

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**MATKO ROŠIN**

**SINDEKANI, EGZOSTOZINI I SULFO-TRANSFERAZE KAO  
POTENCIJALNI MODERATORI SINOVIJALNE UPALE U  
BOLESNIKA S OSTEOARTRITISOM KUKA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2024.**

Doktorski rad je napravljen na Zavodu za ortopediju i traumatologiju Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Split te na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

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

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem mentorici rada, prof.dr.sc. Katarini Vukojević, dr. med. na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom provedbe istraživanja i postupka izrade disertacije.

Zahvaljujem njezinim suradnicima sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu na izdašnoj pomoći u provedbi istraživanja: Nela Kelam mag.educ.biol.et.chem, Ivana Jurić, dr.med, Anita Racetin, mag.educ.biol.et.chem, dr.sc. Marin Ogorevc, dr.med, Brieuc Corre, dr.med, prof.dr.sc. Natalija Filipović, dr.vet.med, doc.dr.sc. Benjamin Benzoni, dr.med.

Zahvaljujem dr.sc. Davoru Čariću, dr.med. na osobitoj pomoći u prikupljanju kliničkih uzoraka i podataka, a isto tako i svim medicinskim sestrama i liječnicima Zavoda za ortopediju i traumatologiju Klinike za kirurgiju KBC Split.

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Ljubi Znaoru, dr.med. na prijateljskoj pomoći i podršci.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem

supruzi Marini, kao zahvalu,

te kćeri Luciji i sinu Marinu, kao poticaj.

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Artritis .....	1
1.2.	Osteoartritis .....	1
1.2.1.	Definicija osteoartritisa .....	1
1.2.2.	Pojavnost i socioekonomsko značenje osteoartritisa .....	1
1.2.3.	Etiologija i patofiziologija osteoartritisa .....	2
1.2.4.	Osteoartritis kuka .....	3
1.2.4.1.	Kliničke manifestacije osteoartritisa kuka .....	3
1.2.4.2.	Rizični čimbenici za razvoj osteoartritisa kuka .....	4
1.2.4.3.	Radiološka dijagnostika i klasifikacija osteoartritisa kuka .....	5
1.2.4.4.	Terapijske mogućnosti za liječenje osteoartritisa kuka .....	7
1.3.	Sinovijalna ovojnica .....	8
1.3.1.	Građa sinovijalne ovojnice .....	8
1.3.2.	Sinovijalne stanice .....	9
1.3.3.	Sinovijalna upala u osteoartritisu .....	9
1.4.	Sindekani .....	12
1.4.1.	Građa i sinteza sindekana .....	12
1.4.2.	Funkcija sindekana u upali .....	13
1.4.3.	Sindekani kao potencijalna terapijska meta .....	14
1.5.	Egzostozini .....	15
1.6.	Sulfotransferaze .....	15
<b>2.</b>	<b>CILJEVI RADA I HIPOTEZE .....</b>	<b>17</b>
2.1.	Ciljevi rada .....	17
2.1.1.	Primarni cilj rada .....	17
2.1.2.	Sekundarni ciljevi rada .....	17
2.2.	Hipoteze rada .....	17

<b>3.</b>	<b>ISPITANICI I POSTUPCI .....</b>	<b>19</b>
3.1.	Ispitanici .....	19
3.2.	Postupci .....	22
3.2.1.	Kirurški postupci .....	22
3.2.2.	Histološki postupci .....	22
3.2.3.	Imunofluorescencijski postupci .....	24
3.2.4.	Statistička raščlamba .....	26
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>27</b>
4.1.	Prikaz istraživanih skupina .....	27
4.2.	Imunohistokemijski rezultati .....	29
4.2.1.	Sindekan-1 .....	29
4.2.2.	Sindekan-2 .....	31
4.2.3.	Sindekan-4 .....	33
4.2.4.	NDST-1 .....	34
4.2.5.	NDST-2 .....	36
4.2.6.	Egzostozin-1 .....	38
4.2.7.	Egzostozin-2 .....	39
4.3.	Korelacija imunohistokemijskih rezultata s kliničkim i radiološkim pokazateljima izraženosti osteoartritisa .....	41
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>65</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>OA</b>	osteoartritis
<b>DLY</b>	godine života s invalidnošću (engl. <i>disability-adjusted life years</i> )
<b>MRI</b>	magnetska rezonancija
<b>DMOADs</b>	lijekovi za osteoartritis koji mijenjaju tijek bolesti (engl. <i>disease modifying osteoarthritis drugs</i> )
<b>UDPGD</b>	uridin difosfoglukoza dehidrogenaza
<b>DAMPs</b>	molekularni odgovor povezan s oštećenjem (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i> )
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>LDL</b>	lipoproteini niske gustoće
<b>IMID</b>	bolesti posredovane imunskim mehanizmima (engl. <i>immune-mediated inflammatory diseases</i> )
<b>SDC1</b>	sindekan-1
<b>SDC2</b>	sindekan-2
<b>SDC3</b>	sindekan-3
<b>SDC4</b>	sindekan-4
<b>GAG</b>	glikozaminoglikan
<b>NDST</b>	N-deacetilaza/N-sulfotransferaza
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukin 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>MMP</b>	matriksne metaloproteinaze
<b>ADAMTS</b>	metaloproteinaze slične dizintegrinu s trombospondinskim obrascem (engl. <i>a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> )

<b>IGF-1R</b>	receptor za faktor rasta sličan inzulinu 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> )
<b>EXT1</b>	egzostozin-1
<b>EXT2</b>	egzostozin-2
<b>RANTES</b>	engl. <i>Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted</i>
<b>WOMAC score</b>	bodovanje subjektivne izraženosti osteoartritisa po metodi sveučilišta Western Ontario i McMaster (engl. <i>Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index</i> )
<b>Harris hip score</b>	bodovanje po Harrisu za procjenu disabiliteta uslijed bolesti ili ozljede kuka
<b>K-L</b>	bodovanje po Kellgrenu i Lawrenceu za procjenu uznapredovalosti osteoartričnih promjena kuka ili koljena (engl. <i>Kellgren-Lawrence scale</i> )
<b>VAS</b>	vizualno-analoga skala za subjektivnu procjenu intenziteta boli (eng. <i>The Visual Analogue Scale</i> )
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
<b>PBS</b>	fiziološka otopina puferirana fosfatom
<b>DAPI</b>	4'6-diamidino-2-fenilindol
<b>ANOVA</b>	statistički test za dvosmjernu analizu varijance
<b>IMSYC</b>	imunološki rezultat za synovitis (engl. <i>IMmunologic SYnovitis sCore</i> )
<b>TIMP-3</b>	tkivni inhibitor metaloproteinaze 3 (engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i> )
<b>TNF</b>	čimbenik nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	interleukin 1 $\alpha$
<b>IGF1</b>	faktor rasta sličan inzulinu 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i> )

## **1. UVOD**

### **1.1. Artritis**

Artritis je nespecifični naziv za heterogeni skup poremećaja koji izazivaju akutnu ili kroničnu upalu zglobova. S obzirom na etiologiju i kliničke manifestacije najvažniji i najučestaliji oblici artritisa su:

- Osteoartritis (primarni ili sekundarni)
- Reumatoidni artritis (adultni ili juvenilni)
- Infektivni artritis (akutni ili kronični)
- Hemofilčni artritis
- Psorijatični artritis (1).

### **1.2. Osteoartritis**

#### **1.2.1. Definicija osteoartritisa**

Prema definiciji Međunarodnog društva za istraživanje osteoartritisa (engl. *Osteoarthritis Research Society International*), osteoartritis (OA) je poremećaj pokretnih zglobova karakteriziran staničnim stresom i degradacijom izvanstaničnog matriksa iniciran mikro- ili makroozljedom koja aktivira adaptivne mehanizme popravka koji uključuju proinflamatorne putove. Poremećaj se najprije manifestira na molekularnoj razini (abnormalni metabolizam zglobnih tkiva), zatim slijede anatomske i fiziološke poremećaje (karakterizirani degradacijom hrskavice, pregradnjom kosti, stvaranjem osteofita, upalom) što rezultira gubitkom normalne funkcije zgloba i manifestnom bolešću (2).

#### **1.2.2. Pojavnost i socioekonomsko značenje osteoartritisa**

OA je najučestaliji oblik artritisa - može zahvatiti bilo koji zglob, ali klinički manifestni oblik najčešće zahvaća koljena, kukove i zglobove u području šake (3). Točnu stopu pojavnosti OA u populaciji je teško utvrditi s obzirom na to da još uvijek nisu utvrđeni jasni dijagnostički kriteriji (klinički, radiološki, biokemijski) (4), a postoje i zemljopisne i etničke razlike u pojavnosti OA (5). U populacijskoj studiji Guillemina i suradnika standardizirana prevalencija OA kuka i koljena bila

je 1.9% i 4.7% za muškarce, a 2.5% i 6.6% za žene (6). Što je još važnije, OA kuka i koljena jedan je od najčešćih i najvažnijih uzroka kronične boli i invaliditeta, osobito u populaciji starije životne dobi, ozbiljno utječe na kvalitetu života bolesnika, ali predstavlja i značajno ekonomsko opterećenje za društvo (7). Od ukupno 291 rangiranih zdravstvenih poremećaja, OA kuka i koljena zauzima 11. mjesto u udjelu u globalnoj invalidnosti, a 38. ako se uzme u obzir parametar godina života s invalidnošću (engl. *disability-adjusted life years DLY*) (8). Ono što je nedvojbeno i posebno zabrinjavajuće je trend globalnog kontinuiranog porasta pojavnosti OA (posljedično i DLY): procjena porasta slučajeva od 1990 – 2020. je 132,2% za sve vrste OA s projekcijom daljnjeg rasta od 74,9% za OA koljena i 78,6% za OA kuka do 2050.g. (9).

### **1.2.3. Etiologija i patofiziologija osteoartritisa**

OA se općenito može kategorizirati kao primarni (idiopatski) i sekundarni (posljedični) OA (10). Uobičajeni uzroci sekundarnog OA uključuju traumatske događaje, razvojne poremećaje (npr. displaziju kuka), preboljelu infekciju, upalne ili biokemijske čimbenike (11).

Važno je razumjeti da OA nije patofiziološki jedinstvena bolest, već heterogeni sindrom s različitim kliničkim fenotipovima koji zahvaća sve zglobne strukture, a što na kraju dovodi do zajedničkih kliničkih manifestacija (12). Isto tako, OA možemo shvatiti kao sustavnu / metaboličku bolest koja dovodi do pretežito zglobnih manifestacija (13).

Iako sam naziv OA upućuje na upalni karakter bolesti, tradicionalno je shvaćanje da je primarni OA degenerativna bolest („osteoartroza“) uzrokovana trošenjem zglobne hrskavice uslijed dugotrajnog preopterećenja (14). Premda je oštećenje hrskavice najvažnije završno obilježje bolesti, sadašnje bolje razumijevanje pokazuje da je OA bolest svih zglobnih struktura - patološke promjene uključuju ne samo progresivno oštećenje hrskavice već i sklerozirajuće i cistične promjene u subhondralnoj kosti, stvaranje osteofita, sinovijalnu upalu, degeneraciju ligamenata, hipertrofiju zglobne čahure, promjene u zglobnom masnom tkivu i meniskusima, kao i zahvaćanje neuroloških putova uključenih u obradu boli (15, 16). Do tih promjena dolazi ne samo zbog mehaničkog preopterećenja već i zbog metaboličkih i genetskih čimbenika koji rezultiraju upalom (17). Dokazi sve jasnije upućuju na činjenicu da je kronična upala niskog intenziteta ključna patofiziološka karakteristika OA (14, 18). Stanični i molekularni mehanizmi koji povezuju biomehaničke čimbenike, hrskavično oštećenje i koštanu degradaciju s upalnim promjenama u ranom OA predmet su intenzivnih istraživanja. Recentno je tumačenje da oštećena hrskavica otpušta pro-inflamatorne citokine i molekule koje stimuliraju osteoklaste i tako pokreću subhondralno modeliranje kosti (19). Isto tako, pro-upalne molekule stvorene u osteoblastima subhondralne kosti posljedično dovode do



daljnjeg oštećenja hrskavice - na taj način su kost i hrskavica spregnuti u zajednički ciklus progresivnih upalnih i degenerativnih promjena (20).

#### **1.2.4. Osteoartritis kuka**

OA kuka je jedan od najvažnijih uzročnika otežane pokretljivosti i bolova u starijoj populaciji s procijenjenim 25% rizikom simptomatskog oboljenja do 85. godine života (21) i blizu 10% rizikom za ugradnju totalne proteze kuka tijekom života zbog OA (22). Pojavnost OA kuka je nešto manja u odnosu na OA koljena (23), ali u praksi se oni često razmatraju kao jedinstven klinički entitet. Treba napomenuti da je većina kliničkih istraživanja iz kojih proizlaze znanja o patofiziologiji OA provedena na pacijentima s OA koljena. S obzirom na to da OA kuka i koljena ipak imaju neke zasebne osobitosti, pitanje je da li je takva ekstrapolacija rezultata uvijek opravdana (19).

##### **1.2.4.1. Kliničke manifestacije osteoartritisa kuka**

Tipična klinička slika kod pacijenta s OA uključuje više ili manje izražene sljedeće elemente (24):

- Bol je najvažniji simptom, najčešće se javlja u preponi s propagiranjem prema stražnjici ili koljenu
- Ukočenost u zglobu kuka koja otežava hod ili prigrivanje
- Bol i ukočenost su izraženiji ujutro ili nakon dužeg sjedenja ili ležanja
- Bol se pogoršava pri intenzivnijoj aktivnosti
- Osjećaj zaglavljivanja zgloba kuka i kreptacija pri pokretima
- Smanjen opseg pokreta u kuku
- Šepanje.

Kriteriji koje je postavio *American College of Rheumatology* za postavljanje dijagnoze OA kuka temelje se na anamnestičkim podacima (dob, bol), kliničkom pregledu (opseg pokreta u zahvaćenom kuku), radiološkim i laboratorijskim nalazima (upalni pokazatelji) (25).

#### 1.2.4.2. Rizični čimbenici za razvoj OA kuka

Rizični čimbenici koji pridonose razvoju primarnog OA kuka, a koji su vezani za oboljelu osobu su:

- Starija životna dob – vrlo izražena pozitivna korelacija (26)
- Spol – za razliku od OA koljena, nije dokazana povećana pojavnost kod ženskog spola (27)
- Povećana tjelesna težina – manje izraženo nego kod OA koljena, ali još uvijek, povećanje indeksa tjelesne mase za pet bodova nosi povećanje rizika za OA kuka od 11% (28)
- Genetsko nasljeđe – opservacijske studije dokazale su povezanost AO kuka s genetskim nasljeđem – kod jednojajčanih blizanaca genetski doprinos u riziku za razvoj OA je cca 60% (29), a dokazan je i nasljedni obiteljski povećani rizik (19), ipak genetski mehanizam odgovoran za taj učinak nije još razjašnjen (30)
- Etnička pripadnost – incidencije OA kuka se značajno razlikuju u različitim etničkim skupinama (19)
- Zanimanje – postoje dokazi o povećanoj incidenciji OA kuka kod profesionalnih sportaša i ljudi koji rade teške fizičke poslove, međutim nije jasno radi li se o posljedici mehaničkih opterećenja ili opetovanih ozljeda (19).

Osim općih rizičnih čimbenika za razvoj primarnog OA primjenjivih kod svih zglobova, za OA kuka možemo razmotriti i lokalne biomehaničke čimbenike rizika koji doprinose razvoju i progresiji bolesti koju u tim slučajevima možemo smatrati sekundarnim OA kuka:

- Morfologija zgloba. Postoji sve više dokaza koji upućuju na to da je većina „primarnih“ OA kuka posljedica diskretnih, klinički neuočljivih razvojnih poremećaja koji dovode do mikroostećenja, femoroacetabularnog sraza i konačno razvoja OA (31).

- Razvojna displazija kuka. Plitak i nepravilno orijentiran acetabul dovodi do smanjenja kontaktne femoroacetabularne površine što dovodi do redistribucije i koncentracije sila u anterosuperiorni dio acetabula što dalje vodi u degeneraciju labruma i zglobne hrskavice i pokretanje kroničnog upalnog procesa (32). Ovisno o stupnju displastičnih promjena klinički izraženi OA može nastupiti u ranijoj ili kasnijoj životnoj fazi.

- Femoracetabularni sraz (engl. *impingement*). Femoroacetabularni sraz je zajednički naziv za morfološke koštane promjene u području glave femura i acetabula koje za posljedicu imaju

nepoželjno „sudaranje“. Brojne su studije pokazale povezanost između prisustva femoroacetabularnog sraza i oštećenja hrskavice u kuku (19) te da su različiti morfološki tipovi femoroacetabularnog sraza povezani s povećanom incidencijom OA kuka (33).

- Slabost periartikularne muskulature u regiji kuka. Višestruka su istraživanja potvrdila povezanost slabosti periartikularne muskulature kuka s OA kuka (34). Premda još nedovoljno dokazana, hipoteza je da periartikularna muskulatura kuka ima ulogu u amortizaciji opterećenja i zaštiti zgloba od nepravilnih pokreta (19).

