.0001
Krenn zbroj (medijan±IQR)	0 (0 – 0)	6.5 (5.7 – 9)	9 (7 – 9)	<0.0001
OARSI (medijan±IQR)	1 (0.25 – 1)	3 (1.5 – 4.5)	2.5 (2 – 4.7)	0.0005
HHS (medijan±IQR)	-	48.9 (43.8 – 56.9)	41 (33.18 – 49.7)	0.2713
VAS (medijan±IQR)	-	6 (4.5 – 6.7)	6 (5 – 7)	0.7811
Ukupni WOMAC (medijan±IQR)	-	46.1 (40 – 57.4)	47.3 (36.1 – 55.3)	0.9178

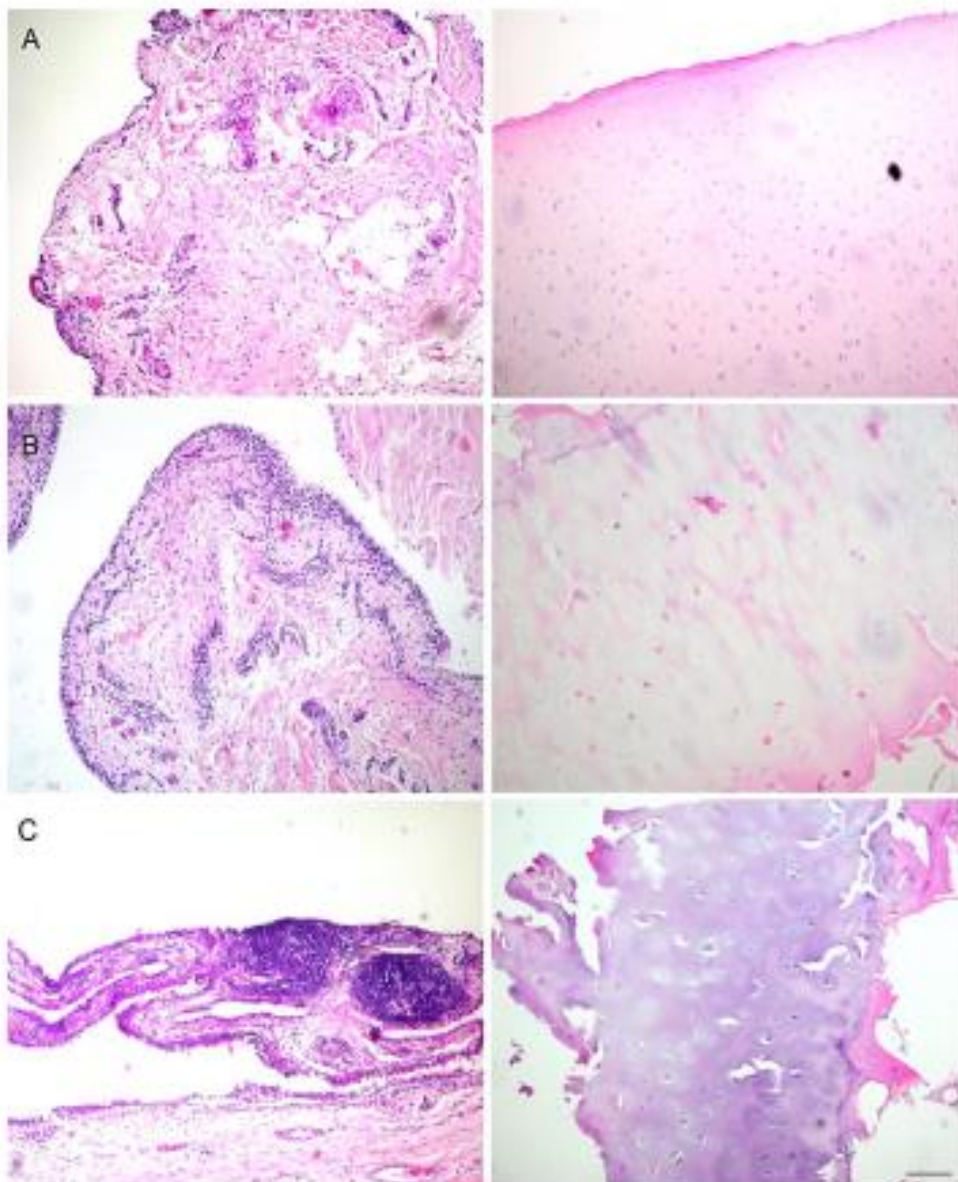
*IQR (interkvartilni raspon), OA (osteoartritis), ITM (indeks tjelesne mase), K-L stupanj (Kellgren–Lawrence stupanj), OARSI (engl. osteoarthritis cartilage histopathology assessment system), HHS (engl. Harris Hip Score), VAS (engl. visual analogue scale), WOMAC (engl. The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) * $p < 0.05$, Kruskal–Wallace test.*



Slika 6. Shematski prikaz sinovijalne ovojnice bolesnika s umjerenim (A) i izraženim (B) OA kuka. Epitel (crni krugovi) odgovara intimi a podležuća stroma subintimi; 1—površina sinovijalne ovojnice obilježena umjerenom hiperplazijom sinovijalnih stanica (crni krugovi); 2—podležuća stroma s umjerenom limfocitnom infiltracijom (plavi krugovi) i proliferacijom krvnih žila (crveni krugovi); 3—izražena hiperplazija sinovijalnih stanica (crni krugovi) papilarnog obrazca; 4—podležuća stroma s obiljem limfocita (plavi krugovi), makrofaga (ljubičasti križevi) i naglašenom proliferacijom krvnih žila (crveni krugovi).

Prosječno trajanje simptoma u skupini umjerenog OA kuka bilo je 2.5 godine i 3 godine u skupini bolesnika s izraženim OA.

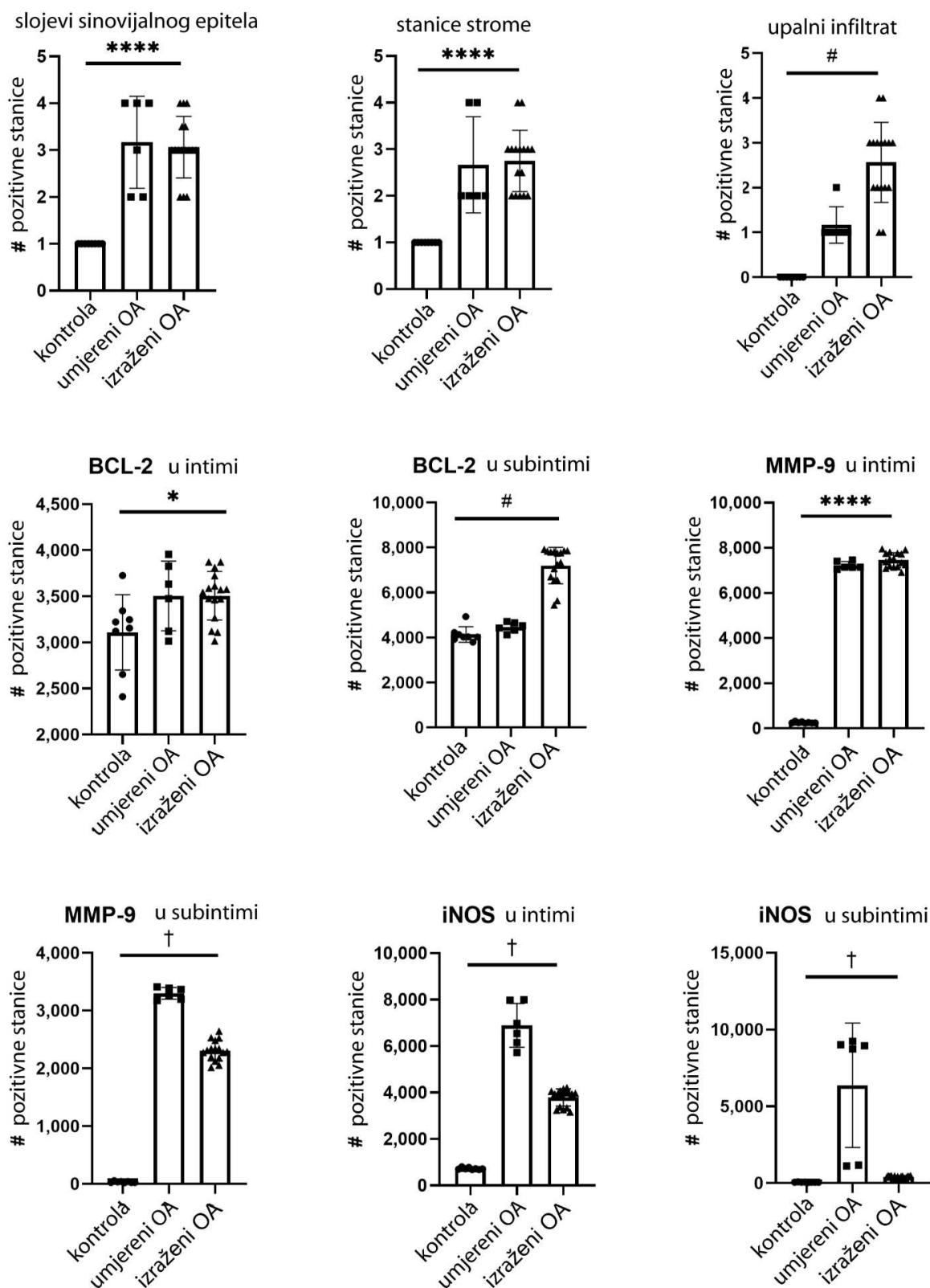
Iako se OARSI zbroj značajno razlikuje između sve tri skupine, u usporedbi među skupinama umjerenog i izraženog OA kuka nismo našli značajnih razlika (Slike 6. i 7, Tablica 6.). Slično, ne postoji značajna razlika među skupinama u HHS i WOMAC zbrojevima, kao ni u broju bodova vizualno analogne ljestvice. Nasuprot tome, postoji značajna razlika Kellgren – Lawrence (K-L) stupnja i zbroja po Krennu između sve tri skupine, kao i među skupinama umjerenog i izraženog OA (Tablica 6.). Broj slojeva sinovijalnog epitela, broj stanica strome i posebno upalni infiltrat se povećavaju s izraženošću OA. U sinovijalnim ovojnica kontrolne skupine nismo pronašli limfoidne folikule, a tek sporadično su bili prisutni u sinoviji skupine s ranim OA. U skupini bolesnika s izraženim OA u četvrtini sinovijalnih ovojnica smo pronašli limfoidne folikule.