- Ozljede labruma. Razdor acetabularnog labruma može biti posljedica akutnog traumatskog događaja ili kroničnih degenerativnih promjena, osobito onih povezanih sa sindromom femoroacetabularnog sraza. Premda je povezanost ozljeda labruma s OA kuka nedvojbeno, s obzirom na nedostatnost postojećih istraživanja, nije sasvim jasno nastaje li oštećenje hrskavice istodobno s oštećenjem labruma ili kao njegova posljedica (19).

#### **1.2.4.3. Radiološka dijagnostika i klasifikacija osteoartritisa kuka**

Premda se dijagnoza OA kuka vrlo često može postaviti samo na temelju anamneze i kliničke prezentacije, za potvrdu dijagnoze i evaluaciju progresije bolesti standardno se koristi antero-posteriorni radiogram zdjelice.

Elementi koji su uključeni u radiološku procjenu progresije bolesti su:

- stupanj suženja zglobne pukotine,
- stvaranje osteofita,
- skelrozacija i cistične promjene u subhondralnoj kosti,
- deformacija zglobnih tijela.

Na analizi ovih elemenata temelji se i najčešće korištena radiološka klasifikacija OA, ona po Kellgrenu i Lawrenceu (11, 35), univerzalno primjenjiva na sve zglobove pa tako i zglob kuka. Po toj klasifikaciji stupanj OA kuka na radiogramu zdjelice može biti (Slika 1):

- stupanj 0: nema znakova OA;
- stupanj 1: dvojbena OA - možebitno medijalno suženje zglobne pukotine, diskretno stvaranje osteofita u području glave femura;

- stupanj 2: blagi OA – nedvojbeno suženje zglobne pukotine, jasno vidljivo stvaranje osteofita, neznatna subhondralna skleroza;
- stupanj 3: umjereni OA – značajno suženje zglobne pukotine, osteofiti, subhondralna skleroza i cistične promjene, deformitet glave femura i acetabula;
- stupanj 4: teški OA – obliterated zglobni prostor, veliki osteofiti, izražena deformacija glave femura i acetabula.



**Slika 1.** Radiološko stupnjevanje osteoartritisa kuka po Kellgrenu i Lawrenceu: a) stupanj 0; b) stupanj 1; c) stupanj 2; d) stupanj 3; e) stupanj 4 (ilustracija: M. Rošin).

Svakako je važno spomenuti da nema jasne korelacije između izraženosti kliničke slike i radioloških znakova progresije bolesti – pacijenti s visoko stupnjevanim radiogramom OA kuka mogu biti asimptomatski (4). Kao dodatna slikovna dijagnostička metoda kod OA kuka koristi se magnetska rezonancija (MRI) - osjetljivija je od radiograma u otkrivanju zglobnog izljeva, sinovitisa, lezija hrskavice, labruma i koštane srži. Ipak, zbog teže dostupnosti i slabe korelacije

MRI s kliničkom slikom ta je metoda primarno korisna kao biomarker za klinička ispitivanja koja se bave ranim OA ili za provođenje diferencijalne dijagnostike kod nejasnih stanja (36, 37).

#### **1.2.4.4. Terapijske mogućnosti za liječenje osteoartritis kuka**

Terapijske mogućnosti za liječenje OA kuka možemo podijeliti na ne-farmakološke mjere, farmakološke mjere i kirurške intervencije. *American College of Rheumatology* u svojim recentnim preporukama baziranim na dokazima od ne-farmakoloških intervencija za OA kuka snažno podržava vježbanje, gubitak tjelesne težine i hod uz pomoć štapa (38). U istim preporukama snažnu preporuku djelotvornosti među farmakološkim sredstvima zasada imaju samo simptomatski lijekovi usmjereni prvenstveno na kontrolu boli i regresiju upale – nesteroidni protuupalni lijekovi i intarartikularna aplikacija kortikosteroida (38). Metoda koja jedina uistinu značajno može promijeniti kvalitetu života bolesnika s OA je kirurška – različite modifikacije totalne zamjene kuka (artroplastika). Treba imati na umu da je to zapravo amputacijska metoda pri čemu se odstranjeno zglobno tkivo zamjenjuje umjetnim materijalom te je rezervirana za završne faze bolesti. Indikacije za totalnu zamjenu kuka su: radiološki uznapredovale OA promjene kuka (Kellgren i Lawrence stupanj 3 i 4), barem tri mjeseca neuspješnog konzervativnog tretmana i prisustvo izraženih subjektivnih simptoma kojima je porijeklo u zahvaćenom zglobu, a značajno remete kvalitetu života (39). Premda su rezultati artroplastike kuka generalno gledajući odlični (40), ipak treba uzeti u obzir i izvjesne funkcionalne limite koje artroplastika pred pacijente postavlja doživotno, kao i relativno rijetke, ali ozbiljne komplikacije: infekcija, iščašenje, heterotopička osifikacija, labavljenje proteze, periprostetski prijelomi.

Vjerojatno najveći potencijal za napredak liječenja OA leži u promjeni fokusa – s palijacijskog liječenja završnih stadija bolesti prema etiološkom liječenju ranih stadija bolesti (19). U preglednom članku iz 2021.g. Vrouwe i sur. prikazali su čak aktualne 184 studije usmjerene na razvoj farmakološke terapije za OA koja ne bi bila simptomatska već bi djelovala na progresiju bolesti (engl. *disease modifying OA drugs* - DMOADs): lijekovi za modulaciju boli, imunomodulacijski lijekovi, multipotentne mezenhimalne stromalne stanice, plazma bogata trombocitima (engl. *platelet-rich plasma*), lijekovi koji djeluju na metabolizam hrskavice i resorpciju kosti (41). Kako je već spomenuto, terapijski agensi koji ciljaju upalnu komponentu OA važan su dio istraživanja u razvoju medikamenata za bolju kontrolu progresije ove bolesti - u životinjskim pokusnim modelima postoje obećavajući rezultati, ali njihov potencijal u ljudskom OA nije zasada potvrđen (42).

### 1.3. Sinovijalna ovojnica

#### 1.3.1. Građa sinovijalne ovojnice

Sinovijalna ovojnica (membrana) je naziv za tanki sloj mekoga tkiva koji oblaže nehrskavične površine diartrodialnih zglobova, tetivne ovojnice i burze. Sastoji se od kontinuiranog površinskog sloja stanica koje nazivamo intima i podležećeg stromalnog tkiva koje nazivamo subintima. Za razliku od većine seroznih ovojnica u ljudskom organizmu, sinovija nema bazalnu membranu (43). Subintima sadrži krve žile, limfne putove te fibroblastne stanice raspoređene u kolagenom ekstracelularnom matriksu. Histološki, sinovijalno tkivo dijelimo u tri glavna podtipa, s obzirom na strukturu subintimalnog sloja, a to su fibrozni, areolarni i adipozni tip, premda valja napomenuti da se subintimalni sloj može sastojati i od periosta, perimizija ili čak hijaline hrskavice. Areolarni tip sinovijalne ovojnice ima površinski kontinuirani sloj stanica koji se sastoji od nekoliko staničnih slojeva, tipično je nabran, s brojnim poluotočastim izdancima. Nakon toga slijedi matriks vezivnog tkiva (pretežno kolagen tip I) isprepleten s kapilarama, arteriolama, venulama, limfatičnim kanalićima i živčanim tkivom. Vezivni sloj potom prelazi u podležeće tkivo periosta, ligamenta ili tetive. Adipozni tip sinovijalne ovojnice prekriva zglobne masne jastučice pri čemu intimalni sloj može biti u direktnom kontaktu s podležećim adipocitima ili je pak odijeljen od njih kolagenskim slojem. Kod fibroznog tipa subintimalni sloj se dominantno sastoji od vezivnog tkiva, često neodvojivog od okolnog fibroznog i hrskavičnog tkiva (43).

#### 1.3.1. Sinovijalne stanice

Stanice koje formiraju intimu sinovijalne ovojnice nazivamo sinoviocitima te ih dijelimo u tip A i tip B stanica. Tip A stanica su makrofazi i imaju fagocitnu funkciju dok su tip B stanice slične fibroblastima i služe produkciji sinovijalne tekućine.

U normalnoj sinovijalnoj ovojnici tip A stanica je u manjini u odnosu na fibroblastni B tip stanica, međutim u upalnim patološkim stanjima poput reumatoidnog artritisa makrofazi mogu postati dominantna stanična skupina u intimi (i do 80%). Osim u intimi, makrofage nalazimo i u subintimi – zanimljivo je da te dvije populacije makrofaga ne pokazuju identične markere i biokemijsku aktivnost (43). Sve je više dokaza da su makrofazi važan čimbenik ne samo u aktivaciji upalnih procesa, već i u stvaranju i podržavanju bolnog podražaja u OA dvosmjernim međudjelovanjem s nociceptorima (44).

Sinoviociti tipa B (tzv. *fibroblast-like* sinoviociti), dominantna stanična linija normalne sinovijalne membrane iskazuju visoku aktivnost enzima UDP-glukoza-dehidrogenaze (UDPGD)

neophodnog za sintezu hijaluronskih polimera koji su važni sastojak sinovijalne tekućine. Fibroblastne stanice nalazimo i u subintimalnom sloju sinovijalne ovojnice, međutim, ti fibroblasti ne pokazuju značajnu UDGPD aktivnost. Iz tog razloga, pojam sinovijalni fibroblasti ne bismo trebali koristiti kao istoznačnicu za sinoviocite tip B (45).

### 1.3.3. Sinovijalna upala u osteoartritisu

Upalni proces koji zahvaća sinovijalnu ovojnicu osteoartritičnog zgloba može se detektirati slikovnim metodama, artroskopskim pregledom ili histološkom analizom. Usprkos tome, OA se tradicionalno stavljao u skupinu „neupalnih“ poremećaja zgloba budući da je broj leukocita u sinovijalnoj tekućini tipično ispod praga koji definira „upalne“ promjene zgloba (2000 leukocita u mm<sup>3</sup> (46). Rezultati objavljenih istraživanja sugeriraju da sinovijalna upala može biti prisutna i u ranom OA i u uznapređovalom stadiju OA te je uključena i u razvoj i progresiju OA. Sinovijalne stanice koordiniraju proizvodnju molekula koje pokreću i održavaju sinovijalnu upalu i doprinose oštećenju hrskavice tijekom progresije OA (47). Histološke promjene uočene u sinovijalnoj membrani bolesnika s OA tipično uključuju heterogene upalne značajke s neujednačenom prostornom distribucijom - proliferaciju sluznice kao i infiltraciju imunoloških stanica (48). Stupanj infiltracije upalnih stanica u sinovijalnom tkivu ipak je značajno manje izražen u bolesnika s OA u usporedbi s pacijentima koji boluju od najvažnijeg predstavnika „upalnih“ artritisa - reumatoidnog artritisa (49).

Premda je sinovitis nedvojbeno prisutan u OA, patofiziološki mehanizam koji ga pokreće ostaje nejasan – jedna od pretpostavki je da OA sinovitis pokreću produkti razgradnje hrskavice i upalni medijatori koje proizvode hondrociti (47). Brojna istraživanja povezala su patofiziologiju OA s raznim upalnim medijatorima, kao što su citokini, kemokini, čimbenici rasta, adipokini, prostaglandini, leukotrieni, dušikov oksid i neuropeptidi (42).

Rizični čimbenici povezani s nastankom sinovitisa su raznoliki: starenje, ženski spol, ozljede, pretilost, metabolički poremećaji, način prehrane i crijevna flora – pretpostavka je da svi oni direktno ili indirektno iniciraju tzv. molekularni odgovor povezan s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns – DAMPs*) koji potom inicira i podržava upalni sinovijalni odgovor niskog stupnja (50), a potom posljedično i osteoartritis (Slika 2).



**Slika 2.** Shematski prikaz djelovanja etioloških faktora u razvoju sinovitisa i osteoartritisa posredstvom molekularnog odgovora povezanog s oštećenjem (ilustracija: M. Rošin).

### Starenje

Starenje je najvažniji rizični faktor za razvoj OA. Uslijed mitohondrijske disfunkcije, oksidativnog stresa i nakupljanja oštećenih staničnih proteina i DNA, obilježje „ostarjelih“ stanica je povećano stvaranje proinflamatornih i kataboličkih medijatora, DAMPs, što za posljedicu ima razvoj generaliziranog proinflamatornog stanja niskog intenziteta (to stanje se ponekad naziva engleskim neologizmom *inflammageing*) (50, 51).

### Ozljeda

OA nakon ozljede može biti posljedica direktnog mehaničkog oštećenja hrskavice, ali do njega može doći i u slučaju ozljede drugih zglobnih struktura osim hrskavice, pri čemu je najvjerojatniji mehanizam otpuštanje proinflamatornih citokina (koji djeluju kao DAMPs) u sinovijalnu tekućinu s razvojem kroničnog sinovitisa niskog intenziteta koji potom dugotrajnim djelovanjem generira OA (50, 52). Isto tako, kronična upala kao prethodnica razvoja posttraumatskog OA može biti posljedica nakupljanja krvi u zglobu (hemartroze) što je česta posljedica ozljede (53).



### Ženski spol

Žene, osobito nakon menopauze, imaju veći rizik razvoja OA u odnosu na muškarce (3). Dokazi upućuju na to da smanjena produkcija estrogena djeluje proinflamatorno (54), a isto tako dovodi do smanjenja gustoće subhondralne kosti i posljedično povećanog opterećenja na hrskavicu (55).

### Pretilost i metabolički sindrom

Povezanost između pretilosti i rizika za razvoj OA je nedvojbeno. Premda se čini očitim da je kod osoba s visokim indeksom tjelesne mase uzrok promjena koje dovode do oštećenja hrskavice prvenstveno mehaničke prirode (povećano mehaničko opterećenje hrskavice dovodi do tkivne ozljede s posljedičnim otpuštanjem DAMPs), nedvojbeno je dokazano da pretilost inicira razvoj sinovitisa i OA i drugim, nemehaničkim sredstvima (56). Incidencija OA povećana je kod pretelih osoba i u zglobovima koji nisu povezani s prekomjernim opterećenjem uslijed tjelesne mase (npr. ručni zglob) (57). Objašnjenje za ovu činjenicu nalazi se u proinflamatornom djelovanju makrofaga u adipoznom tkivu pretelih osoba te stvaranju različitih citokina (adipokina) sa sustavnim proupalnim djelovanjem (50). Osim sustavnih adipokina, oni se mogu stvarati i lokalno u infrapatelarnom masnom tkivu gdje potiču i održavaju sinovijalnu upalu niskog intenziteta (58). Također, dokazano je da povišen nivo serumskih lipopolisaharida, karakterističan za pretile osobe, dovodi do njihove povišene prisutnosti u sinovijalnoj tekućini što pak korelira s prisutnošću proinflamatornih makrofaga u sinovijalnoj tekućini (59). Slično, jasnu povezanost s pojavnosću OA pokazuju i bolesnici s metaboličkim sindromom (abdominalna pretilost, hipertenzija, inzulinska rezistencija, hiperlipidemija) pri čemu je, čini se, ključni element hiperkolesterolemija s povišenim razinama lipoproteina niske gustoće (LDL) koja potiče sistemski upalni odgovor, pa tako i lokalnu upalu niskog intenziteta u sinovijalnoj ovojnici i hondrocitima (60).

### Prehrana i crijevna flora

Kalorijski preobilna prehrana ne samo da dovodi do povećanja masnog tkiva i posljedičnih učinaka adipoziteta i povećanog indeksa tjelesne mase, već pokreće i generalizirane intracelularne stresne signalne mehanizme koji rezultiraju stvaranjem proupalnih medijatora (61).

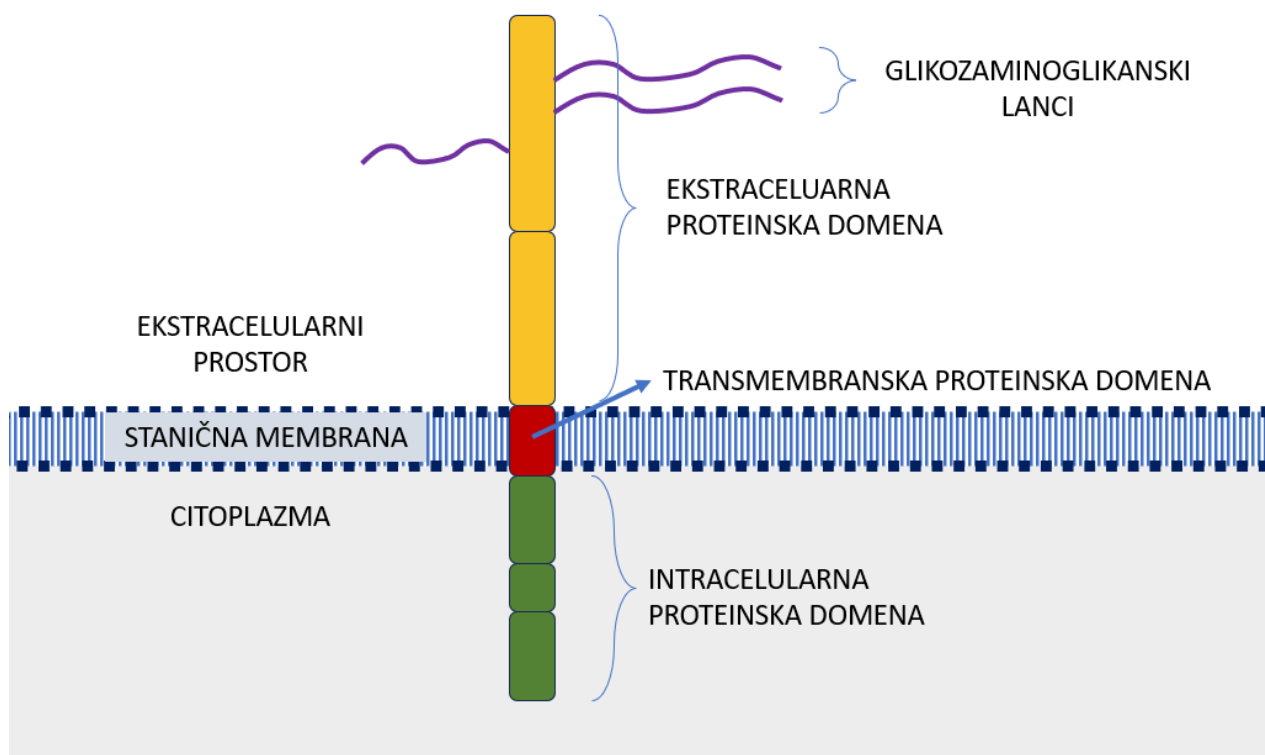
Poremećaj crijevnog mikrobioma također je recentno povezan s nizom bolesti posredovanih imunskim mehanizmima (engl. *immune-mediated inflammatory diseases - IMID*). Smatra se da crijevna disbioza, stanje u kojem je došlo do bitne promjene bakterijske populacije probavne cijevi, potiče kontinuiranu imunološku stimulaciju koja potom može dovesti do patološkog neinfektivnog upalnog stanja u drugim organskim sustavima (62). Premda su daljnja istraživanja potrebna za bolje razumijevanje, raspoloživi dokazi nedvojbeno upućuju na to da crijevna disbioza ima ulogu u inicijaciji i progresiji OA (63).

## 1.4. Sindekani

Sindekanima nazivamo skupinu od četiri slična transmembranska heparan-sulfat proteoglikana koje nalazimo u svih kralježnjaka - zbog međusobne sličnosti u građi sindekan-1 (SDC1) i sindekan-3 (SDC3) se obično definiraju kao članovi jedne podskupine, a sindekan-2 (SDC2) i sindekan-4 (SDC4) druge podskupine (64).

### 1.4.1. Građa i sinteza sindekana

Sindekani pripadaju grupi proteoglikanskih molekula, što znači da se sastoje od proteinske jezgre i barem jednog glikozaminoglikanskog (GAG) lanca kovalentno povezanog s proteinskom jezgrom (65) (Slika 3). Proteinska jezgra sindekana je evolucijski konzervirana obitelj proteinskih molekula što se posebno odnosi na citoplazmatsku i transmembransku domenu koje su jedinstvene za sve sindekane, međusobno se razlikuju po ekstracelularnoj domeni koja je specifična za svakoga člana sindekanske obitelji (66).



**Slika 3.** Shematski prikaz građe molekule sindekana (ilustracija: M. Rošin).

Na ekstracelularnu proteinsku domenu sindekana vezani su heparan-sulfatni lanci zbog čega su sindekani često klasificirani kao heparan-sulfatni proteoglikani, premda sindekani -1 i -3 imaju na sebe vezana i dva hondroin-sulfatna glikanska lanca (67). Heparan-sulfati su polisaharidne

molekule koje se sastoje od ponavljajućih sekvenci disaharida N-acetil-D-glukoamina i D-glukuronske kiseline (68). Glikanski lanci heparan-sulfata su vjerojatno, kao ko-receptori, odgovorni za različite funkcije sindekana (69). Kritičnu ulogu u sintezi i modifikaciji heparan-sulfatnih lanaca imaju egzostozini (engl. *exostosins*) i N-deacetilaze/N-sulfotransferaze (NDST). Tijekom biosinteze, egzostozini djeluju kao polimeraze koje u polisaharidne lance naizmjenice ugrađuju molekule acetilglukoamina i glukuronske kiseline dok N-deacetilaze/N-sulfotransferaze enzimatskim djelovanjem zamjenjuju acetilnu grupu acetilglukoamina sa sulfatnom grupom, što je presudno za stvaranje funkcionalne molekule (70). Ekspresija različitih sindekana je široko rasprostranjena u vrlo raznolikim humanim adultnim tkivima (u svim nukleiranim stanicama prisutna je ekspresija barem jednog sindekana), ali ne uniformno – sindekan-1 dominira u epitelnim tkivima, sindekan-2 u vezivnim tkivima i endotelnim stanicama, sindekan-3 u neuralnim stanicama dok je ekspresija sindekana-4 najrasprostranjenija (71, 72). Zanimljivo je da se obilježja ekspresije sindekana u tkivima embrija tijekom različitih stadija organogeneze značajno razlikuju od onih u adultnim tkivima (72).

#### **1.4.2. Funkcija sindekana u upali**

Sindekani su sposobni za interakciju s različitim izvanstaničnim ligandima koji uključuju faktore rasta, adhezijske receptore, citokine, kemokine, proteinaze i proteine ekstracelularnog matriksa (73) čime iniciraju različite biološke signale povezane s adhezijom stanica, angiogenezom (74), upalom i popravkom tkiva (71).

Sindekani u upali imaju važnu ulogu u ekstravazaciji leukocita i stvaranju citokinskog gradijenta na mjestu upale, na taj način sudjeluju ne samo u početnom regrutiranju proupalnih molekula, već i u kontroli napredovanja upale (75). Istraživanja sindekana na životinjskim modelima pokazala su da je njihova ekspresija u upalnim stanjima redovno povišena, ali se čini da oni mogu imati završno i pro-upalno i protu-upalno djelovanje (75, 76). Sindekani i citokini su u upalnim stanjima uzajamno dvosmjerno povezani - s jedne strane čini se da sindekani kontroliraju produkciju citokina, ali da je istovremeno i ekspresija sindekana kontrolirana djelovanjem citokina. U nekim slučajevima isti citokini mogu imati potpuno različiti efekt na ekspresiju različitih sindekana, npr. u eksperimentalnim uvjetima IL-1 $\beta$  i IL-6 smanjuju ekspresiju sindekana-1, a povećavaju ekspresiju sindekana-2 (77). Osim ekstravazacije leukocita i regulacije citokina, važan kronični upalni efekt posredovan sindekanima je i remodeliranje ekstracelularnog matriksa s posljedičnim stvaranjem fibroze, npr. u plućima ili miokardu (78, 79).

Osim u transmembranskom obliku, sindekani postoje i kao topljive izvanstanične domene (80). Proteolitičko jukstamembransko cijepanje sindekana povezano je s upalom, uglavnom kao rezultat enzimskog djelovanja šedaza (engl. *shedases*), npr. MMP (matriksne metaloproteinaze) i ADAMTS (engl. *a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (81). Sindekani koji su na takav način otpušteni u izvanstanični matriks mogu smanjiti transdukciju signala u stanici, zasiti ligande, ali i pokrenuti dodatne signalne putove kao cirkulirajući efektori (71).

Iako je ekspresija sindekana-4 oskudna u normalnoj zglobnoj hrskavici, njegova je ekspresija snažno pojačana u ljudskoj OA hrskavici kao i u hrskavici u životinjskim pokusnim modelima degenerativnog oštećenja zglobova (73, 82, 83). Izlučivanje sindekana-4, posredovano MMP-9, povećano je u sinovijalnoj tekućini pacijenata s OA, ali ne i u serumu, te je taj nalaz potencijalno dobar prediktor za ozbiljnost OA (84). Značaj ekspresije drugih sindekana u OA hrskavici nije jasno utvrđen u postojećim studijama (73). Povećana ekspresija sindekana-1 zamijećena je u mononuklearnim infiltratima sinovijalne ovojnice pacijenata s reumatoidnim i psorijatičnim artritismom (85).

Koliko mi je poznato, ne postoje prethodne studije koje analiziraju ekspresiju sindekana-1, sindekana-2 i sindekana-4 u sinovijalnoj membrani teškog OA kuka.

### **1.4.3. Sindekani kao potencijalna terapijska meta**

S obzirom na uključenost u raznolike signalne putove kod različitih bolesti, istražuju se razna terapijska sredstva koja bi potencijalno interferirala s ekspresijom i funkcijom sindekana. Sva ova istraživanja zasada su u pretkliničkim fazama. Jedan smjer istraživanja je mogući utjecaj heparanaza na funkciju heparan-sulfatnih proteoglikana kod malignih bolesti (86, 87). Isto tako u onkološkoj terapiji, istražuje se djelovanje oligopeptidnih inhibitora sindekana-1, primjer je sinstatin (engl. *synstatin*), selektivni inhibitor sindekana-1 koji blokira vezivanje  $\alpha\beta3$  ili  $\alpha\beta5$  integrina ili IGF-1R kinaze za sindekan-1 što smanjuje tumorsku invaziju (86). Postoje i eksperimentalni dokazi da blokirajuća protutijela za sindekan-4 mogu imati pozitivan učinak u prevenciji hrskavičnog oštećenja kod mišjeg modela OA (82).

## 1.5. Egzostozini

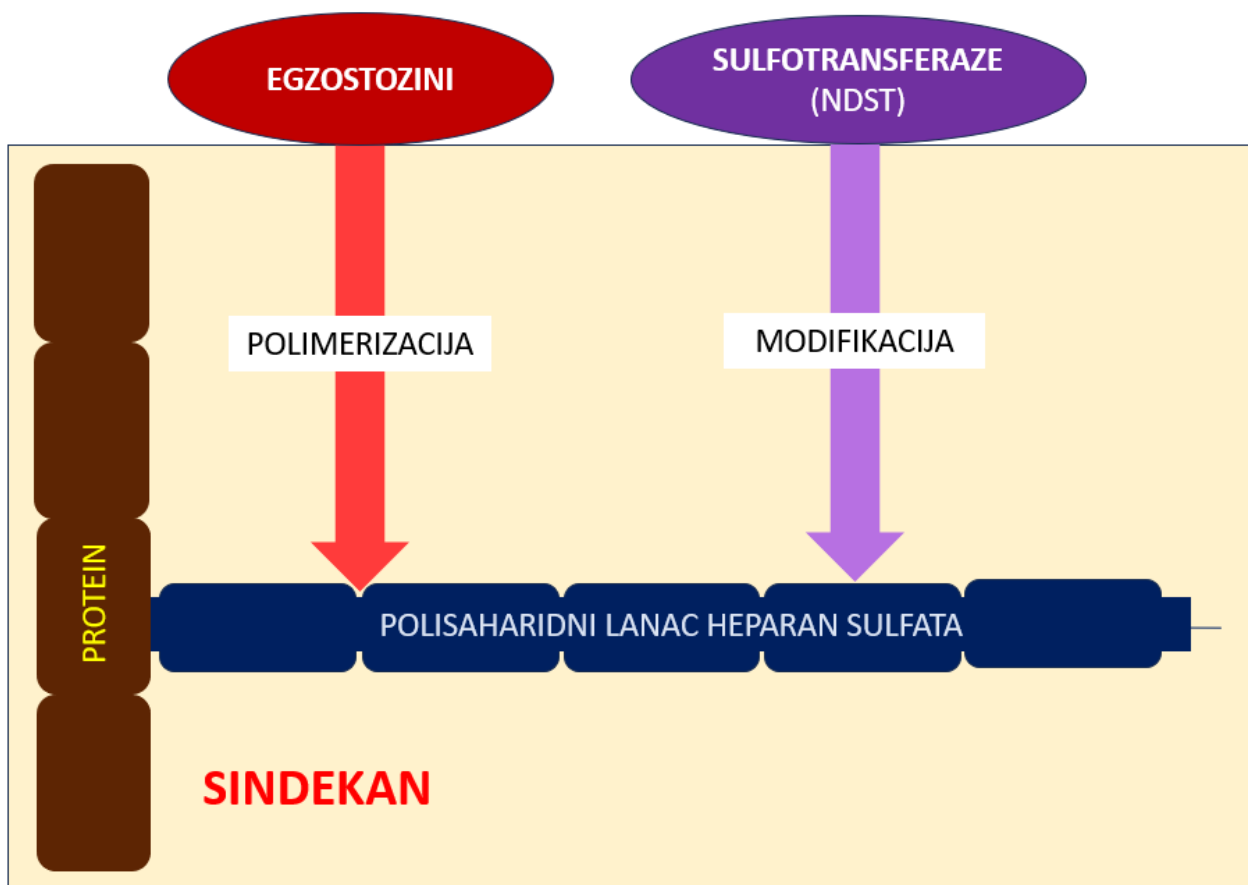
Egzostozinska obitelj glikoziltransferaza posreduje u sintezi heparan-sulfatnih proteoglikana (kojima sindekani također pripadaju) – dobro je istraženo da su i egzostozin-1 (EXT1) i egzostozin-2 (EXT2) potrebni *in vivo* za produljenje (polimerizaciju) heparan-sulfatnog lanca, ključnog funkcionalnog elementa molekule sindekana te da je njihova ekspresija prisutna u svim tkivima sisavaca (88). Zanimljivo je da manjak makar jednog egzostozina (1 ili 2) dovodi do prekida sinteze heparan-sulfatnog lanca, odnosno da su oba proteina neophodna za uspješnu polimerizaciju i da jedan ne može zamijeniti drugoga – zbog toga se pretpostavlja da egzostozin-1 i -2 zapravo djeluju kao ko-polimeraze (88). Različite mutacije egzostozina-1 i -2 nedvojbeno su povezane s razvojem nasljednog multiplog osteohondroma (i ujedno povećanim rizikom za razvoj hondrosarkoma), ali mehanizam tog djelovanja zasada nije razjašnjen (89). Bolesnici s nasljednim multiplim osteohondromom osim skeletalne patologije često imaju i simptome slične autizmu, probavne smetnje, mišićnu slabost i progresivnu aterosklerozu, što je sve vjerojatno povezano s poremećenom sintezom heparan-sulfata (90).

Za sada ne postoje radovi koji analiziraju ekspresiju egzostozina u sinovijalnoj ovojnici kod bolesnika s OA.

## 1.6. Sulfotransferaze

N-deacetilaze/N-sulfotransferaze (NDST) 1 i 2 kataliziraju reakciju (zamjenu acetilne grupe sulfatnom grupom) koja dovodi do ključne modifikacije oligosaharidnog lanca heparan sulfata (91). Dakle, NDST, djelujući nakon egzostozina-1 i -2 stvaraju ključan funkcionalni dio molekule svih sindekana (Slika 4). Ono što je zanimljivo je da nivo ekspresije egzostozina ima utjecaj na ekspresiju NDST pri čemu jaka ekspresija egzostozina-2 za posljedicu ima pojačanu NDST ekspresiju, dok izraženija ekspresija egzostozina-1 ima obrnuti učinak (92). Proupalni citokini mogu povećati ekspresiju NDST, što kroz povećanu sekvestraciju RANTES (engl. *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted*) može u konačnici dovesti do ekstravazacije leukocita na mjestu upale (91).

Istražujući dostupnu literaturu, ne postoje radovi koji analiziraju ekspresiju NDST u sinovitisu kod bolesnika s OA.



**Slika 4.** Shematski prikaz djelovanja egzostozina i sulfotransferaza u sintezi polisaharidnih lanaca heparan sulfata (ilustracija: M. Rošin).

## **2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE**

### **2.1. Ciljevi rada**

#### **2.1.1. Primarni cilj rada**

Primarni cilj rada je imunohistokemijskim metodama usporediti izražaj transmembranskih proteoglikana sindekana-1, -2 i -4 te spojeva ključnih za njihovu biosintezu (egzostozina-1 i -2 te N-deacetilaze/N-sulfotransferaze-1 i -2) u sinovijalnoj ovojnici osteoartritičnog kuka u odnosu na kontrolnu skupinu – pacijente s prijelom vrata bedrene kosti, bez osteoartritisa.

#### **2.1.2. Sekundarni ciljevi rada**

Sekundarni ciljevi rada su:

1. Analizirati razliku u distribuciji sindekana-1, -2 i -4, egzostozina-1 i -2 te NDST-1 i -2 u histološkim slojevima sinovijalne ovojnice kuka (intima, subintima, krvne žile).
2. Utvrditi moguću korelaciju između stupnja izražaja sindekana-1, -2 i -4, egzostozina-1 i -2 te NDST-1 i -2 i stupnja sinovitisa izraženog standardnim histološkim stupnjevanjem po Krennu.
3. Utvrditi moguću korelaciju između stupnja izražaja sindekana-1, -2 i -4, egzostozina -1 i -2 te NDST -1 i -2 u odnosu na kliničke (WOMAC bodovanje, HHS bodovanje, VAS) i radiološke (Kellgren-Lawrence bodovanje) pokazatelje.