Slika 7. Sinovijalna ovojnica (prvi stupac) i hrskavica (drugi stupac) kontrolne skupine (A) i bolesnika s umjerenim (B), te izraženim (C) osteoartritisom kuka (OAK). Bojanje Hematoksilenom i Eozinom. Povećanje $\times 40$, mjerilo 40 μm .

4.2. Semikvantitativna i kvantitativna analiza dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja

Izražaj iNOS u intimi pokazao je parabolični trend s najvišom razinom $6899 \pm 940,8$ pozitivnih stanica po mm^2 u umjereno izraženom OA kuka (Slika 8, Tablica 7.). Slični rezultati su zabilježeni u subintimi. Izražaj BCL-2 bio je sličan u intimi umjerenog i izraženog OA kuka, ali u obje skupine veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Ekspresija BCL-2 u subintimi je pokazala linearni trend povećanja ekspresije s izraženošću bolesti. Ispitivanjem izražaja MMP-9 u intimi, uočen je linearni trend između izraženosti bolesti i ekspresije MMP-9. S druge strane, ekspresija MMP-9 u subintimi pokazuje parabolički trend s vršnom razinom od $3301 \pm 101,6$ pozitivnih stanica po mm^2 u umjerenom OA kuka (Slika 8, Tablica 7.). Izražaj iNOS u intimi i subintimi pozitivno korelira sa zbrojem po Krennu u skupinama umjerenog i izraženog OA kuka. Ekspresija BCL-2 u intimi izraženog OA kuka pozitivno korelira sa zbrojem po Krennu, dok izražaji BCL-2 u subintimi i MMP-9 u intimi i subintimi nisu pokazali korelaciju sa zbrojem po Krennu (Tablica 8.). U odnosu na intenzitet bojanja specifičnim protutijelima u skupinama umjerenog OA kuka, izraženog OA kuka i kontrolne skupine, opazili smo kako je najjači intenzitet bojanja pokazao iNOS u umjerenom OA kuka, BCL-2 u izraženom obliku OA kuka te MMP-9 u umjerenom i izraženom OA kuka (Tablica 9, Slike 10. i 11.). Svi ovi biljezi su se ko-lokalizirali sa stanicama specifičnim za tkivo (odnosno angiogenetskim stanicama, sinoviocitima sličnim fibroblastima, makrofagima i T-limfocitima) (Slike 10. i 11.).



Slika 8. Patološka obilježja i izražaj BCL-2, MMP-9 i iNOS u intimi i subintimi bolesnika s osteoartritisom kuka. Legenda: * $p < 0.05$, ****, $p < 0.0001$ za ANOVA; #, $p < 0.05$ za test za linearni trend; † $p < 0.05$ za test za parabolički (kvadratni) trend.

Tablica 7. Razlika između pregledanih patohistoloških obilježja prema radiološkom stadiju OA i WOMAC zbroju.

	Kontrola		Umjereni OA		Izraženi OA		*R ²	p
	srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	srednja vrijednost	SD		
Sloj sinovijalnog epitela	1	0	3.1	0.28	3.06	0.65	69%	<0.0001
Rezidentne stanice strome	1	0	2.67	1.03	2.75	0.65	60%	<0.0001
Upalni infiltrat#	0	0	1.17	0.41	2.56	0.89	74%	<0.0001
BCL-2 u intimi	3110	407.8	3504	377.3	3506	263.8	23%	0.025
BCL-2 u subintimi#	4134	345.7	4460	218.9	7194	810.5	85%	<0.0001
MMP-9 u intimi#	261	32.35	7223	171.7	7465	324.4	99%	<0.0001
MMP-9 u subintimi†	33.88	11.19	3301	101.6	2308	17.1	98%	<0.0001
iNOS u intimi†	727.3	41.14	6899	940.8	3792	367.8	95%	<0.0001
iNOS u subintimi	59	10.38	6367	4050	409.9	68.45	68%	<0.0001

ANOVA test; SD=standardna devijacija; # test za linearni trend <0.05; † test za parabolični trend <0.05.

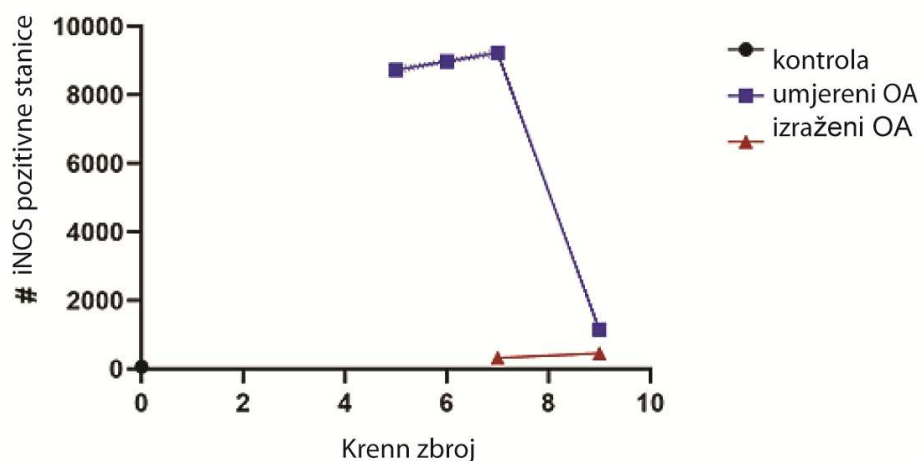
Brojevi pregledanih BCL-2, MMP-9 i iNOS pozitivnih stanica su izraženi kao broj stanica /mm².

Tablica 8. Korelacija izraženosti bolesti (β) i zbroja po Krennu (α) s izražajem iNOS, BCL-2 i MMP-9 u intimi i subintimi bolesnika s OA.

	Izraženost bolesti								
	Kontrola			Umjereni OA			Izraženi OA		
	α	B	R ²	α	β	R ²	α	B	R ²
iNOS u intimi	0	727.3 (692.9-761.6)	0	556.6 (446.2-667)	3003 (2212-3793)	98%*	372.7 (319.3-426.1)	670.2 (220-1120)	94%*
iNOS subintimi	0	59 (49.3-68.7)	0	Pogleda ti sliku 12.	7464 (7023-7904)	99%*	67.45 (53.85-81.04)	-154.9 (-269.5-0)	89%*
BCL-2 u intimi	0	3110 (2769-3451)	0	0	3504 (3108-3900)	0	177.2 (56.26-298.1)	2022 (1003-3041)	41%*
BCL- u subintimi	0	4134 (3845-4423)	0	0	4460 (4230-4689)	0	0	7194 (6762-7626)	0
MMP-9 u intimi	0	261 (234-288)	0	0	7223 (7043-7404)	0	0	7465 (7292-7638)	0
MMP-9 u subintimi	0	33.88 (23.42-44.33)	0	0	3252 (2652-3852)	0	0	2184 (1304-3065)	0

*ANOVA p vrijednost za model; α – nagib; β – odsječak (sjecište). Podaci u zagradama ukazuju na 95% CI.

Broj pregledanih iNOS, BCL-2 i MMP-9 pozitivnih stanica je izražen kao broj stanica/mm².



Slika 9. Odnos zbroja po Krennu i izražaja iNOS u subintimi bolesnika s OA.

Kod bolesnika s umjerenim OA pokazan je bi-segmentalni linearni odnos između izražaja iNOS i zbroja po Krennu ($\beta = 7464$, 95% CI: 7023 to 7904, $R^2 = 100\%$, $p < 0.0001$). Za zbrojeve do sedam vrijedi pozitivna korelacija izražaja iNOS i zbroja po Krennu ($\alpha_1 = 252.2$, 95%CI: 179.6 to 325.4), za zbrojeve preko sedam korelacija je negativna ($\alpha_2 = -4044$, 95%CI: -4102 to -3987). Legenda: α_1 parametar nagiba prije točke promjene u bi-segmentalnom linearnom modelu, α_2 parametar nagiba nakon točke promjene u bi-segmentalnom linearnom modelu, β , odsječak.

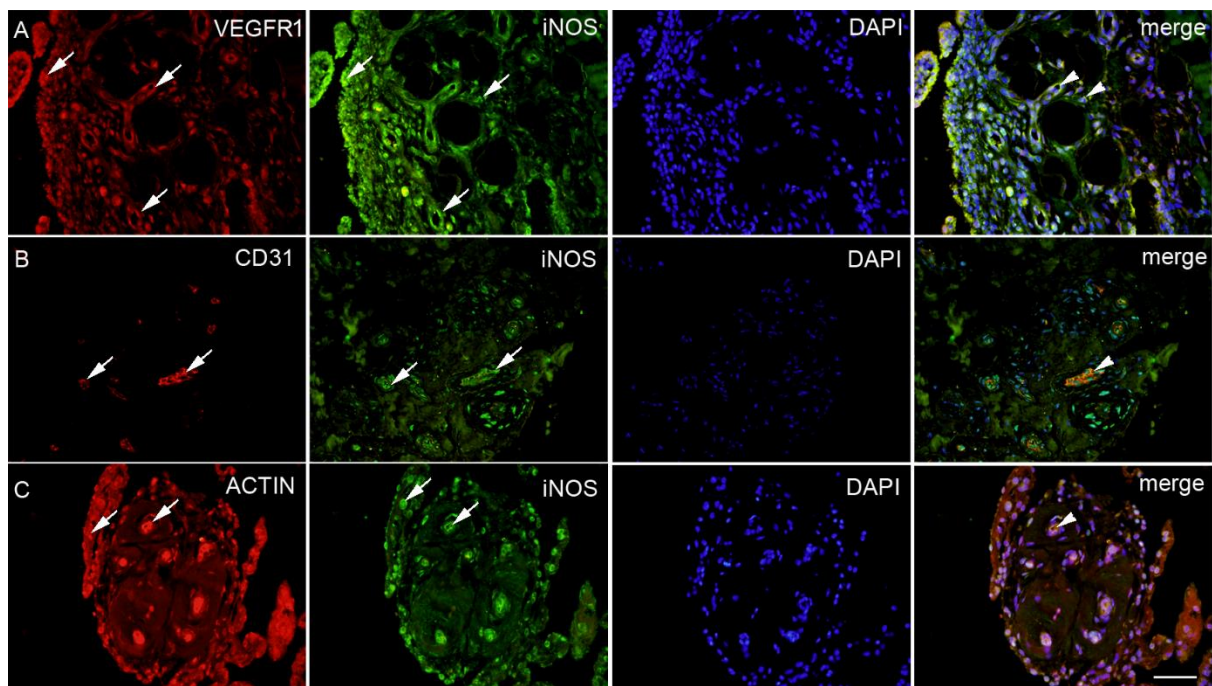
Tablica 9. Intenzitet bojanja specifičnim protutijelima kod umjerenog OA, izraženog OA i kontrolne skupine.

protutijela	Dijagnoza		
	Umjereni OA	Izraženi OA	Kontrola
iNOS	+++	++	+
BCL-2	++	+++	++
MMP-9	+++	+++	+

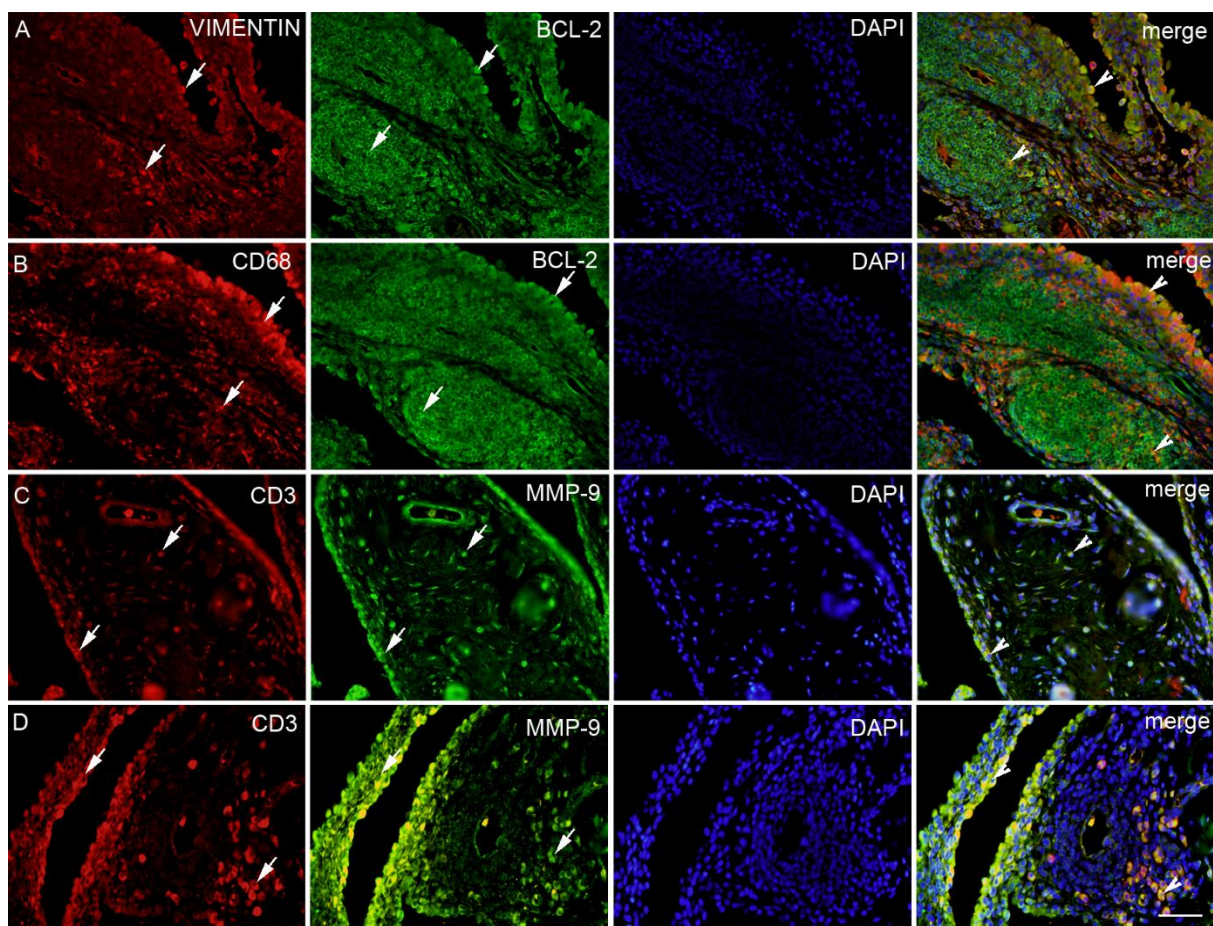
Tri plusa ukazuju na jaku reaktivnost; dva plusa ukazuju na umjerenu reaktivnost; jedan plus ukazuje na blagu reaktivnost; minus ukazuje na nereaktivnost.