### **2.2. Hipoteze rada**

1. Ekspresija svih istraživanih molekula biti će signifikantno povećana kod svih istraživanih molekula (sindekan-1, -2 i -4, egzostozin-1 i -2, NDST-1 i -2) u sinovijalnoj membrani bolesnika s OA u usporedbi s kontrolama.

2. Zapaženo povećanje ekspresije biti će izraženije u istraživanoj podskupini s većim histološkim stupnjem sinovitisa u odnosu na skupinu s manjim histološkim stupnjem sinovitisa.

3. Povećana ekspresija istraživanih molekula bit će izraženija u intimi sinovijalne membrane u odnosu na subintimu.

4. Povećana ekspresija istraživanih molekula biti će u pozitivnoj korelaciji s kliničkim pokazateljima izražajnije bolesti.

5. Postoji jasna pozitivna korelacija u stupnju izraženosti sindekana u odnosu na egzostozine i sulfo-transferaze.



### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. Ispitanici

Svi ispitanici uključeni u studiju bili su podvrgnuti operaciji artroplastike kuka. U istraživanje smo uključili 24 ispitanika u istraživanoj skupini (osteoartritis) i 10 u kontrolnoj skupini (prijelom vrata bedrene kosti). U istraživanoj populaciji bolesnika s OA kuka indicaciju za kirurški zahvat postavili smo na temelju uobičajenih kliničkih (neuspješno konzervativno liječenje uz perzistentnu bol i funkcionalna ograničenja) i radioloških kriterija za zamjenu kuka. Kriteriji isključenja za skupinu osteoartritisa bili su: signifikantna displazija kuka, povijest prijeloma ili infekcije kuka i povijest reumatskih stanja. Kontrolnu skupinu činili su bolesnici s indicacijom za artroplastiku kuka zbog akutnog prijeloma vrata bedrene kosti, pod uvjetom da nisu imali radiološke znakove OA (Kellgren-Lawrence bodovanje  $>2$ ) niti dokumentirane prethodne infektivne ili reumatske bolesti kuka. Skupine osteoartritisa ocjenjivali smo prema radiološkoj Kellgren-Lawrence (K-L) ljestvici ocjenjivanja intenziteta OA kuka i kliničkim bodovnim ljestvicama:

- bodovanje po Harrisu za procjenu disabiliteta uslijed bolesti ili ozljede kuka (engl. *Harris Hip Score* (HHS)) (Slika 5),
- bodovanje subjektivne izraženosti osteoartritisa po metodi sveučilišta Western Ontario i McMaster (engl. *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index* (WOMAC)) (Slika 6),
- vizualno-analognu skalu za subjektivnu procjenu intenziteta boli (eng. *The Visual Analogue Scale*).

Dob, spol i indeks tjelesne mase (engl. *body-mass index*, BMI) dokumentirali smo za sve pacijente.

<b>BODOVANJE TEGOBA U KUKU PO HARRISU</b>			
<b>BOL</b>		<b>HODANJE PO STEPENICAMA</b>	
Nema je ili je zanemariva	44	Normalno, bez korištenja rukohvata	4
Blaga, povremena, ne ograničava u aktivnostima	40	Normalno, uz korištenje rukohvata	2
Blaga, povremeno umjerena bol, pri nekim aktivnostima	30	Bilo kako	1
Umjerena ali tolerantna bol koja utječe na neke aktivnosti	20	Ne može	0
Značajna bol, značajno ograničenje aktivnosti	10	<b>OBUVANJE CIPELA I ČARAPA</b>	
Onesposobljujuća bol, bol i u krevetu, onemogućava ustajanje	0	Lako	4
<b>ŠEPANJE</b>		Otežano	2
Nema ga	11	Ne može	0
Blago	8	<b>DEFORMITET</b>	
Umjereno	5	< 30 stupnjeva fleksijske kontrakture DA- NE	
Izraženo	0	< 10 stupnjeva abdukcije DA-NE	
<b>POMAGALO</b>		< 10 stupnjeva unutarnje rotacije DA-NE	
Ne koristi	11	Razlika u duljini nogu > 3,2cm DA-NE	
Štap za duge šetnje	7	Sva četiri odgovora DA	4
Štap većinu vremena	5	Jedan do tri odgovora DA	0
Jedna štaka	3	<b>OPSEG POKRETA U KUKU</b>	
Dva štapa	2	Fleksija (norm. 140°)	
Dvije štake ili ne može hodati	0	Abdukcija (norm. 40°)	
<b>HODNA PRUGA</b>		Adukcija (norm. 40°)	
Neograničena	11	Vanjska rotacija (norm. 40°)	
Šest blokova	8	Unutarnja rotacija (norm. 40°)	
Dva do tri bloka	5	Zbroj 211° - 300°	5
Samo po kući	2	Zbroj 161° - 210°	4
Samo u krevetu ili stolici	0	Zbroj 101° - 160°	3
<b>SJEDENJE</b>		Zbroj 61° - 100°	2
Udobno u normalnoj stolici kroz sat vremena	5	Zbroj 31° - 60°	1
U povišenoj stolici do pola sata	3	Zbroj 0° - 30°	0
Ne može udobno sjediti	0	<b>UKUPNO (0-100)</b>	
<b>ULAZAK U VOZILO JAVNOG PRJEVOZA</b>		(< 70 loše, 70-80 umjereno, 80-90 dobro, 90-100 odlično)	
Može	1		
Ne može	0		

**Slika 5.** Upitnik za provođenje bodovanja tegoba u kuku po Harrisu. Maksimalni rezultat je 100, manji rezultat upućuje na lošije kliničko stanje bolesnika (ilustracija: M. Rošin).

<b>WOMAC INDEKS OSTEOARTRITISA KUKA</b> (sveučilišta Western Ontario & McMaster)							
IZRAŽENOST TEGOBA							
0 = nimalo, 1= malo, 2 = umjereno, 3 = vrlo prisutno, 4 = ekstremno							
<b>BOL</b>	1.	HODANJE	0	1	2	3	4
	2.	PENJANJE UZ STEPENICE	0	1	2	3	4
	3.	PO NOĆI	0	1	2	3	4
	4.	TIJEKOM ODMORA	0	1	2	3	4
	5.	PRI OPTEREĆENJU	0	1	2	3	4
<b>UKOČENOST</b>	1.	UJUTRO	0	1	2	3	4
	2.	POJAVLJUJE SE TIJEKOM DANA	0	1	2	3	4
<b>FUNKCIJE</b>	1.	SPUŠTANJE NIZ STEPENICE	0	1	2	3	4
	2.	PENJANJE UZ STEPENICE	0	1	2	3	4
	3.	USTAJANJE IZ SJEDEĆEG POLOŽAJA	0	1	2	3	4
	4.	STAJANJE	0	1	2	3	4
	5.	PRIGIBANJE DO PODA	0	1	2	3	4
	6.	HODANJE PO RAVNOM	0	1	2	3	4
	7.	ULAZAK I IZLAZAK IZ AUTOMOBILA	0	1	2	3	4
	8.	KUPOVINA	0	1	2	3	4
	9.	OBUVANJE ČARAPA	0	1	2	3	4
	10.	LEŽANJE U KREVETU	0	1	2	3	4
	11.	IZUVANJE ČARAPA	0	1	2	3	4
	12.	USTAJANJE IZ KREVETA	0	1	2	3	4
	13.	ULAZAK I IZLAZAK IZ KADE	0	1	2	3	4
	14.	SJEDENJE	0	1	2	3	4
	15.	SJEDANJE I USTAJANJE SA ZAHODA	0	1	2	3	4
	16.	TEŽI KUĆANSKI POSLOVI	0	1	2	3	4
	17.	LAGANIJI KUĆANSKI POSLOVI	0	1	2	3	4
<b>ZBROJ</b>							
<b>REZULTAT = ZBROJ / 96 = _____ %</b> (viši postotak je lošiji)							

**Slika 6.** Upitnik za provođenje bodovanja indeksa osteoartritisa kuka po metodologiji razvijenoj na sveučilištima Western Ontario i McMaster. Rezultat je izražen u postotku, maksimum je 100%, veći rezultat upućuje na lošije kliničko stanje bolesnika (ilustracija: M. Rošin).

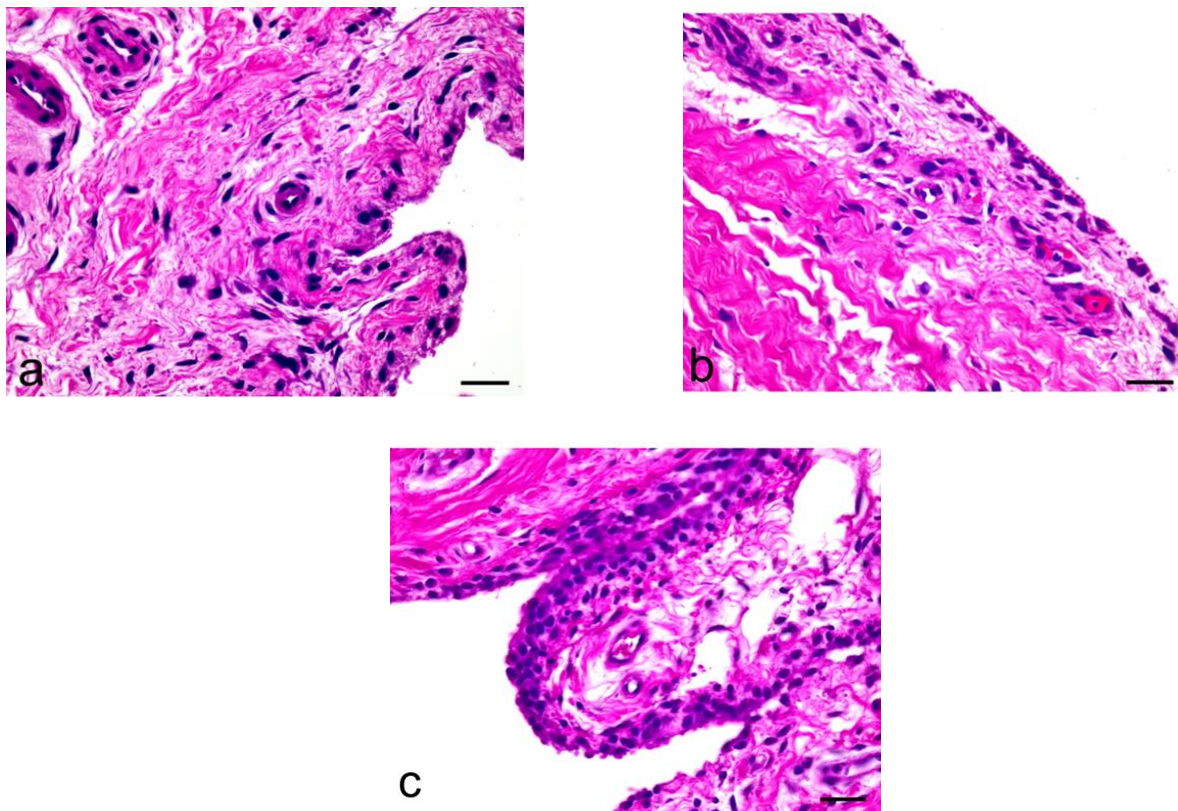
## 3.2. Postupci

### 3.2.1. Kirurški postupci

Svi kirurški zahvati (potpuna ili djelomična zamjena kuka, bilo za liječenje OA ili prijeloma vrata bedrene kosti) izvedeni su u spinalnoj anesteziji posterolateralnim pristupom kuka s incizijom stražnje kapsule. Nakon ekstrakcije glave i dijela vrata bedrene kosti, uzorkovali smo sinovijalno tkivo s donjeg dijela vrata bedrene kosti, uz glavu bedrene kosti.

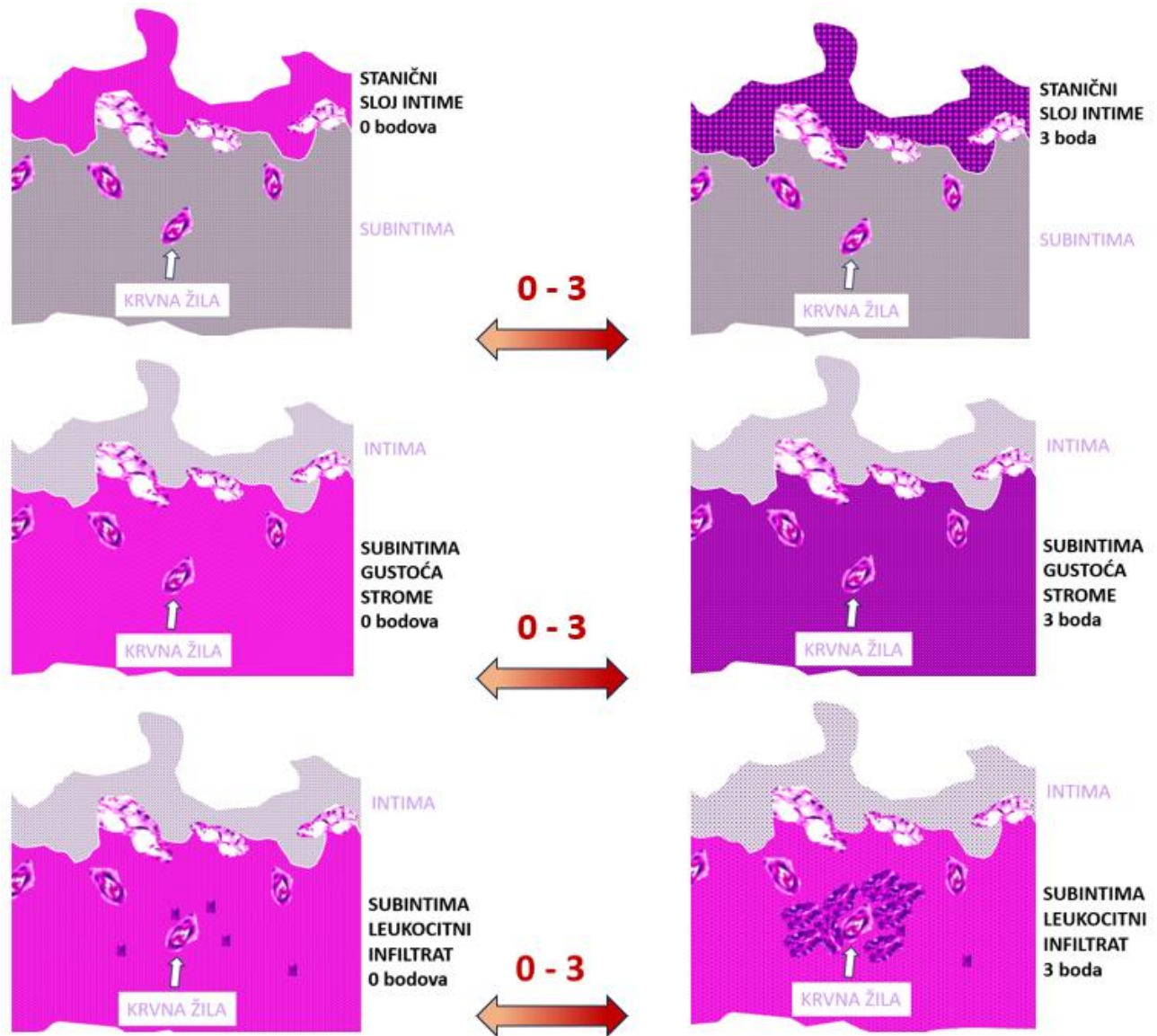
### 3.2.2. Histološki postupci

Uzorke smo pohranjivali u spremnike s formalinskom otopinom i poslali u Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu na histološku analizu. Tkiva smo fiksirali formalinom, umetnuli u parafin i izrezali na dijelove debljine 5  $\mu\text{m}$ . Svaki deseti presjek obojili smo hematoksilinom i eozinom (Slika 7).



**Slika 7.** Sinovijalna ovojnica: kontrolnih bolesnika (bez osteoartritisa) (a), bolesnika s osteoartritisom i blagim sinovitisom (b) i bolesnika s osteoartritisom i umjerenim sinovitisom (c). Bojenje hematoksilinom i eozinom. Povećanje  $\times 40$ , mjerna ljestvica = 40  $\mu\text{m}$ . (Fotografije histoloških preparata: K. Vukojević).

Histološki stupanj inflamacije sinovijalne ovojnice ocijenjen je metodologijom prema Krennu (93), procjenjujući tri značajke kroničnog sinovitisa (povećanje staničnog sloja intime (sinoviocita) 0-3, stanična gustoća strome subintime 0-3, leukocitni infiltrat subintime 0-3) (Slika 8). Nakon inicijalne histološke analize prikupljenih uzoraka, podijelili smo skupinu ispitanika s osteoartritisom u dvije podskupine, na temelju procijenjenog histološkog bodovanja sinovitisa prema Krennu – jednu skupinu činili su bolesnici sa bodovanjem sinovitisa 0-2, a drugu skupinu činili su bolesnici s bodovanjem sinovitisa  $\geq 3$ .