Kako bismo dobili uvid u potencijalnu angiogenezu sinovijalnog tkiva u OA kuka, izračunali smo i dokumentirali broj stanica koje su ko-lokalizirale iNOS, BCL-2, MMP-9 i različite biljege angiogeneze (Slika 10.). Broj VEGFR1+/iNOS+ stanica u intimi i subintimi pokazao je parabolični trend s najvećom vrijednošću od 975.3 ± 10.27 (intima) i 279.3 ± 10.01 (subintima) pozitivnih stanica po mm^2 , u umjerenom obliku OA kuka (Slika 12, Tablica 10.). Naglašavamo kako je ekspresija VEGFR1+/iNOS + u subintimi bila skoro 12 puta veća u skupini umjerenog OA kuka u odnosu na kontrolnu skupinu. Broj CD31+/iNOS+ i aktin +/iNOS+ stanica u intimi i subintimi pokazao je linearni trend s izraženošću bolesti. Najviša razina CD31+/iNOS+ stanica zabilježena je u skupini izraženog OA kuka (75.75 ± 6.2 pozitivnih stanica po mm^2).

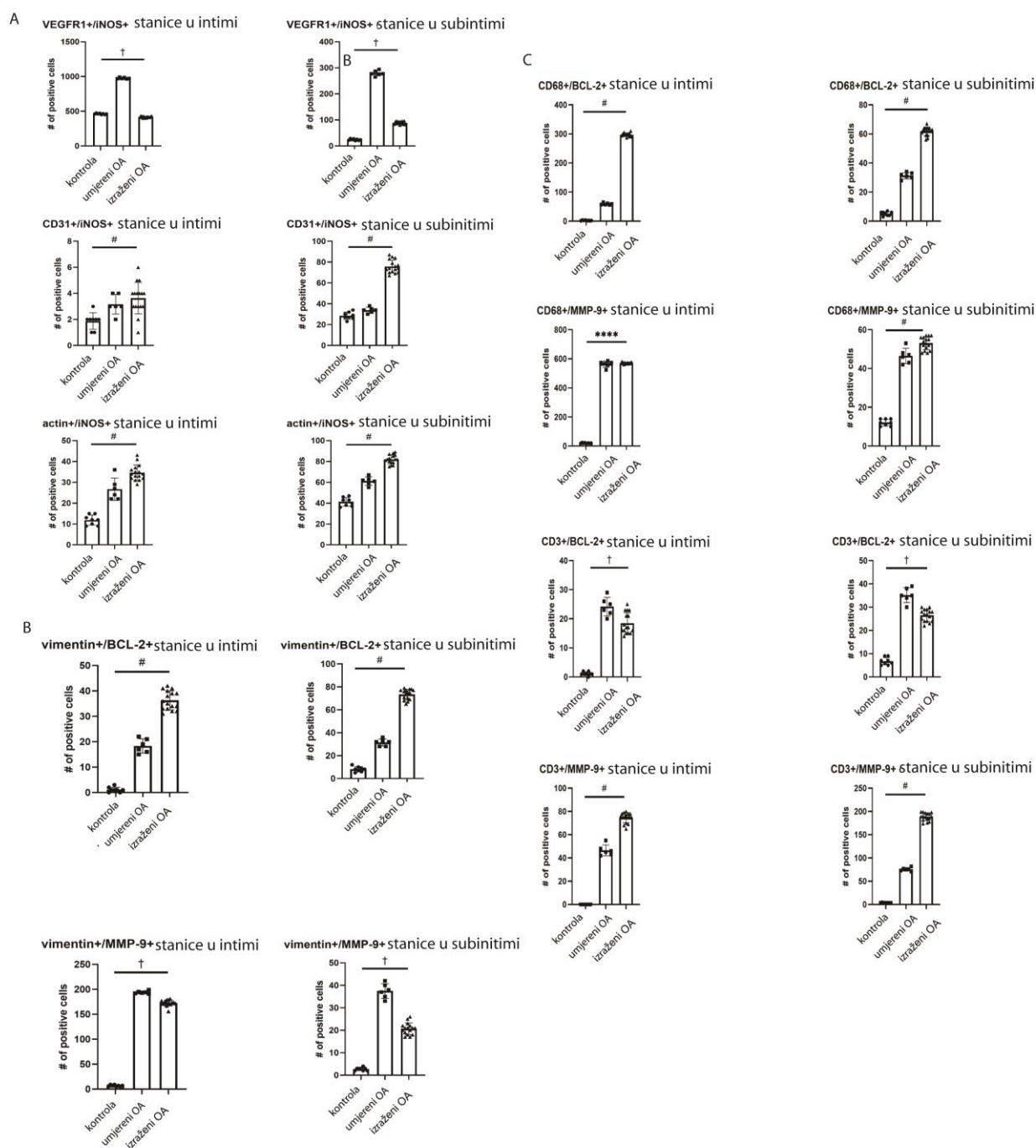
Kako bismo ispitali biologiju sinoviocita sličnih fibroblastima (SSF) u kontekstu anti-apoptotske aktivnosti i remodeliranja ECM u intimi i subintimi, izračunali smo brojeve vimentin+/BCL-2+ stanica gdje je primijećen linearni trend i vimentin+/MMP-9+ stanica, gdje je trend bio paraboličan (najviša razina od 194 ± 2.82 pozitivnih stanica zabilježena u umjerenom OA kuka). S druge strane, razmatrajući stanice pozitivne na biljeg makrofaga (CD68+) u istom kontekstu, bilo je očito da su CD68+ stanice više izražene u anti-apoptotičkom procesu (posebno u intimi skupine izraženog OA kuka), nego u procesu remodeliranja ECM u intimi i subintimi. Slično tome, kod CD3+ stanica (biljeg T-limfocita) ko-ekspimiranih s BCL-2, primijećen je parabolični trend u subintimi, dok je trend kod T-limfocita ko-ekspimiranih s MMP-9 bio linearan u odnosu na izraženost bolesti (Slika 12, Tablica 10.).



Slika 10. Sinovijalna ovojnica u bolesnika s OA kuka . VEGFR1 pozitivne stanice (crveno) u intimi i subintimi (prva strelica lijevo) i krvnim žilama (strelice); iNOS pozitivne stanice (zeleno) u krvnim žilama i okolnoj intimi i subintimi (strelice); DAPI (plavo) obojane jezgre. Ko-lokalizacija VEGFR1 i iNOS zajedno s DAPI obojanim jezgrama (glava strelice) je prikazana u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno); umjereni oblik OA kuka (A). CD31 pozitivne stanice (crveno) u krvnim žilama (strelice); iNOS pozitivne stanice (zeleno) u krvnim žilama okružene subintimom i površnom intimom sinovijalne ovojnice (strelice); DAPI (plavo) obojane jezgre; Ko-lokalizacija CD31 i iNOS zajedno s DAPI obojanim jezgrama (glava strelice) je prikazana u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno); izraženi oblik OA kuka (B). AKTIN pozitivne stanice glatkih mišića (crveno) u intimi sinovijalne ovojnice i krvnim žilama (strelice); iNOS (zeleno) pozitivne stanice u krvnim žilama, intimi sinovijalne ovojnice (strelice) i okolnoj subintimi sinovijalne ovojnice; DAPI (plavo) bojanje jezgara; Ko-lokalizacija AKTIN i iNOS-a zajedno s DAPI bojanjem jezgara je prikazana u intimi sinovijalne ovojnice i krvnim žilama (glava strelice) u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno); izraženi oblik OA kuka (C). Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica $80\mu\text{m}$.



Slika 11. Sinovijalna ovojnica u bolesnika s OA kuka. Vimentin (crveno) sinoviociti slični fibroblastima i BCL-2 (zeleno) pozitivne stanice u intimi i subintimi (strelice); DAPI (plavo) bojanje jezgri; Ko-lokalizacija VIMENTIN i BCL-2 zajedno s DAPI obojanim jezgrama prikazana je u intimi i limfoidnom folikulu (glava strelice) u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno); izraženi oblik OA kuka (A). CD68 (crveno) makrofagi i BCL-2 (zeleno) pozitivne stanice u intimi i subintimi sinovijalne ovojnice (strelice); DAPI (plavo) obojane jezgre; Ko-lokalizacija CD68 i BCL-2 preklopljeno s DAPI obojanim jezgrama je prikazana u intimi i limfoidnom folikulu (glava strelica) u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno); izraženi oblik OA kuka (B). CD3 (crveno) i MMP-9 (zeleno) u intimi i subintimi sinovijalne ovojnice (strelice); DAPI (plavo) bojanje jezgri; ko-lokalizacija CD3 i MMP-9 udruženo s DAPI bojanjem jezgara je prikazana u intimi i subintimi (glava strelice) u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno) u umjerenom obliku OA kuka (C). CD3 (crveno) i MMP-9 (zeleno) pozitivne stanice u intimi i subintimi sinovijalne ovojnice (strelice); DAPI (plavo) bojanje jezgara; ko-lokalizacija CD3 i MMP-9 zajedno s DAPI obojenim jezgrama prikazana je u intimi i limfoidnom folikulu (glava strelice) u krajnjem desnom stupcu (preklopljeno) u izraženom obliku OA kuka (D). Umetnuto: negativna kontrola limfnog čvora. Povećanje x40, mjerna ljestvica = 80 μ m.