**Slika 8.** Histološko bodovanje sinovitisa po Krennu (93) - shematski prikaz. Boduje se povećanje staničnog sloja intime (sinoviocita) 0-3, stanična gustoća strome subintime 0-3 i leukocitni infiltrat subintime 0-3 (ilustracija: M. Rošin) .

### 3.2.3 Imunofluorescencijski postupci

Za imunofluorescencijsko bojanje, rezovi su bili obrađeni deparafinizacijom u ksilenu pa potom rehidracijom u stupnjevano razrijeđenom etanolu i destiliranoj vodi. Rezovi su potom zagrijani u citratnom puferu (pH 6,0) kroz 30 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, stakalca su isprana fiziološkom otopinom puferiranom fosfatom (PBS) i obložena puferom za blokiranje (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) tijekom 30 minuta. Sljedeći korak je bio inkubacija preko noći na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori s primarnim protutijelima. Sljedećeg dana stakalca su isprana u PBS-u, a nakon toga su primijenjena odgovarajuća sekundarna protutijela tijekom jednog sata (Tablica 1). Nakon ispiranja u PBS-u, slijedilo je bojanje s DAPI (4'-diamidino-2-fenilindol), postavljanje uzoraka u Immu-mount i pokrivanje stakalcima. Stakalca smo pregledali pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX61, Tokio, Japan) i fotografirali digitalnom kamerom (Nikon, Tokio, Japan) s NIS-Elements F programom.

Kako bismo analizirali ekspresiju SDC1, SDC2, SDC4, EXT1, EXT2, NDST1 i NDST2, uzeli smo deset nepreklapajućih polja po uzorku, korištenjem objektiva povećanja od 40x. Kako bismo odredili signal imunofluorescencije promatranih proteina, izračunali smo postotak površine koji je signal zauzima na slikama. Korištenjem Lasso alata u Adobe Photoshopu (Adobe, San Jose, CA, USA), na svim je slikama površinski sloj stanica (intima) odvojen od podležućeg tkiva (subintima). Za obradu slika korišten je računalni program Softver ImageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD), s ciljem izolacije pozitivnog signala.

**Tablica 1.** Pregled korištenih primarnih i sekundarnih protutijela.

	<b>Protutijela</b>	<b>Porijeklo</b>	<b>Šifra</b>	<b>Dilucija</b>	<b>Proizvođač</b>
	anti-Sdc1	miš	ab34164	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	anti-Sdc2	kunić	ab191062	1:200	Abcam, Cambridge, UK
	anti-Sdc4	kunić	ab24511	1:100	Abcam, Cambridge, UK
<b>Primarna</b>	anti-EXT1	kunić	ab126305	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-EXT2	kunić	ab102843	1:50	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-NDST1	kunić	ab151141	1:50	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-NDST2	kunić	ab151141	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Rhodamine Red™-X Anti-Mouse IgG	magarac	715-295- 151	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA
<b>Sekundarna</b>	Alexa Fluor®488 Anti-Rabbit IgG	magarac	711-545- 152	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA

### 3.2.4. Statistička raščlamba

Statističku raščlambu proveli smo koristeći računalni program GraphPad Prism verzije 9.0.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

Za određivanje statističke značajnosti razlike u imunohistokemijskoj ekspresiji analiziranih molekula između analiziranih skupina uzoraka koristili smo dvosmjernu analizu varijance (ANOVA) s Tukeyjevim *post hoc* testom. Statističku značajnost bila je postavljena na  $p < 0,05$ .

Za određivanje povezanosti radioloških i kliničkih pokazatelja izraženosti osteoartritisa s imunohistološkom ekspresijom analiziranih molekula izračunali smo Kendallov koeficijent korelacije. Statističku značajnost postavili smo na  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Prikaz istraživanih skupina

Nakon standardnog histološkog bojenja podijelili smo uzorke OA ispitanika u dvije grupe, temeljem intenziteta sinovitisisa po histopatološkoj Krennovoj gradaciji: u OA grupu s nižim bodovanjem sinovitisisa (rezultat 0-2) svrstali smo 10 ispitanika (prosječni rezultat 1,33), a u grupu s višim bodovanjem sinovitisisa (rezultat  $\geq 3$ ) svrstali smo 14 ispitanika (prosječna gradacija 3,46). OA ispitanici svi zajedno imali su prosječno bodovanje sinovitisisa 2,59 (raspon 0-5) što je nešto više nego kod bodovanja za OA u originalnom Krennovom radu, ali sa sličnom distribucijom među grupama (93). U kontrolnoj skupini sa 10 ispitanika prosječno bodovanje sinovitisisa po Krennu bilo je 0,62 (raspon 0-1). Detaljnje karakteristike svih skupina ispitanika navedene su u tablici 2 (Tablica 2).

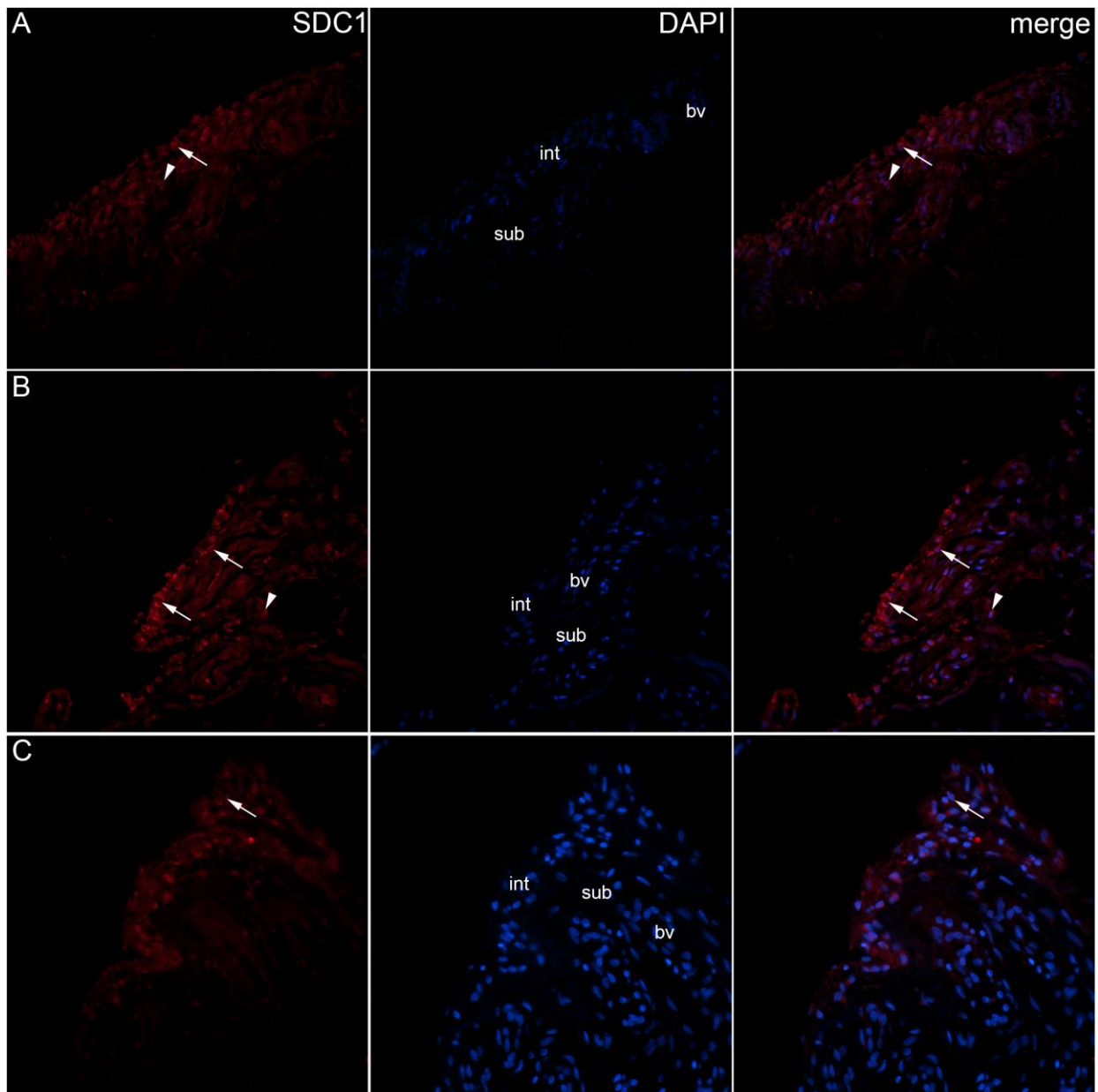
**Tablica 2.** Karakteristike ispitanika po skupinama. OA (osteoartritis), BMI (indeks tjelesne mase), K-L grade (radiološko bodovanje osteoartritisa kuka po Kellgren–Lawrence metodi), HHS (Harris Hip Score, bodovanje po Harrisu za procjenu disabiliteta uslijed bolesti ili ozljede kuka), VAS (vizualno-analogni skala za subjektivnu procjenu intenziteta boli), WOMAC (The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index - bodovanje izraženosti osteoartritisa po metodi sveučilišta Western Ontario i McMaster), \*  $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test.

	<b>Kontrolna skupina</b> n=10	<b>OA skupina – bodovanje sinovitisa 0-2</b> n=10	<b>OA skupina - bodovanje sinovitisa <math>\geq 3</math></b> n=14	<b>* p vrijednost</b>
<b>Dob</b> u godinama (prosjek, raspon)	72,9 (64-77)	73,3 (70-82)	69,9 (58-82)	0.884
<b>BMI</b> (prosjek, raspon)	25.2 (22,1-29,8)	28,1 (25,2-35,4)	27,0 (24,3-34,0)	0.226
<b>K-L</b> (prosjek, raspon)	0.5 (0-1)	3 (2-4)	3,3 (2-4)	<0.0001
<b>Krenn bodovanje</b> (prosjek, raspon)	0,62 (0-1)	1,33 (0-2)	3,46 (3-5)	<0.0001
<b>HHS</b> (prosjek, raspon)	-	38,2 (20-49)	46,3 (18-67)	0.272
<b>VAS</b> (prosjek, raspon)	-	5,7 (4-7)	6,4 (3-8)	0.784
<b>WOMAC</b> (prosjek, raspon)	-	47,3 (39,1-58,0)	49,1 (28,1-72,7)	0.918

## 4.2 Imunohistokemijski rezultati

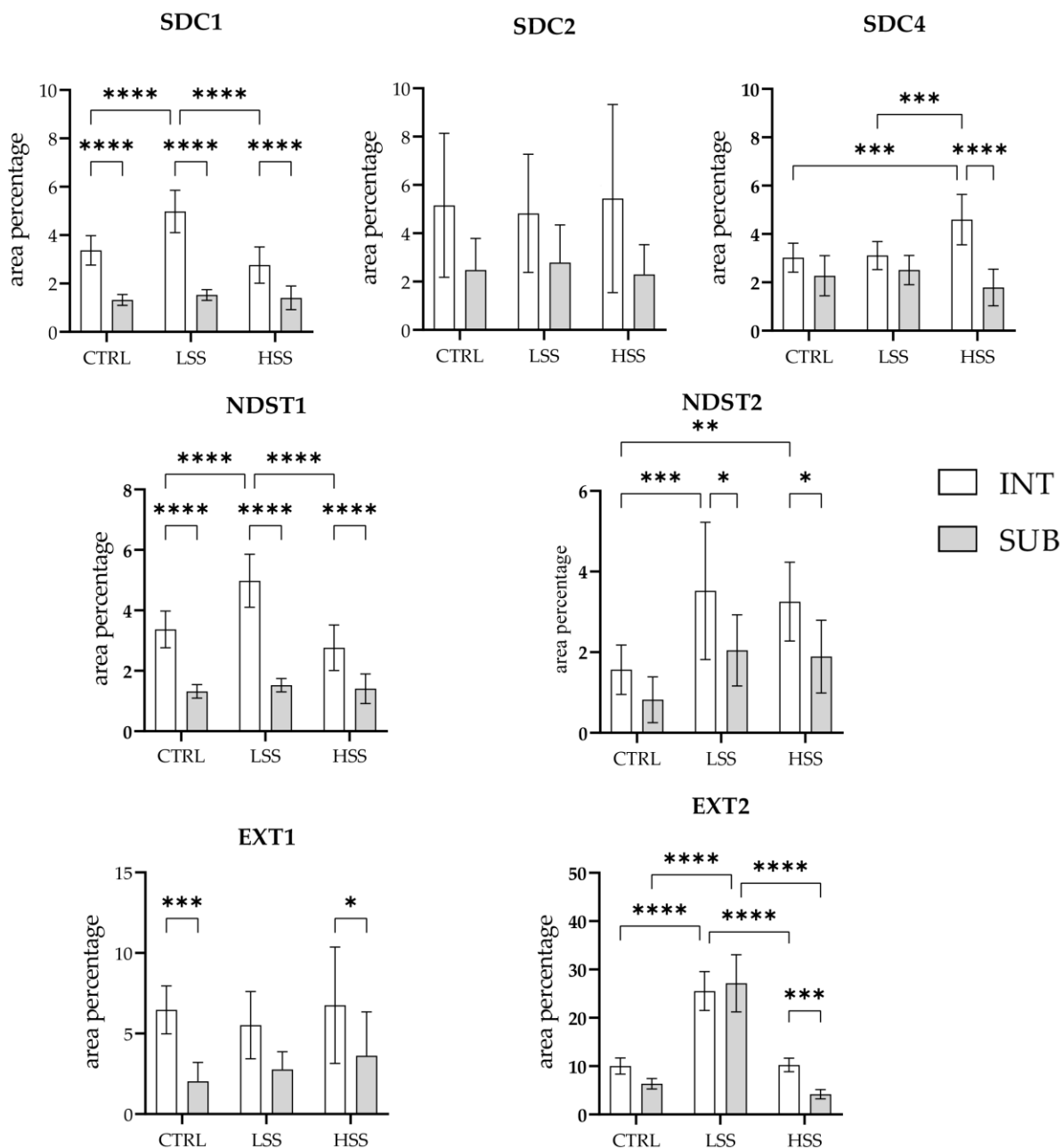
### 4.2.1. Sindekan 1

Analizirajući uzorak ekspresije SDC1 u sinovijalnim ovojnica pacijenata s OA kuka i u kontrolnoj skupini, pozitivne stanice pronađene su u intimi i subintimi svih analiziranih skupina (Slika 9). Nije bilo značajne reaktivnosti u subintimalnim krvnim žilama. Statistički, intima je pokazala veću imunoekspresiju SDC1 ( $p < 0,0001$ ), nego subintima svih analiziranih skupina. Intima skupine s niskim rezultatom sinovitisa imala je veću pozitivnost ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi s kontrolnom i skupinom s višim rezultatom sinovitisa (Slika 10).