Slika 12. Izražaj VEGFR1, CD31, BCL2 i MMP-9 u stanicama krvnih žila (A), sinoviocitima sličnim fibroblastima (B) i makrofagima i T-stanicama (C) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s OA.

Legenda: osteoarthritis; ****, $p < 0.0001$ za ANOVA; #, $p < 0.05$ za test za linearni trend; † $p < 0.05$ za test za parabolički (kvadratni) trend.

Tablica 10. Razlika između pregledanih patohistoloških karakteristika prema ispitivanim skupinama.

	Dijagnoza							
	Kontrola		Umjereni OA		Izraženi OA		*R ²	p
	sr. vr.	SD	sr. vr.	SD	sr. vr.	SD		
VEGFR1+/iNOS+ u intimi†	462.8	8.12	975.3	10.27	417.6	10.19	99.8%	<0.0001
VEGFR1+/iNOS+ u subintimi†	24.38	3.24	279.3	10.01	88.88	5.53	99.5%	<0.0001
CD31+/iNOS+ u intimi#	1.87	0.64	3.16	0.75	3.63	1.2	37%	0.0018
CD31+/iNOS+ u subintimi#	28.5	3.5	33.83	2.7	75.75	6.2	95%	<0.0001
actin+/iNOS+ u intimi#	11.88	2.4	26.67	5.35	34.63	3.7	87%	<0.0001
actin+/iNOS+ u subintimi#	41.25	4.13	61.17	4.02	81.88	4.3	94%	<0.0001
vimentin+/BCL-2+ u intimi#	1.12	0.99	18.33	2.8	36.25	3.7	96%	<0.0001
vimentin+/BCL-2+ u subintimi#	8.12	2.23	31.5	3.08	73.5	4.48	98%	<0.0001
CD68+/BCL-2+ u intimi#	2.12	1.2	59.17	3.37	297.5	5.61	99%	<0.0001
CD68+/BCL-2+ u subintimi#	5.12	1.35	31.33	2.16	61.81	2.85	99%	<0.0001

CD3+/BCL-2+ u intimi	1.12	0.64	24.17	3.18	18.44	3.61	89%	<0.0001
CD3+/BCL-2+ u subintimi†	6.75	1.58	35.17	3.18	26.5	2.55	95%	<0.0001
vimentin+/MMP-9+ u intimi†	6.87	1.5	194	2.82	172.6	5.84	99%	<0.0001
vimentin+/MMP-9+ u subintimi†	2.75	0.7	37.5	3.27	20.69	2.6	96%	<0.0001
CD68+/MMP-9+ u intimi	20.38	2.38	563.5	21.32	570.5	4.42	99%	<0.0001
CD68+/MMP-9+ u subintimi	12.13	1.72	46.5	3.93	53.06	3.2	97%	<0.0001
CD3+/MMP-9+ u intimi#	0	0	46.5	4.68	74.69	4.34	98%	<0.0001
CD3+/MMP-9+ u subintimi#	3.62	0.74	75.67	3.77	188.8	8.19	99%	<0.0001

**ANOVA test; SD=standardna devijacija; # test za linearni trend <0.05; † test parabolični trend <0.05*

Brojevi pregledanih BCL-2, MMP-9 and iNOS pozitivnih stanica su izraženi kao broj stanica/mm²; sr. vr. – srednja vrijednost.

5. RASPRAVA

OA ima elemente upalnih događaja u kojima važnu ulogu imaju makrofagi i sinovijalna ovojnica. Studije OA zgloba koljena pokazale su povezanost sinovitisa i progresije bolesti (85), kao i povezanost sinovitisa s osjetom boli kvantificiranog vizualno-analognom ljestvicom (86). Makrofagi i SSF sinovijalne ovojnice izlučuju MMPe (87). Obzirom na važnu pro-upalnu ulogu sinovijalnih makrofaga, SSF i T-limfocita (88) u patogenezi OA, u ovom radu smo odlučili istražiti njihovu ko-lokalizaciju s iNOS, BCL-2 i MMP-9 kako bi bolje razumjeli upalne promjene sinovijalne ovojnice kuka u OA.

Naši rezultati ukazuju na upalni proces, proces pregradnje i proces preživljenje tkiva u sinovijalnim ovojnicama kuka kod OA. Analizom BCL-2 (preživljenje upalnog tkiva), iNOS (važna pro-upalna i angiogenetska molekula) i MMP-9 (razgradnja tkiva i angiogeneza) u sinovijalnoj ovojnici kuka, htjeli smo utvrditi povezanost izražaja navedenih biljega s histološkim promjenama sinovijalne ovojnice kuka tijekom OA. Usporedbom skupina umjerenog i izraženog OA kuka definiranih K-L stupnjem i zbrojem po Krennu, nismo pronašli razlike u HHS i WOMAC zbrojevima kao ni u VAS ljestvici. HHS i WOMAC zbrojevi se osnivaju na mjerenju opsega pokretljivosti zgloba, procjeni poteškoća u svakodnevnim aktivnostima i intenzitetu boli. Na poteškoće bolesnika pri izvođenju svakodnevnih aktivnosti utječu opseg pokreta i intenzitet boli. Stoga, može se nagađati da zbroj po Krennu ne utječe na kontrakturu zgloba ili osjet boli. Kako se HHS i WOMAC zbrojevi sastoje od više komponenti teško je zaključiti ima li zbroj po Krennu utjecaj na neku od komponenti (opseg pokreta, poteškoće pri svakodnevnim aktivnostima i intenzitet boli). U izraženom obliku OA kuka, vjerojatni uzrok smanjene pokretljivosti su kontrahirana zglobova i prisutnost velikih osteofita, dok je kod umjerenog OA kuka smanjenje HHS i WOMAC zbrojeva u usporedbi sa zdravim osobama vjerojatno uzrokovano intenzivnom boli uslijed izraženog sinovitisa.

Naš rad pokazuje kako se broj slojeva sinovijalnog epitela, broj stanica strome i upalni infiltrat povećavaju s izraženošću OA kuka definiranom zbrojem po Krennu i K-L stupnjem, vjerojatno zato što upalna reakcija postaje kronična. Ograničenje istraživanja je nedostatak skupine ranog OA kuka. Naime, tkivo je uzorkovano tijekom operacija aloartroplastike zgloba kuka, a taj zahvat nije indiciran kod bolesnika s ranim OA kuka.

Prethodne studije su potvrdile postojanje limfoidnog infiltrata u sinovijalnoj ovojnici kod OA. U studiji OA koljena pronađen je kod pet od dvadeset sinovijalnih membrana (89), dok su u

studiji koja je istraživala OA kuka i koljena, nakupine CD3⁺ stanica pronađeni su u 65% sinovijalnih membrana (89). Naše istraživanje je ustanovilo postojanje limfoidnog infiltrata u jednoj četvrtini sinovijalnih ovojnica u skupini s izraženim OA kuka. Limfoidni agregati bili su prisutni samo u izraženom obliku OA. Upalna reakcija kod osteoartritisa se ponešto može razlikovati između pojedinih zglobova, obzirom na biomehaničke i anatomske razlike. Zglob koljena, primjerice, sadrži infrapatelarno masno tkivo koje je izvor proupalnih citokina (90), dok takav izvor pro-upalnih čimbenika u zglobu kuka ne postoji.

Studije OA koljena su pokazale kako su T-limfociti najzastupljenije stanice limfoidnog infiltrata u OA (91) te predstavljaju oko 22% imunoloških stanica koje infiltriraju sinovijalnu ovojnicu u OA. Najbrojnije imunološke stanice upaljene sinovijalne ovojnice u OA koljena su makrofagi koji čine oko 65% upalnog infiltrata (92). Naše istraživanje potvrđuje da su najzastupljenije stanice u sinoviji kuka kod OA makrofagi što smo zaključili na temelju velikog broja CD68⁺/MMP-9⁺ i CD68⁺/BCL-2⁺ stanica u sinovijalnoj ovojnici. Iako je korištenje biljega za razlikovanje tipova stanica uobičajen postupak, identifikacija stanica samo jednim površinski biljegom nije jednoznačna, stoga ove rezultate treba tumačiti pažljivo. Drugo ograničenje istraživanja je što studija nije uključila funkcionalnu ulogu pojedinih biljega, naime studija je ustrojena kao opservacijska. Stoga, razlike u istraživanim biljezima možda nemaju dominantnu ulogu u progresiji OA.