**Slika 9.** Imunoekspresija sindekana-1 (SDC1) u sinovijalnoj membrani bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrola), B – sinovija kuka bolesnika s niskim

rezultatom sinovitisa (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ), int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. SDC1 pozitivne stanice (crveni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. SDC1 spojen s DAPI nuklearnim bojanjem prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

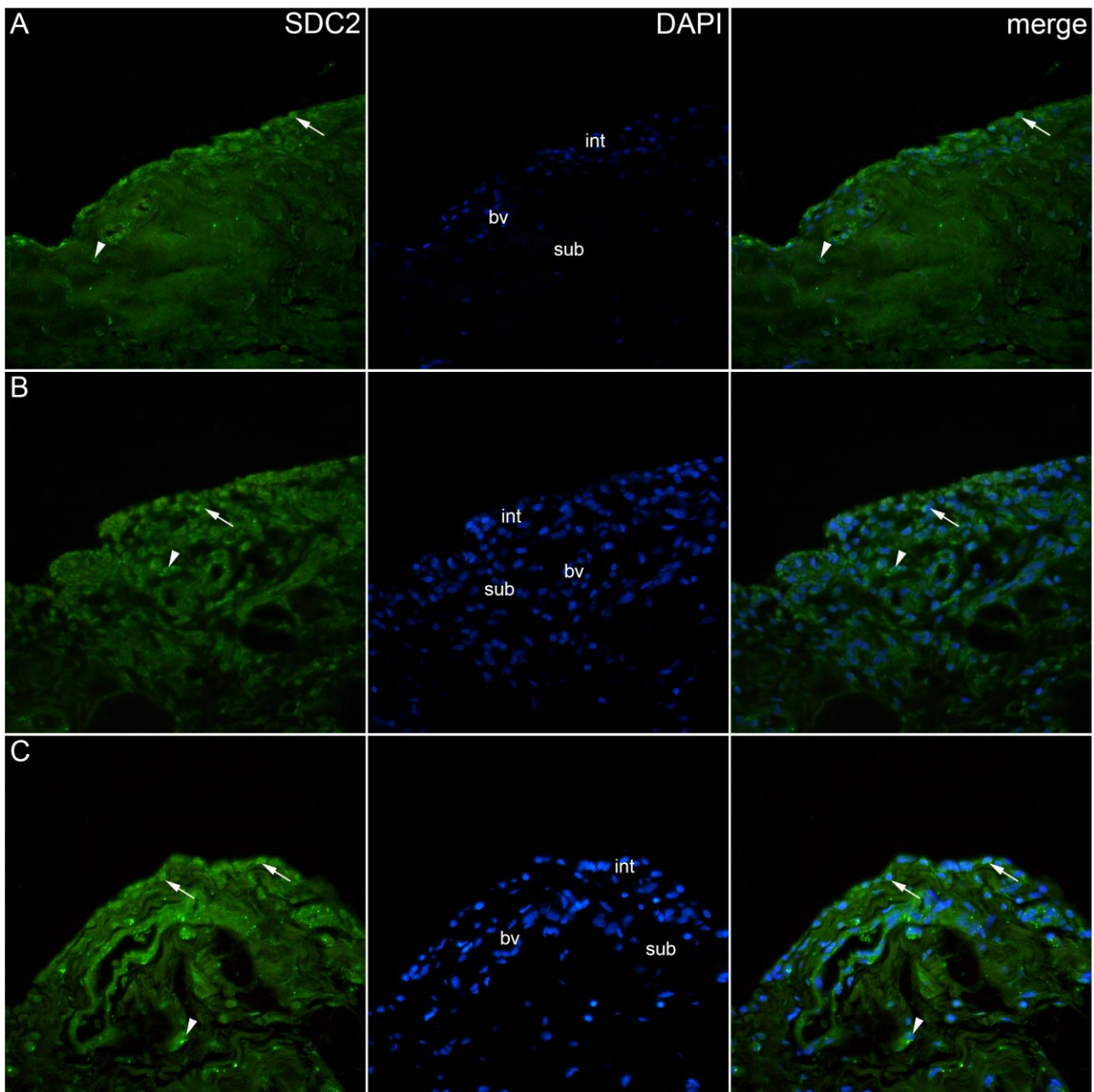


**Slika 10.** Statističke analize imunoekspresije proteina u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). INT – intima, SUB – subintima, CTRL – kontrole, LSS – nizak rezultat sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), HSS – viši rezultat sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ). Sve

analize su provedene korištenjem dvosmjerne ANOVA analize s Tukeyjevim posthoc testom. Stupci grafikona predstavljaju srednji postotak površine signala imunofluorescencije analiziranih proteina, dok stupci pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju. Značajne razlike označene su zvjezdicama: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### **4.2.2. Sindekan 2**

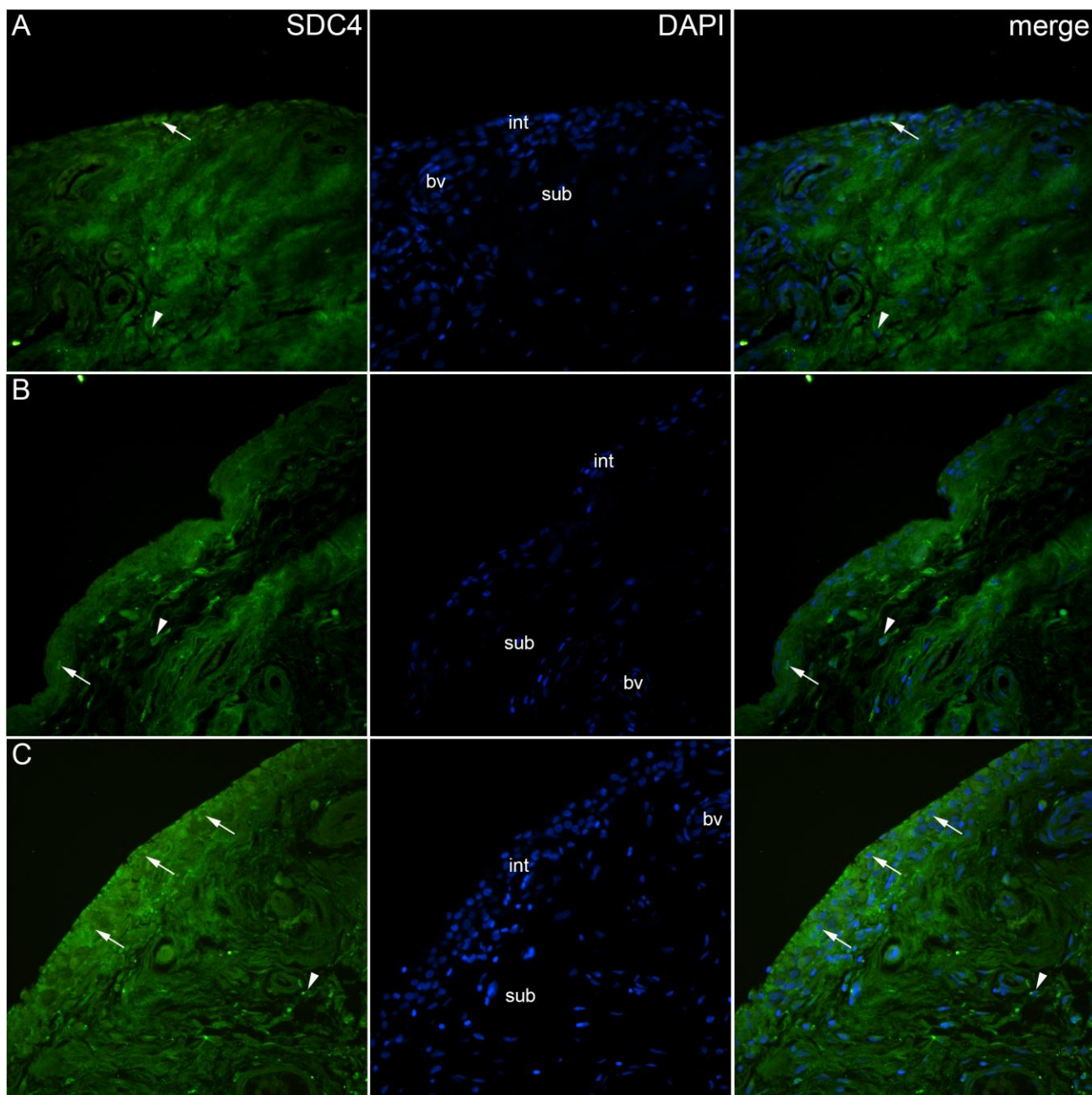
Sindekan-2 je pokazao pozitivnost u intimi i subintimi sinovijalne membrane bolesnika s OA kuka i zdravih kontrola (Slika 11). Pozitivnost SDC2 mogla se povremeno vidjeti u nekim stanicama subintimalnih krvnih žila. Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji SDC2 između bilo koje od analiziranih skupina (Slika 10).



**Slika 11.** Imunoekspresija sindekana-2 (SDC2) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrola), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. SDC2 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). Pozitivnost SDC2 može se vidjeti u nekim stanicama subintimalnih krvnih žila (A,B,C). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. SDC2 spojen s DAPI nuklearnim bojanjem prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

### 4.2.3. Sindekan 4

Pri analizi ekspresije sindekana-4 (SD4) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s OA kuka i zdravih kontrola, uočili smo pozitivne stanice u intimi i subintimi svih analiziranih skupina (Slika 12). Nije bilo značajne SDC4 imunoreaktivnosti u krvnim žilama. Intima skupine s višim rezultatom sinovitisa pokazala je značajno veću izraženost u usporedbi sa subintimom i intimom ostalih analiziranih skupina ( $p < 0,0001$ ) (Slika 10).



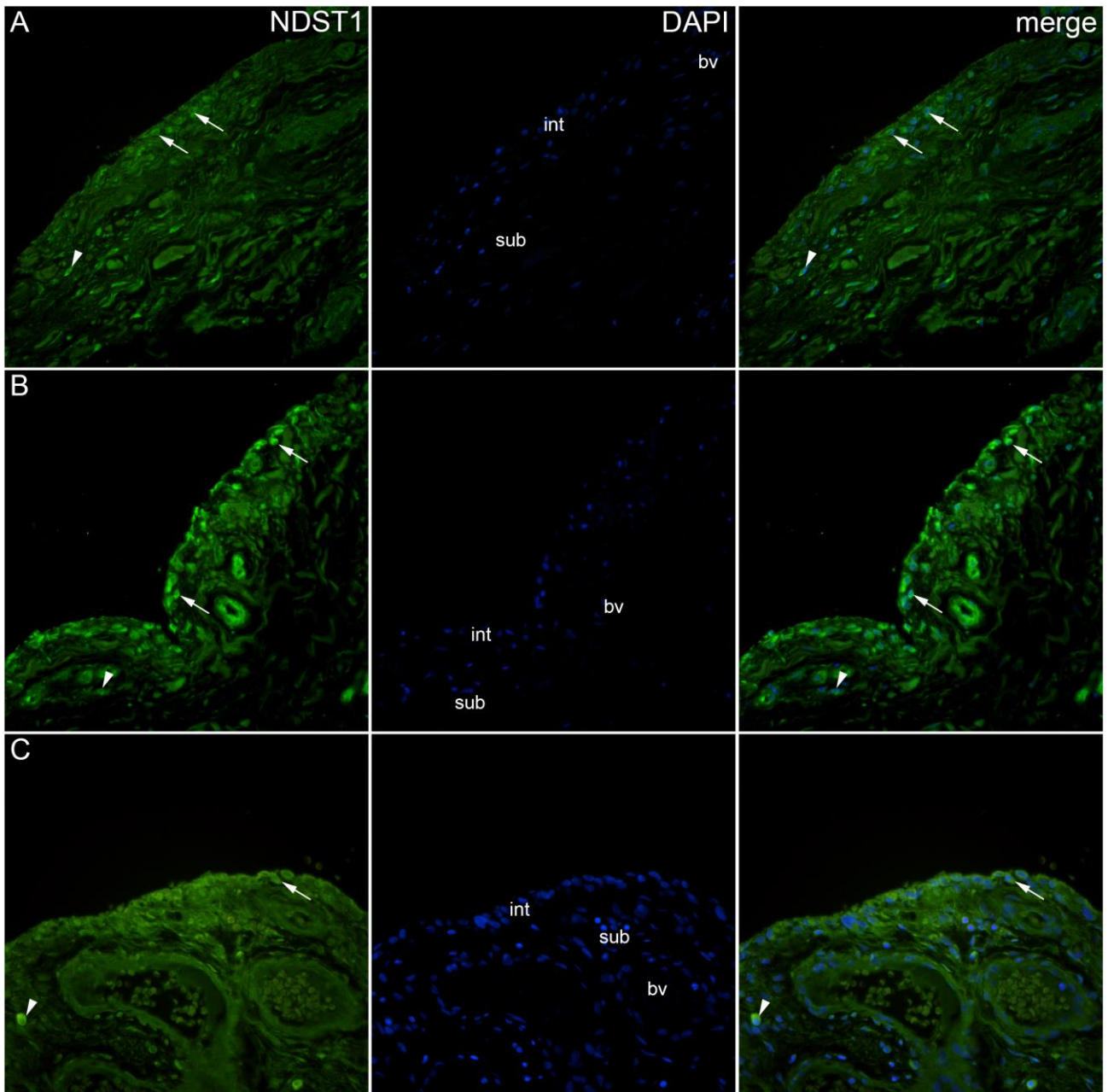
**Slika 12.** Imunoekspresija sindekana-4 (SDC4) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrola), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom

sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. SDC4 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. SDC4 spojen s DAPI nuklearnim bojanjem prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

#### **4.2.4. NDST 1**

Imunoekspresija NDST1 opažena je u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s OA kuka (Slika 13). NDST1 pozitivne stanice viđene su u intimi i subintimi svih analiziranih skupina. Snažna pozitivnost primijećena je u subintimalnim krvnim žilama skupine s blagim sinovitisom. Statistički, intima je pokazala veću imunoekspresiju ( $p < 0,0001$ ) od subintime svih analiziranih skupina. Intima skupine s blagim sinovitisom imala je veću pozitivnost ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom s višim rezultatom sinovitisa (Slika 10).

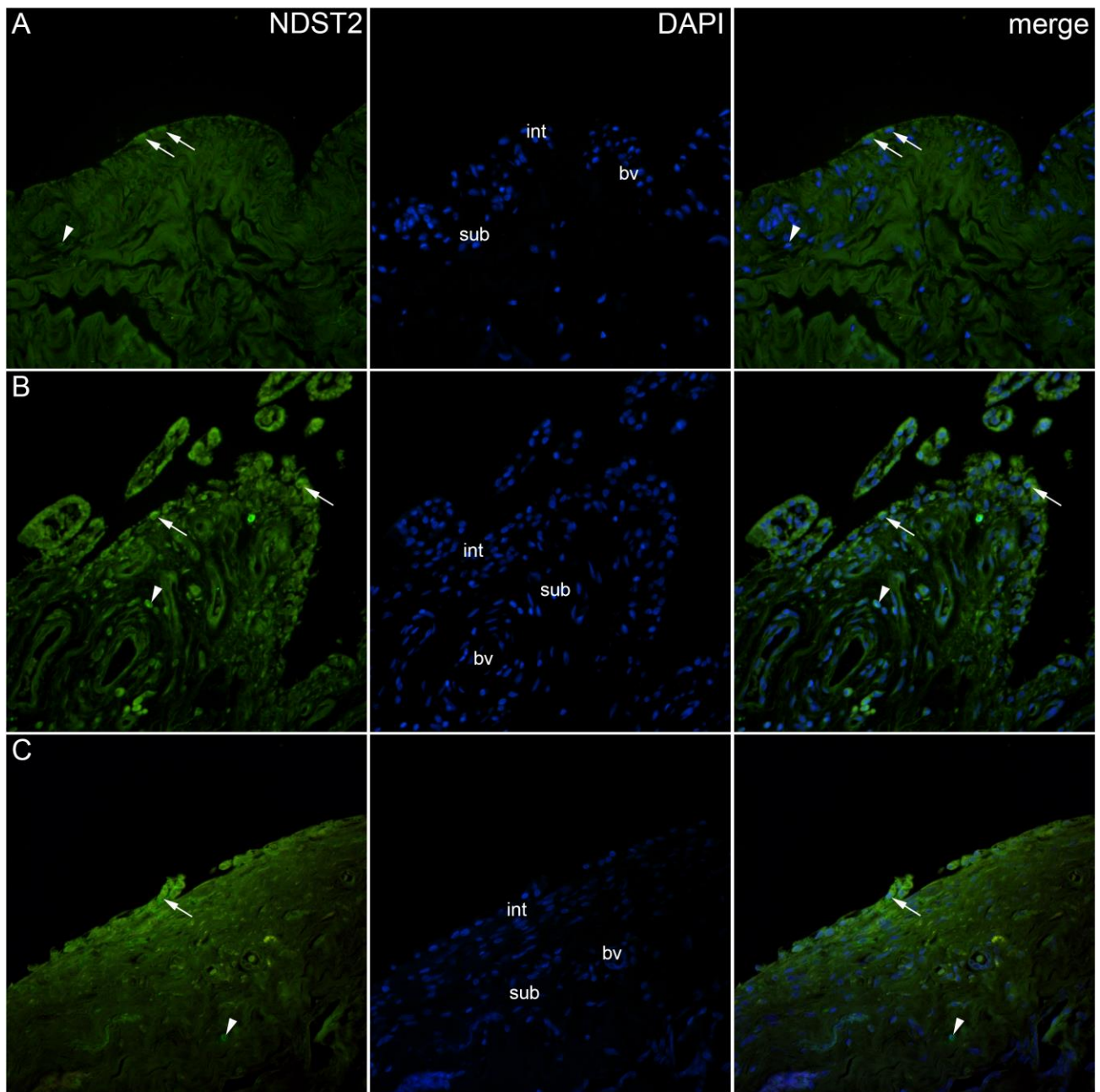




**Slika 13.** Imunoekspresija N-deacetilaza/N-sulfotransferaze-1 (NDST1) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrola), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. NDST1 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). Snažna pozitivnost može se primijetiti u subintimalnim krvnim žilama blage OA skupine (B). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. NDST1 spojen s nuklearnim bojenjem DAPI prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