Na proces upale utječe iNOS (93). Ostojić i sur. su u svojoj studiji pokazali veći izražaj iNOS-a u sinovijalnoj ovojnici radiološki i histološki dokazanog ranog OA koljena, nego u sinovijalnoj ovojnici uznapređovalog OA koljena (94). Iako nismo imali skupinu bolesnika s ranim OA, naši su rezultati bili u skladu s tim. Naime, u skupini umjerenog OA kuka zabilježili smo višu razinu iNOS-a uz niži zbroj po Krennu u odnosu na skupinu s izraženim OA kuka. Moguće je kako viša razina ekspresije iNOS-a prethodi jakom sinovitisu koji se očituje višim zbrojem po Krennu u skupini izraženog OA. Ustanovili smo pozitivnu korelaciju zbroja po Krennu između kontrolne skupine i obje skupine OA kuka. Zbroj po Krennu se temelji na zadebljanju sinovijalnog epitela, broju stanica sinovijalne strome i prisustvu leukocitnog infiltrata (95). Izražaj BCL-2 je povišen u obje skupine OA kuka te ima linearan trend u subintimi u skupini s izraženim OA kuka, što naglašava važnost anti-apoptotskog mehanizma u upalnim stanicama sinovijalne ovojnice kao i u sinoviocitima sličnim fibroblastima. Anti-apoptotski mehanizam u stanicama sinovijalne ovojnice vjerojatno pridonosi upali. Primijetili smo izrazitu ko-lokalizaciju iNOS i VEGFR1 pozitivnih stanica,

posebice u subintimi umjerenog oblika OA, što je u suglasju s činjenicom kako iNOS utječe na upalni proces. Upalno promijenjena sinovija u OA proizvodi faktor rasta vaskularnog endotela, VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*) koji potiče angiogenezu (96). Angioneza je prisutna u svim stadijima OA te je povezana s kroničnim sinovitisom (97). Nasuprot tome, u našoj studiji smo ustanovili veću ko-lokalizaciju iNOS sa zrelim krvnim žilama, odnosno CD31 pozitivnim i aktin pozitivnim stanicama, u skupini bolesnika s izraženim OA. Analizirajući ko-lokalizaciju vimentin+/MMP-9+ stanica između istraživanih skupina, čini se kako je proces pregradnje ECM najizraženiji u skupini bolesnika s umjerenim OA, dok se sposobnost preživljenja sinoviocita sličnih fibroblastima povećava s izraženošću bolesti. Povećan izražaj BCL-2 je dokumentiran u sinoviocitima sličnim fibroblastima sinovijalnih ovojnica kod reumatoidnog artritisa gdje doprinosi upalnom procesu (98). Malo se zna o izražaju BCL-2 u stanicama sinovijalne ovojnice u OA. Mi smo zabilježili sličan, ali manje intenzivan proces u sinovijalnim ovojnicama OA kuka. Sinoviociti slični fibroblastima zaštićeni od apoptoze, mogu pridonijeti upalnom procesu sinovijalne ovojnice u OA kuka. Opažena ko-lokalizacija makrofaga s BCL-2, osobito u intimi izraženog oblika OA, implicira njihov dugi životni potencijal. Snažna ko-lokalizacija makrofaga i MMP-9 u obje skupine OA kuka je očekivana obzirom na njihovu ulogu u patogenezi OA (24). T-limfociti imaju svoju pomagačku ulogu u subintimi umjerenog oblika OA kuka, dok ko-lokaliziraju BCL-2 i pridonose procesu pregradnje u izraženom obliku OA. Zaključno, procesi pregradnje ECM matriksa i angiogeneze u sinovijalnoj ovojnici kuka mogli bi biti izraženiji u umjerenom obliku OA kuka, dok je izraženi oblik OA kuka obilježen fibrozom i završenom angiogenezom s infiltracijom makrofagima zaštićenim od apoptoze.

6. ZAKLJUČCI

1. Usporedbom skupina umjerenog i izraženog OA kuka definiranih zbrojem po Krennu i K-L stupnjem, nema razlike u HHS i WOMAC zbrojevima kao ni u VAS ljestvici.
2. Broj slojeva sinovijalnog epitela, broj stanica strome i upalni infiltrat se povećavaju s izraženošću OA kuka definiranom zbrojem po Krennu i K-L stupnjem.
3. Limfoidni folikuli nisu prisutni u sinovijalnim ovojnica kontrolne skupine, a tek sporadično su prisutni u sinovijalnoj ovojnici skupine s umjerenim OA kuka. U četvrtini sinovijalnih ovojnica skupine s izraženima OA kuka prisutni su limfoidni folikuli. Limfoidni agregati su prisutni samo u sinoviji izraženog OA kuka.
4. Najzastupljenije stanice u sinoviji kuka kod OA su makrofagi što se zaključuje na temelju velikog broja CD68+/MMP-9+ i CD68+/BCL-2+ stanica u sinovijalnoj ovojnici.
5. U skupini umjerenog OA kuka je viša razina iNOS-a uz niži zbroj po Krennu u odnosu na skupinu s izraženim OA kuka.
6. Postoji pozitivna korelaciju zbroja po Krennu između kontrolne skupine i obje skupine OA kuka.
7. Izražaj BCL-2 je povišen u sinovijalnim ovojnica obje skupine OA kuka te ima linearan trend u subintimi u skupini s izraženim OA kuka.
8. Izražaj MMP-9 u intimi je povišen s linearnim trendom u odnosu na izraženost bolesti.
9. Ekspresija MMP-9 u subintimi pokazuje parabolički trend s najvišom razinom u umjerenom OA kuka.
10. Postoji izrazita ko-lokalizaciju iNOS i VEGFR1 pozitivnih stanica, posebice u subintimi umjerenog oblika OA.
11. Ustanovljena je izražena ko-lokalizacija iNOS sa zrelim krvnim žilama, odnosno CD31 pozitivnim i aktin pozitivnim stanicama u skupini bolesnika s izraženim OA.
12. Najizraženija ko-lokalizacija vimentin+/MMP-9+ stanica jest u umjerenom obliku OA.
13. Ko-lokalizacija vimentin+/BCL-2+ stanica se povećava s izraženosti OA kuka.
14. Makrofagi pokazuju izraženu ko-lokalizaciju s BCL-2, osobito u intimi izraženog oblika OA kuka.

7. SAŽETAK

Osteoartritis kuka (OAK) je karakteriziran razgradnjom hrskavice i sinovitisom zgloba kuka. Međutim, patohistološki učinci upale sinovijalne ovojnice na OAK nisu jasni. Cilj ove studije bio je ustanoviti izražaj iNOS, BCL-2 i MMP-9 u različitim tipovima stanicama sinovijalne ovojnice. Retrospektivno smo analizirali 32 bolesnika. Dokumentirali smo dob, spol, tjelesnu težinu i visinu, indeks tjelesne mase te analizirali sinoviocyte slične fibroblastima, makrofage i limfocite u rezovima tkiva. Stupnjevali smo OAK uz pomoć OARSI (*engl. osteoarthritis cartilage histopathology assessment system*) zbroja, WOMAC (*engl. Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*) i HHS (*engl. Harris Hip Score*) zbroja, zbroja po Krennu i K-L (*engl. Kellgren-Lawrence*) zbroja. Operacija potpune aloartroplastike kuka napravljena je u 32 bolesnika, uključujući kontrolnu skupinu. Bolesnike smo podijelili u dvije skupine obzirom na izraženost bolesti. Tkiva smo analizirali imunohistokemijskim metodama. Postoji razlika u zbroju po Krennu i K-L zbroju između sve tri skupine, ali i između skupina umjerenog i izraženog oblika OAK. Broj slojeva epitela, rezidentnih stanica strome i posebno limfocitni infiltrat se povećavaju sukladno izraženosti OAK. Izražaj iNOS, u intimi i subintimi pozitivno korelira sa zbrojem po Krennu u skupinama s umjerenim i izraženim OAK. Izražaj BCL-2 u intimi u skupini izraženog OAK pozitivno je povezan sa zbrojem po Krennu. Zaključno, iNOS, BCL-2 i MMP-9 su uključeni u regulaciju OAK. Ova studija ukazuje na povezanost patohistoloških značajki, upale sinovijalne ovojnice i stanja hrskavice zgloba kuka u bolesnika operiranih zahvatom ugradnje potpune aloartroplastike zgloba kuka zbog OA ili prijeloma.