#### 4.2.5. NDST2

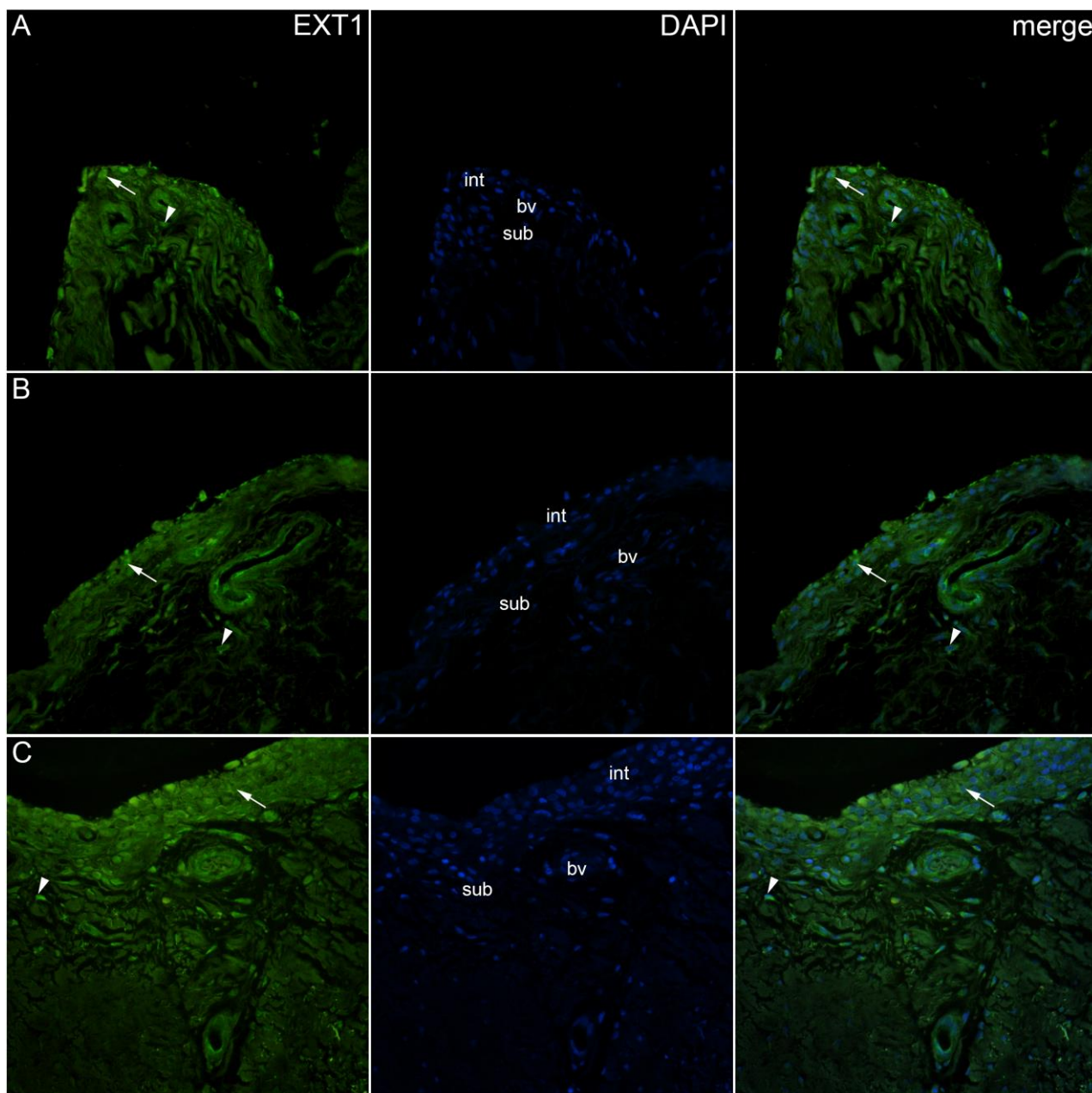
NDST2 pokazala je pozitivnu ekspresiju u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s OA kuka i kontrolne skupine (Slika 14). NDST2 pozitivne stanice nađene su u intimi i subintimi svih analiziranih skupina. Međutim, u usporedbi s NDST1 nije bilo značajne reaktivnosti u krvnim žilama. Statistički gledano, ekspresija NDST2 bila je značajno niža u sinovijalnim ovojnicama kontrolnih skupina u usporedbi sa skupinama s niskim rezultatom sinovitisa i višim rezultatom sinovitisa ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,006$ ). Intima obiju OA skupina pokazala je značajno veću pozitivnost u odnosu na subintimu ( $p = 0,022$ , odnosno  $p = 0,043$ ) (Slika 10).



**Slika 14.** Imunoekspresija N-deacetilaza/N-sulfotransferaze- 2 (NDST2) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrole), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. NDST2 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. NDST2 spojen s nuklearnim bojenjem DAPI prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

#### 4.2.6. Egzostozin-1

Uzorak ekspresije egzostozina-1 (EXT1) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s OA kuka analiziran je i uspoređen sa zdravim kontrolama (Slika 15). EXT1 pozitivne stanice videne su u intimi i subintimi svih analiziranih skupina. Endotelne stanice subintimalnih krvnih žila pokazale su snažnu EXT1 pozitivnost, osobito u pacijenata s OA. Nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji EXT1 između analiziranih skupina. Međutim, intima kontrolne i OA skupine s višim rezultatom sinovitisa pokazala je veću pozitivnost od subintime ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,029$ ) (Slika 10).

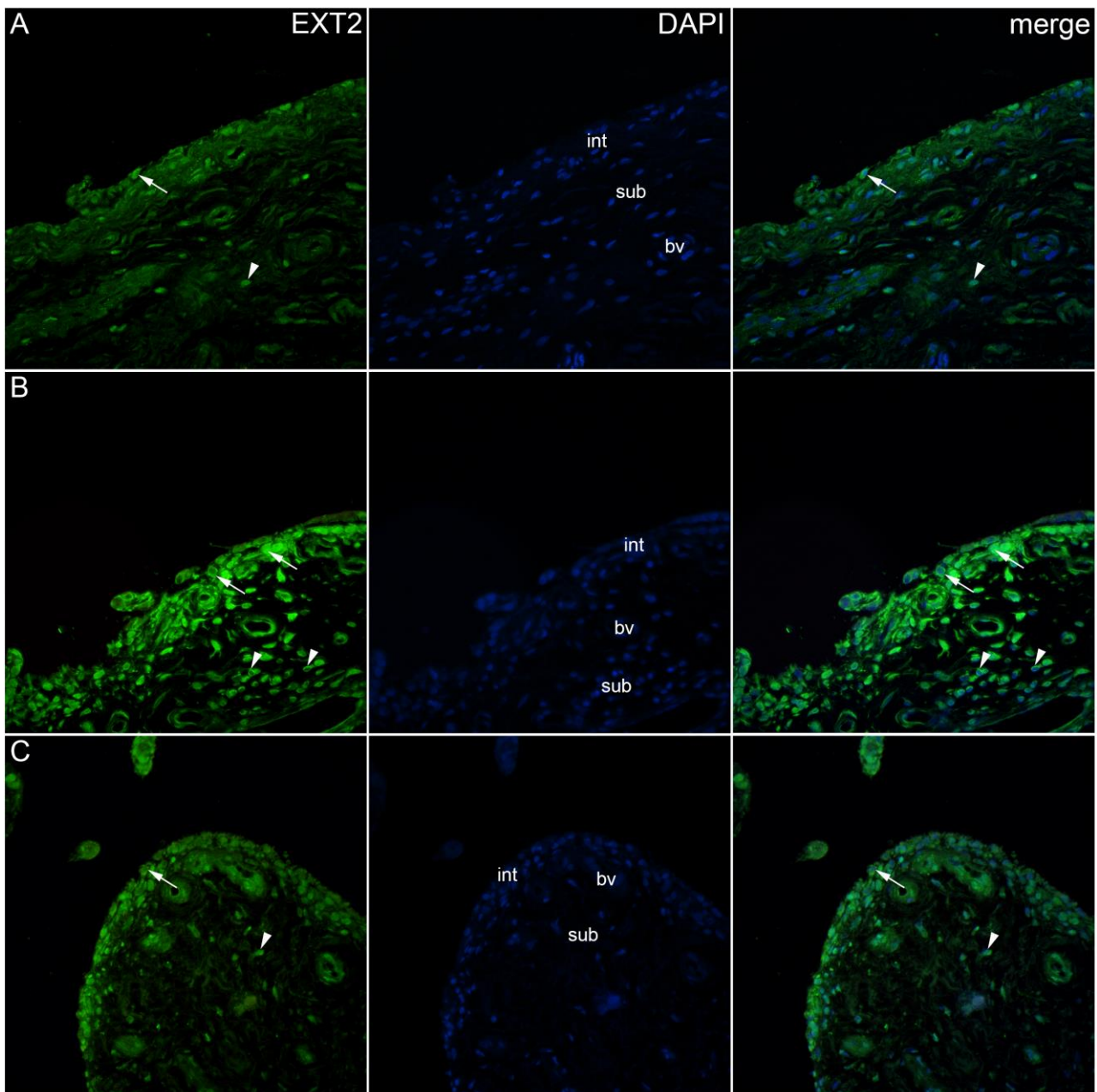


**Slika 15.** Imunoekspresija egzostozina-1 (EXT1) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrolne), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom

sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. EXT1 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). Endotelne stanice subintimalnih krvnih žila pokazuju jaku EXT1 pozitivnost, osobito u bolesnika s OA (B,C). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. EXT1 spojen s DAPI nuklearnim bojanjem prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

#### **4.2.7. Egzostozin-2**

Imunoekspresija egzostozina-2 (EXT2) pronađena je u sinovijalnoj membrani pacijenata s OA kuka i zdravih kontrola (Slika 16). Intima i subintima svih analiziranih skupina sadržavale su EXT2 pozitivne stanice. Snažna pozitivnost primijećena je u subintimalnim krvnim žilama skupine s višim rezultatom sinovitisa. Statistička analiza pokazala je značajno veću imunoekspresiju EXT2 u intimi i subintimi skupine s niskim rezultatom sinovitisa ( $p < 0,0001$ ), u usporedbi s drugim skupinama. U slučaju skupine s višim rezultatom sinovitisa, intima je pokazala značajno veću pozitivnost od subintime ( $p = 0,001$ ) (Slika 10).

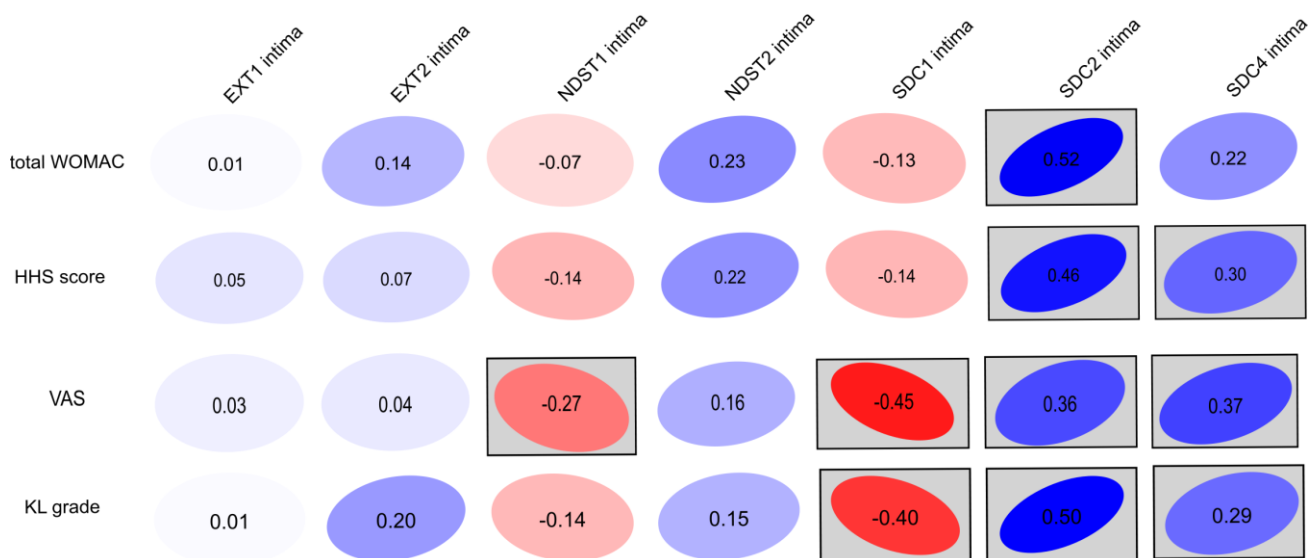


**Slika 16.** Imunoekspresija egzostozina-2 (EXT2) u sinovijalnoj ovojnici bolesnika s osteoartritisom kuka (OA). A – sinovija kuka bolesnika bez OA (kontrola), B – sinovija kuka bolesnika s niskim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat 0-2), C – sinovija kuka bolesnika s višim rezultatom sinovitisa OA (Krenn rezultat  $\geq 3$ ); int – intima, sub – subintima, bv – krvna žila. EXT2 pozitivne stanice (zeleni signal) mogu se vidjeti u intimi (strelice) i subintimi (vrhovi strelica) svih analiziranih skupina (A,B,C). Snažna pozitivnost može se primijetiti u subintimalnim krvnim žilama blage OA skupine (B). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boji sve stanične jezgre u plavo. EXT2 spojen s DAPI nuklearnim bojanjem prikazan je u krajnjem desnom stupcu (spojene slike) (preneseno iz: Rošin i sur. 2024. (94)).

### 4.3. Korelacija imunohistokemijskih rezultata s kliničkim i radiološkim pokazateljima izraženosti osteoartritisa

Odnos imunohistokemijskih rezultata s prikupljenim radiološkim (stupnjevanje osteoartritisa kuka po Kellgrenu i Lawrenceu) i kliničkim (bodovanje po Harrisu za procjenu disabiliteta uslijed bolesti ili ozljede kuka, WOMAC bodovanje subjektivne izraženosti osteoartritisa (po metodi Western Ontario i McMaster sveučilišta), vizualno-analogni ljestvica boli) pokazateljima bolesti kod ispitanika s osteoartritisom kuka prikazali smo korelacijskim testovima, odvojeno za intimu i subintimu sinovijalne ovojnice, za sve testirane molekularne posrednike. Zbog ujednačavanja prikaza rezultata svih prikazanih kliničkih testova po principu “veći rezultat, lošije kliničko stanje”, za Harrisovo bodovanje smo koristili vrijednost 100-rezultat bodovanja.

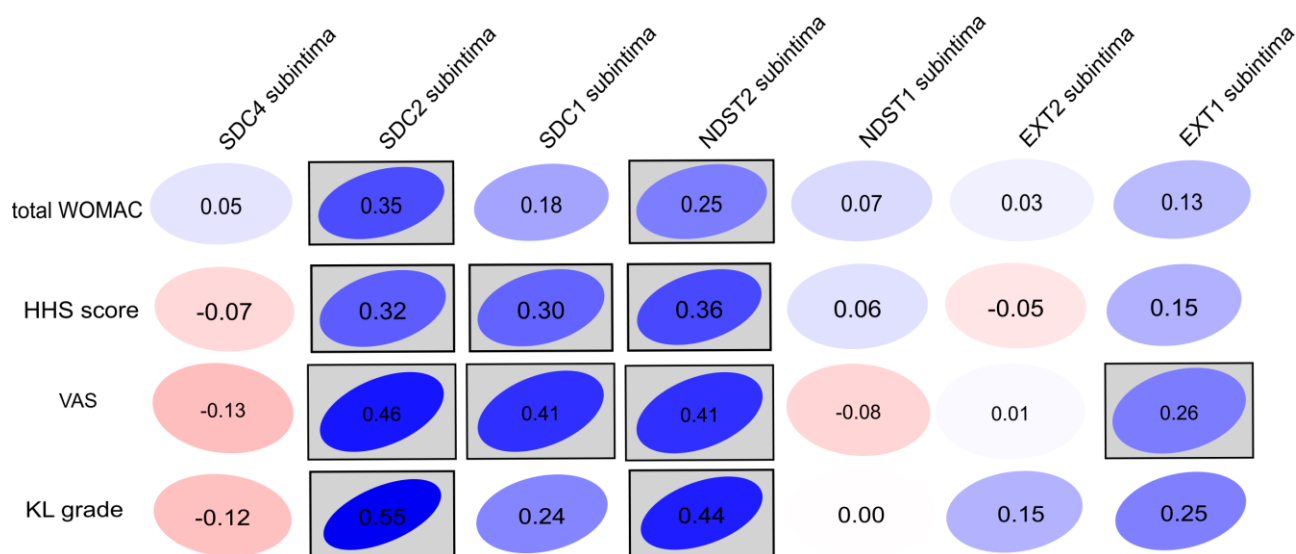
Analizirajući povezanost kliničkih parametara s ekspresijom analiziranih molekula u intimalnom sloju sinovijalne ovojnice, zapažamo da svi klinički pokazatelji pokazuju signifikantnu pozitivnu korelaciju s ekspresijom sindekana-2 (Slika 17). Nešto manje izražena signifikantna pozitivna korelacija postoji s ekspresijom sindekana-4 (izuzevši WOMAC score). Signifikantna negativna korelacija prisutna je kod izražaja sindekana-1 u usporedbi sa subjektivnom ocjenom boli i radiološkim bodovanjem OA kuka. Za egzostozine i sulfotransferaze nismo našli signifikantne korelacije s promatranim kliničkim parametrima.



**Slika 17.** Korelacija radioloških i kliničkih pokazatelja izraženosti osteoartritisa s imunohistokemijskom izraženošću sindekana, egzostozina i sulfo-transferaza u intimi sinovijalne

ovojnice bolesnika s osteoartritisom. Broj unutar elipse je Kendallov koeficijent korelacije, ako je negativan onda je korelacija obrnuta i elipsa je crvena, što je broj bliže 1 ili -1 to je korelacija jača i elipsa je uža. Za elipse u sivim kvadratima p je manji od 0,05.