8. SUMMARY

Osteoarthritis (HOA) is characterized by degradation of the cartilage and synovitis. However, the pathohistological effects of synovial tissue inflammation on HOA are not clear. The aim of this study was to evaluate the expression of iNOS, BCL-2 and MMP-9 markers in different synovial cell populations. A total of 32 patients were evaluated retrospectively. Age, sex, height, weight, body mass index were recorded and lymphocyte, fibrocytes and macrophages were analysed in tissue sections. Osteoarthritis cartilage histopathology assessment system (OARSI), Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), Krenn score, Harris Hip Score (HHS) and Kellgren–Lawrence (K-L) grading of the hip joints were performed. Total hip arthroplasty was performed on 32 patients and controls. Patients were divided into two groups according to their disease severity. The tissues were immunohistochemically analysed. K-L grade and Krenn score differ between all three groups, but also between moderate and severe OA. Synovial lining cell layer, resident cells in stroma and especially inflammatory infiltration were increasing with severity of OA. iNOS expression in both intima and subintima was positively correlated with Krenn score in moderate and severe osteoarthritis (OA) groups. Expression of BCL-2 in intima of severe OA patients was positively correlated with Krenn score. In conclusion, iNOS, BCL-2 and MMP-9 are involved in the regulation of HOA. Our study indicates a relationship between the pathohistological features, the synovial inflammation and the cartilage condition at the time of hip replacement due to OA or femoral neck fracture.

9. LITERATURA

1. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. Arthritis and rheumatism. 2008;58(1):26-35. Epub 2008/01/01.
2. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. Arthritis and rheumatism. 2012;64(6):1697-707. Epub 2012/03/07.
3. Chen D, Shen J, Zhao W, Wang T, Han L, Hamilton JL, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. Bone Res. 2017;5:16044. Epub 2017/02/06.
4. Salmon JH, Rat AC, Sellam J, Michel M, Eschard JP, Guillemin F, et al. Economic impact of lower-limb osteoarthritis worldwide: a systematic review of cost-of-illness studies. Osteoarthritis and cartilage. 2016. Epub 2016/03/23.
5. Solignac M. [COART France 2003 report on new socioeconomic data on osteoarthritis in France]. Presse Med. 2004;33(9 Pt 2):S4-6. Epub 2004/07/01. COART France rapport 2003 sur les nouvelles données socio-économiques de l'arthrose en France.
6. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, et al. Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. J Rheumatol. 2009;36(4):809-15. Epub 2009/03/17.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect. 2005;54:465-80. Epub 2005/06/15.
8. Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. Arthritis and rheumatism. 1995;38(7):960-8. Epub 1995/07/01.
9. Buckwalter JA RL, Hunziker EB. Articular cartilage: Composition, structure and response to injury and methods of facilitation repair. JW E, editor. New York, NY: Raven Press; 1990.
10. Buckwalter JA MW. Cartilage repair in osteoarthritis. Moskowitz RW HD, Goldberg VM, Mankin HJ, editor. Philadelphia, PA: WB Sanders; 1992.

11. DR E. Collagen structure and function in articular cartilage: Metabolic change in the development of osteoarthritis. Kuettner KE GV, editor. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, ; 1995.
12. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microscopy research and technique*. 1994;28(5):385-97. Epub 1994/08/01.
13. Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. 2007;65(3):222-8. Epub 2007/10/10.
14. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and cartilage*. 2009;17(8):971-9. Epub 2009/03/24.
15. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Annals of the rheumatic diseases*. 1989;48(4):271-80. Epub 1989/04/01.
16. Conde J, Scotece M, Gómez R, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Adipokines and Osteoarthritis: Novel Molecules Involved in the Pathogenesis and Progression of Disease. *Arthritis*. 2011;2011:203901.
17. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52(7):1799-805. Epub 2003/06/28.
18. Lieberthal J, Sambamurthy N, Scanzello CR. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2015;23(11):1825-34. Epub 2015/11/03.
19. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224. Epub 2009/06/13.
20. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of medicine and life*. 2014;7(1):37-41. Epub 2014/03/22.
21. Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nature medicine*. 2010;16(6):687-93. Epub 2010/05/25.
22. Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ. Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone*. 2009;44(4):522-7. Epub 2009/01/13.
23. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee surgery,*

sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA. 2012;20(3):423-35. Epub 2011/12/17.

24. Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2020;28(5):555-61. Epub 2020/01/27.

25. Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1995;43:129-32. Epub 1995/02/01.

26. Lahm A, Mrosek E, Spank H, Erggelet C, Kasch R, Esser J, et al. Changes in content and synthesis of collagen types and proteoglycans in osteoarthritis of the knee joint and comparison of quantitative analysis with Photoshop-based image analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010;130(4):557-64. Epub 2009/10/20.

27. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;381(2):205-12. Epub 2000/10/14.

28. Polur I, Lee PL, Servais JM, Xu L, Li Y. Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histology and histopathology*. 2010;25(5):599-608. Epub 2010/03/20.

29. Frost HM. Perspective: genetic and hormonal roles in bone disorders: insights of an updated bone physiology. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2003;3(2):118-35. Epub 2005/03/11.

30. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2010;18(4):419-33. Epub 2010/02/02.

31. Aigner T SN. Pathogenesis and pathology of osteoarthritis. 5 ed. Hochberg M SA, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M editor. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2011.

32. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(1):43-9. Epub 2010/12/08.

33. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and cartilage*. 2012;20(12):1484-99. Epub 2012/09/11.

34. Smith MD. The normal synovium. *The open rheumatology journal*. 2011;5:100-6. Epub 2012/01/27.

35. Castrogiovanni P, Di Rosa M, Ravalli S, Castorina A, Guglielmino C, Imbesi R, et al. Moderate Physical Activity as a Prevention Method for Knee Osteoarthritis and the Role of

Synoviocytes as Biological Key. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3). Epub 2019/01/30.

36. O'Brien K, Tailor P, Leonard C, DiFrancesco LM, Hart DA, Matyas JR, et al. Enumeration and Localization of Mesenchymal Progenitor Cells and Macrophages in Synovium from Normal Individuals and Patients with Pre-Osteoarthritis or Clinically Diagnosed Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4). Epub 2017/04/06.

37. Zhang H, Lin C, Zeng C, Wang Z, Wang H, Lu J, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77(10):1524-34. Epub 2018/07/12.

38. Presle N, Pottier P, Dumond H, Guillaume C, Lapique F, Pallu S, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006;14(7):690-5. Epub 2006/03/11.

39. Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019;109:2318-26. Epub 2018/12/16.

40. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(11):625-35. Epub 2010/10/07.

41. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis and cartilage*. 2008;16 Suppl 2:S15-20. Epub 2008/10/01.

42. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(11):3492-501. Epub 2005/10/29.

43. Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, James Norton H, Zinchenko N, Ingram J, et al. Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *The open rheumatology journal*. 2012;6:24-32. Epub 2012/05/03.

44. Bhattacharyya T, Gale D, Dewire P, Totterman S, Gale ME, McLaughlin S, et al. The clinical importance of meniscal tears demonstrated by magnetic resonance imaging in

osteoarthritis of the knee. The Journal of bone and joint surgery American volume. 2003;85(1):4-9. Epub 2003/01/21.

45. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). Osteoarthritis and cartilage. 2013;21(1):16-21. Epub 2012/12/01.

46. Han D, Fang Y, Tan X, Jiang H, Gong X, Wang X, et al. The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in osteoarthritis: An update. Journal of cellular and molecular medicine. 2020;24(17):9518-32. Epub 2020/07/21.

47. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis and rheumatism. 2001;44(6):1237-47. Epub 2001/06/16.

48. Rose BJ, Kooyman DL. A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. Dis Markers. 2016;2016:4895050. Epub 2016/08/02.

49. Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1999;79(12):1669-77. Epub 2000/01/01.

50. Duerr S, Stremme S, Soeder S, Bau B, Aigner T. MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. Clinical and experimental rheumatology. 2004;22(5):603-8. Epub 2004/10/16.

51. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1992;66(6):680-90. Epub 1992/06/01.

52. Cox JH, Starr AE, Kappelhoff R, Yan R, Roberts CR, Overall CM. Matrix metalloproteinase 8 deficiency in mice exacerbates inflammatory arthritis through delayed neutrophil apoptosis and reduced caspase 11 expression. Arthritis and rheumatism. 2010;62(12):3645-55. Epub 2010/12/02.

53. Dreier R, Grassel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. Experimental cell research. 2004;297(2):303-12. Epub 2004/06/24.

54. T. Shiomi VL, J. D'Armiento, and Y. Okada. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases2010.

55. Nishii T, Shiomi T, Sakai T, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Computational measurement of joint space width and structural parameters in normal hips. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2012. Epub 2012/01/25.
56. Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(29):17124-31. Epub 1996/07/19.
57. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6. Epub 1988/06/16.
58. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(6):2097-102. Epub 1995/12/01.
59. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanpowpong T, Tanavalee A, Yuktanandana P, et al. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in primary knee osteoarthritis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2015;98 Suppl 1:S91-7. Epub 2015/03/15.
60. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(7):1275-86. Epub 1998/07/15.
61. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):1-16. Epub 1997/08/15.
62. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology*. 1991;32:223-54. Epub 1991/01/01.
63. Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, Hanada T, Modjtahedi N, Penninger JM, et al. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171:2-11. Epub 2009/09/03.
64. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-26. Epub 1994/04/15.
65. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *The American journal of surgical pathology*. 1997;21(1):88-101. Epub 1997/01/01.

66. Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*. 1999;140(2):941-9. Epub 1999/02/02.
67. Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature biotechnology*. 1996;14(3):297-301. Epub 1996/03/01.
68. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62. Epub 1995/03/10.
69. S J. Specijalna patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
70. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441-6. Epub 1999/02/16.
71. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(1):41-9. Epub 1999/11/24.
72. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;304(3):433-5. Epub 2003/05/06.
73. Hilmi C, Larribere L, Giuliano S, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R, et al. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(6):1499-505. Epub 2007/12/15.
74. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*. 1999;13(15):1899-911. Epub 1999/08/13.
75. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 2000;103(6):839-42. Epub 2001/01/04.
76. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(1):C45-51. Epub 2006/09/01.
77. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(7):3421-9. Epub 2001/07/10.
78. Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, et al. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after

traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *Journal of neurochemistry*. 2002;82(1):181-91. Epub 2002/07/02.

79. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6. Epub 2000/10/26.

80. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis and rheumatism*. 1991;34(5):505-14. Epub 1991/05/01.

81. Vukojevic K, Skobic H, Saraga-Babic M. Proliferation and differentiation of glial and neuronal progenitors in the development of human spinal ganglia. *Differentiation; research in biological diversity*. 2009;78(2-3):91-8. Epub 2009/06/19.

82. Juric M, Zeitler J, Vukojevic K, Bocina I, Grobe M, Kretzschmar G, et al. Expression of Connexins 37, 43 and 45 in Developing Human Spinal Cord and Ganglia. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24). Epub 2020/12/12.

83. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Bocina I, Glavina Durdov M, Vukojevic K, et al. Connexin Signaling in the Juxtaglomerular Apparatus (JGA) of Developing, Postnatal Healthy and Nephrotic Human Kidneys. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21). Epub 2020/11/12.

84. Urlic M, Urlic I, Urlic H, Masek T, Benzon B, Vitlov Uljevic M, et al. Effects of Different n6/n3 PUFAs Dietary Ratio on Cardiac Diabetic Neuropathy. *Nutrients*. 2020;12(9). Epub 2020/09/16.

85. Felson DT, Niu J, Neogi T, Goggins J, Nevitt MC, Roemer F, et al. Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(3):458-64. Epub 2015/10/04.

86. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis and cartilage*. 2005;13(5):361-7. Epub 2005/05/11.

87. Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and cartilage*. 2004;12(5):409-18. Epub 2004/04/20.

88. Li YS, Luo W, Zhu SA, Lei GH. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Frontiers in immunology*. 2017;8:356. Epub 2017/04/21.

89. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Annals of the rheumatic diseases*. 1988;47(4):300-7. Epub 1988/04/01.
90. Favero M, El-Hadi H, Belluzzi E, Granzotto M, Porzionato A, Sarasin G, et al. Infrapatellar fat pad features in osteoarthritis: a histopathological and molecular study. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(10):1784-93. Epub 2017/09/29.
91. Haynes MK, Hume EL, Smith JB. Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clin Immunol*. 2002;105(3):315-25. Epub 2002/12/25.
92. Pessler F, Chen LX, Dai L, Gomez-Vaquero C, Diaz-Torne C, Paessler ME, et al. A histomorphometric analysis of synovial biopsies from individuals with Gulf War Veterans' Illness and joint pain compared to normal and osteoarthritis synovium. *Clinical rheumatology*. 2008;27(9):1127-34. Epub 2008/04/17.
93. Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(7):390-8. Epub 2012/05/30.
94. Ostojic M, Soljic V, Vukojevic K, Dapic T. Immunohistochemical characterization of early and advanced knee osteoarthritis by NF-kappaB and iNOS expression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2017;35(9):1990-7. Epub 2016/12/14.
95. Krenn V, Morawietz L, Haupl T, Neidel J, Petersen I, Konig A. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathology, research and practice*. 2002;198(5):317-25. Epub 2002/07/03.
96. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(8):2173-7. Epub 2003/08/09.
97. Henrotin Y, Pesesse L, Lambert C. Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2014;6(1):20-34. Epub 2014/02/04.
98. Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Haines K, 3rd, Pope RM. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol*. 2000;164(10):5227-35. Epub 2000/05/09.

10. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Davor Čarić

DATUM ROĐENJA: 03. veljače 1977.g.

MJESTO ROĐENJA: Virovitica, Republika Hrvatska

ADRESA: Šoltanska 22, 21 000 Split

MOB: 098 908 4363

E-MAIL: caric.davor@gmail.com

USTANOVA ZAPOSLENJA: Klinički bolnički centar Split

OBRAZOVANJE: Srednja škola – V. gimnazija Vladimir Nazor, Split
1991-1995.g.
Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, 2002.g.
Poslijediplomski studij: Klinička medicina utemeljena na dokazima,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, 2017.g.

RADNO ISKUSTVO: Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, pripravnički staž, 2002-2003.g.
Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije, ispostava Hvar, 2003-2004.g.
Klinički bolnički centar Split, Odjel za ortopediju, specijalizant ortopedije, 2005-2010.g.
Klinički bolnički centar Split, Zavod za ortopediju i traumatologiju, specijalist ortoped, 2010.g-

DODATNO OBRAZOVANJE: Engleski jezik, aktivno znanje
Talijanski jezik pasivno znanje,
Rad na računalu

ČLANSTVA: HOD – Hrvatsko ortopedsko društvo, član Upravnog odbora
HLK – Hrvatska liječnička komora, član

KOAUTOR POGLAVLJA U SVEUČILIŠNOM UDŽBENIKU: Ortopedija i traumatologija.
Urednici: Antun Tudor, Marko Bergovec i Zdenko Ostojić. Medicinska naklada, Zagreb (u izradi).

NASTAVNA AKTIVNOST: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, vanjski suradnik u nastavi ortopedije na studiju medicine na hrvatskom i engleskom jeziku.

POPIS RADOVA:

1. Kaufman J, **Caric D**, Vukojevic K. Expression pattern of Syndecan-1 and HSP-70 in hip tissue of patients with osteoarthritis. *J Orthop*. 2019 Aug 14;17:134-138. doi: 10.1016/j.jor.2019.08.019. PMID: 31879492; PMCID: PMC6919396.
2. Smoljanovic T, **Caric D**, Bojanic I. RE: Clinical applications of bone morphogenetic proteins: current evidence. Kanakaris, NK; Giannoudis, PV; *JSOA* 17(3):133-46, 2008. *J Surg Orthop Adv*. 2010 Summer;19(2):135-7; author reply 137. Erratum in: *J Surg Orthop Adv*. 2010 Autumn;19(3):186. Smoljanovic, Tomislav [corrected to Smoljanovic, Tomislav]; Caric, David [corrected to Caric, Davor]. PMID: 20795305.
3. Ostojić Z, Kristo T, Ostojić L, Petrović P, Vasilj I, Santić Z, Maslov B, Vasilj O, **Carić D**. Prevalence of scoliosis in school-children from Mostar, Bosnia and Herzegovina. *Coll Antropol*. 2006 Mar;30(1):59-64. PMID: 16617577.
4. **Caric D**, Zekic Tomas S, Filipovic N, Soljic V, Benzon B, Glumac S, Rakovac I, Vukojevic K. Expression Pattern of iNOS, BCL-2 and MMP-9 in the Hip Synovium Tissue of Patients with Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 2;22(3):1489. doi: 10.3390/ijms22031489. PMID: 33540799; PMCID: PMC7867378.