U subintimalnom sloju sinovijalne ovojnice ponovno je izražena signifikantna pozitivna korelacija između ekspresije sindekana-2 i svih analiziranih kliničkih parametara (Slika 18). Signifikantna pozitivna korelacija za sve parametre prisutna je i u odnosu na ekspresiju NDST2, dok je u odnosu na sindekan-1 signifikantna pozitivna korelacija prisutna za subjektivno vrednovanje boli i Harrisovo bodovanje za kuk. U subintimalnom sloju sindekan-4 ne pokazuje signifikantnu povezanost niti s jednim analiziranim kliničkim parametrom.



**Slika 18.** Korelacija radioloških i kliničkih pokazatelja izraženosti osteoartritisa s imunohistokemijskom izraženošću sindekana, egzostozina i sulfo-transferaza u subintimi sinovijalne ovojnice bolesnika s osteoartritisom. Broj unutar elipse je Kendallov koeficijent korelacije, ako je negativan onda je korelacija obrnuta i elipsa je crvena, što je broj bliže 1 ili -1 to je korelacija jača i elipsa je uža. Za elipse u sivim kvadratima p je manji od 0,05.



## 5. RASPRAVA

Osteoarthritis, kao jedan od najčešćih i najvažnijih uzroka kronične boli i invaliditeta, nosi veliki socioekonomski učinak svojim značajnim utjecajem na kvalitetu života bolesnika (7, 95). Studije koje se baziraju na slikovnim metodama sugeriraju da sinovijalna upala može biti prisutna i u ranom osteoartritisu (OA) i u uznapređovalom stadiju OA te da je uključena u razvoj i progresiju OA (96, 97, 98). Sinovijalne stanice pokreću i koordiniraju upalu i doprinose oštećenju hrskavice tijekom progresije OA, proizvodnjom različitih signalnih molekula (47). Sinovijalna ovojnica je građena od intime u kojoj nalazimo makrofage i stanice slične epitelu (sinoviocite) dok se subintima sastoji od vezivnih stromalnih stanica s više ili manje upalnog infiltrata, osobito oko krvnih žila. Iz tog bi razloga svaka od ovih regija sinovijalne ovojnice mogla imati specifično značenje u odnosu na proteine ispitivane u našoj studiji. Dokazano je da, uz kliničke čimbenike kao što su starenje, pretilost, pretrpljena trauma i prekomjerno mehaničko opterećenje, različiti biokemijski podražaji koji mogu biti intra- ili ekstraartikularnog porijekla reguliraju proizvodnju upalnih medijatora u sinovijalnim stanicama, uključujući bioaktivne lipide, prostaglandine, citokine i druge molekularne uzorke povezane s oštećenjima (DAMPs) (47).

Nekada se smatralo da je OA primarno posljedica mehaničkog razaranja i propadanja hrskavice, ali danas je očito da upala niskog stupnja sinovijalne ovojnice (engl. *low-grade synovitis*, *LGI*) zapravo igra središnju ulogu u patofiziologiji OA, pridonosi simptomima i progresiji bolesti te da su imunološki mehanizmi ključni u pokretanju upale i oštećenju tkiva (16, 99, 100, 101). Također je važno primijetiti da postoji sve više dokaza da sinovitis doprinosi stvaranju i održavanju boli kod OA (44, 102, 103).

Kako bismo poboljšali terapijski pristup i smanjili oštećenja i bol uzrokovane OA, potrebno je povećati naše znanje i razumijevanje uloge sinovitisa u nastanku i progresiji OA. Stoga postoji konsenzus o potrebi za dodatnim studijama koje će otkriti kemijske signalne putove između sinovijalnih i upalnih i reparativnih stanica kako bi se poboljšale protuupalne terapije, osobito u ranim stadijima bolesti (47, 104). Uzimajući u obzir navedeno, cilj mogla bi biti istražiti ekspresiju i potencijalnu ulogu skupine funkcionalno povezanih molekula posrednika upale: članova obitelji sindekana (SDC1, SDC2, SDC4), egzostozina (EXT1, EXT2) i sulfotransferaza (NDST1, NDST2) (64, 70, 75, 92) u sinovijalnoj ovojnici kuka bolesnika s OA, te ga usporediti s ekspresijom u kontrolnoj skupini bolesnika bez OA. Uzimajući u obzir prikazanu važnost sinovitisa niskog stupnja u progresiji OA, odlučili smo ispitanike s OA podijeliti u dvije podskupine, ne na temelju radiološkog nalaza, već na temelju histološkog univerzalno prihvaćenog bodovanja sinovitisa koji je razvio Krenn. U njegovoj izvornoj seriji koja se sastojala od 212 slučajeva OA

medijan je bio 2 (raspon 0-6) (Krenn). U našoj studiji imali smo 24 slučaja OA s prosječnim Krenn rezultatom od 2,69 (raspon 0-5). Nismo upotrijebili Krennovu izvornu podjelu u tri skupine (0-1 bez sinovitis, 2-4 sinovitis niskog stupnja, 5-9 sinovitis visokog stupnja) zbog činjenice da je ovaj sustav bodovanja prvenstveno osmišljen kako bi se diferenciralo "upalne" (npr. reumatoidni) i "neupalne" sinovitise.

U pokušaju povećanja kvalitete Krenn sustava bodovanja sinovitisa, Najm i sur. dodali su imunokemijske biomarkere stvarajući tako novi sustav bodovanja – IMSYC (eng. IMMunologic SYnovitis sCore) (105). Zanimljivo je da je u njihovoj seriji nekoliko pacijenata s OA također pokazalo viši IMSYC od očekivanog, sličan onom zabilježenom u seriji s reumatoidnim artritismom, što sugerira da je izraženiji upalni obrazac u OA povremeno prisutan (105). Daljnje su studije pokazale da histopatološka bodovanja (Krennovo bodovanje sinovitisa i IMSYC) općenito odražavaju kliničku aktivnost bolesti u pacijenata s uznapredovalim stadijem reumatoidnog artritisa (106), ali, koliko je meni poznato, nema dokaza o korištenju ovih bodovanja za kvantificiranje progresije OA.

Prilikom planiranja istraživanja, moja hipoteza je bila da ćemo naći značajan porast ekspresije svih ispitivanih molekula u usporedbi s kontrolama, te da će povećanje biti veće u skupini s višom gradacijom sinovitisa nego u skupini s nižom gradacijom sinovitisa. Rezultati našeg istraživanja samo su djelomično potvrdili tu hipotezu. Ekspresija SDC2 i, slično, ekspresija EXT1 nisu pokazali značajnu razliku između OA skupine i kontrolne skupine, pa stoga možemo spekulirati da SDC2 i EXT2 možda nisu medijatori sinovitisa u OA. Studija Zhua i sur. (107) koji su istraživali sindekan u akutnoj ozljedi pluća povezanoj sa sepsom došli su do sličnih rezultata: ekspresija gena SDC4 bila je značajno viša u upalnoj nego u kontrolnoj skupini, dok su razine SDC2 bile slične u obje skupine. Ipak, zanimljivo je da se u našoj studiji u subintimalnim krvnim žilama povremeno mogla uočiti samo SDC2 pozitivnost.

SDC1, NDST1 i EXT2 su pokazali značajno veću ekspresiju u OA u usporedbi s kontrolama bez OA, ali prvenstveno u skupini OA s niskim rezultatom sinovitisa. Povećanje ekspresije SDC1, NDST1 i EXT2 bilo je slično u svim skupinama te stoga možemo pretpostaviti da je povećanje ekspresije SDC1 posredovano NDST1 i EXT2. SDC4 je, s druge strane, pokazao značajno povećanu ekspresiju prvenstveno u intimi sinovitisa s višim upalnim rezultatom.

Prethodna istraživanja pokazala su složeno međudjelovanje između egzostozina i NDST1 - relativne količine triju enzima (EXT1, EXT2 i NDST1) odredit će aktivnost NDST-a i utjecati na konačnu strukturu heparan-sulfata. Prekomjerna ekspresija EXT2 pojačala je ekspresiju NDST1 i

rezultirala povišenim sulfatizacijom heparan-sulfata, dok je prekomjerna ekspresija EXT1 imala suprotne učinke (92). Rezultati mog istraživanja usklađeni su s ovim nalazima jer smo otkrili da NDST1 i EXT2 imaju sličan uzorak ekspresije.

Pokušavajući objasniti izraženiju ekspresiju SDC1 u sinovitisu nižeg stupnja nego u sinovitisu višeg stupnja, trebali bismo uzeti u obzir da, slično citokinima, sindekani mogu igrati ulogu i kao proupalne i kao protuupalne molekule. Eksperimentalni podaci podupiru protuupalnu ulogu SDC1 (108, 109, 110). SDC1 ublažava neinfektivne upalne bolesti inhibicijom adhezije leukocita na aktivirani endotel, smanjenjem ekspresije i inhibicijom aktivnosti proupalnih čimbenika, ograničavanjem infiltracije leukocita na specifična mjesta ozljede tkiva ili uklanjanjem sekvestriranih kemokina i olakšavanjem razrješenja upale (111). Kako bi tumačenje bilo još kompliciranije, dok se čini da sindekani kontroliraju upalne citokine, moguće je i obrnuto, pri čemu ekspresiju sindekana reguliraju citokini, a u nekim slučajevima isti citokini čak imaju suprotne učinke na ekspresiju različitih sindekana (77). Uzimajući u obzir navedeno, razumno je pretpostaviti da je mehanizam povratne sprege uključen u ekspresiju sindekana tijekom upale (75). Posljednja zbnjujuća činjenica je da sindekani također mogu utjecati na ekspresiju jedni drugih s kompenzacijskim ili suprotnim učincima (75).

Duplančić i suradnici, istraživali su ekspresiju SDC-a, EXT-a i NDST-a u parodontitisu - SDC1 i SDC2 pozitivno su korelirali s prisutnošću upalnog infiltrata, a za SDC4 nije pronađena korelacija. Ekspresije enzima biosinteze heparan-sulfata (EXT1, EXT2, NDST1 i NDST2) pokazale su slične korelacijske obrasce s prisutnošću upalnog infiltrata u gingivalnom tkivu iz skupine parodontitisa: EXT1, EXT2 i NDST1 koreliraju pozitivno, dok je negativna korelacija nađena za NDST2 (72). Studija Chanalarisa i sur. analizirala je promjene u ekspresiji gena povezanih s heparan-sulfatima u ljudskoj OA hrskavici. U sindekanskoj obitelji, SDC2, slično mojoj studiji, nije bio različito reguliran između ispitivanih skupina, dok je ekspresija SDC4 bila smanjena u OA, a ekspresija SDC1 pak povećana. U istoj studiji ekspresija EXT1 i EXT2 kao i NDST1 povećana je u ljudskoj OA hrskavici (112). Hattori i sur. istraživali su učinak intraartikularne injekcije SDC4 u zglobove koljena mišjeg modela OA. Njihovi rezultati nisu mogli potvrditi proupalne učinke egzogenog SDC4 - sinovitis niskog stupnja pojavio se nakon drugog i četvrtog tjedna i poboljšao se nakon šest tjedana, ali nije bilo značajnih razlika u prosječnim rezultatima sinovitisa između SDC4 i kontrolnih skupina u bilo kojem trenutku (113). Treba napomenuti da rezultati iste studije sugeriraju da liječenje osteoartritisa zglobne hrskavice sa SDC4 inhibira degeneraciju hrskavice, a predloženi mehanizam je smanjena ekspresija ADAMTS-5 (engl. *a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) i povećana ekspresija TIMP-3 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*)

(113). Studija Echtermeyera i sur. pokazala je da su miševi sa suprimiranim SDC4 imali manje izražene destrukcije hrskavice u eksperimentalnom modelu OA, vjerojatno kao rezultat smanjenja aktivnosti ADAMTS-5 (82), ali ta studija nije procijenila učinak SDC4 na OA sinovitis. Porast SDC4 u našoj studiji u skupini s višim rezultatom sinovitisa u skladu je s rezultatima Zhaoa i sur. koji su otkrili da je ekspresija SDC4 u sinovijalnom tkivu slična između pacijenata s reumatoidnim artritisom (koji obično imaju visok rezultat sinovitisa) i OA pacijenata (114). Tome u prilog govori i studija Godmanna i suradnika na mišjem modelu reumatoidnog artritisa koja je zaključila da inhibicija SDC4 dimerizacije za posljedicu ima smanjenu ekspresiju receptora interleukina-1 (IL-1R) na površini fibroblasta i posljedičnog protuupalnog djelovanja (115).

Konačno, relativna ekspresija svih ispitivanih medijatora izraženija je u intimi nego u subintimi sinovijalne membrane. Taj je nalaz u skladu s objavljenim rezultatima opsežne studije koja je koristila metodu jednostaničnog sekvenciranja RNA koju su proveli Chou i sur. da su četiri glavna citokina povezana s OA (TNF, IL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$  i IL6) i glavni čimbenik rasta povezan s OA (IGF1) pretežno aktivni u sinoviocitima (116).

U sekundarnom dijelu istraživanja, analizirao sam povezanost izražaja istraživanih molekula s pokazateljima radiološkog i kliničkog stupnjevanja osteoartritisa. Koliko je meni poznato, prethodnih istraživanja ove povezanosti nema.

Što se tiče radiološkog stupnjevanja osteoartritisa kuka klasifikacijom po Kellgrenu i Lawrenceu (K-L) istraživana skupina bolesnika se značajno razlikuje od kontrolne što je očekivano jer je to zapravo ugrađeno u dizajn studije – indikacija za ugradnju totalne proteze kuka kod OA je uglavnom K-L 3-4, dok je kriterij isključenja za regrutaciju kontrolne skupine bilo nepostojanje značajnih radioloških znakova osteoartritisa, drugim riječima K-L 0-1.

Za kliničko stupnjevanje izraženosti OA izabrao sam tri sustava bodovanja - bodovanje po Harrisu za procjenu disabiliteta uslijed bolesti ili ozljede kuka (eng. *Harris hip score*, HHS); bodovanje subjektivne izraženosti osteoartritisa po metodi sveučilišta Western Ontario i McMaster (eng. *Western Ontario and McCormac Universities Arthritis Indeks*, WOMAC) i vizualno-analognu skalu (VAS) za subjektivnu procjenu intenziteta boli. HHS metoda temeljena je na upitniku kojemu se značajniji dio sastoji od subjektivne pacijentove procjene intenziteta tegoba i manjeg dijela temeljenog na objektivnim parametrima opsega pokreta u kuku (117). Test nije isključivo razvijen za OA kuka već se koristi i za procjenu postoperativnog funkcionalnog rezultata nakon totalne zamjene kuka, neovisno o indikaciji, te je široko korišten usprkos izvjesnim limitima (118). WOMAC indeks je razvijen kao alat za samoprocjenu funkcionalnog statusa pacijenata s OA kuka

ili koljena te se temelji na subjektivnoj procjeni raznih aspekata boli, ukočenosti i funkcionalnih ograničenja (119, 120). Premda različito struktuirani, analize su pokazale da HHS i WOMAC indeks pokazuju dobru kliničku korelaciju (121). Vizualno-analoga skala boli je univerzalno najprihvaćeniji alat za mjerenje subjektivnog osjećaja boli koji se stoga često koristi i u evaluaciji bolnih reumatskih stanja, uključujući i osteoartritis (122). Važno je primijetiti da se sve tri metode većim dijelom temelje na pacijentovom subjektivnom doživljaju intenziteta tegoba te da je upravo taj subjektivni doživljaj često presudan čimbenik za postavljanje konačne indikacije za kiruršku zamjenu kuka. U mojoj studiji nema signifikantne razlike u distribuciji ova tri indeksa između grupe s bodovanjem sinovitisom po Krennu 0-2 i  $> 3$ . Iz toga indirektno možemo zaključiti da razlike u stupnju sinovitisa ne utječu presudno na subjektivni doživljaj intenziteta bolesti niti, posljedično, na indikaciju za totalnu zamjenu kuka. Ipak, činjenica da u obje grupe pacijenta sa sinovitisom, neovisno o stupnju njegove izraženosti, nalazimo pacijente kod kojih je radiološko K-L bodovanje bilo 2, daje nam za pravo da spekuliramo da subjektivni osjećaj boli nije uvijek proporcionalan radiološkom nalazu, odnosno propadanju hrskavičnog pokrova, što može ukazivati na ulogu sinovitisa u razvoju boli.

Analizirajući stupanj korelacije kliničkih i radioloških pokazatelja sa zapaženom ekspresijom sindekana, egzostozina i sulfotransferaza, iznenađuje da najveći stupanj pozitivne korelacije nalazimo kod sindekana-2, kako u intimalnom tako i u subintimalnom sloju. Taj rezultat čini se u kontradikciji s nalazom primarnog djela moje studije gdje sindekan-2 nije pokazao signifikantnu razliku u ekspresiji između ispitivanih skupina i kontrolne skupine. Moguće objašnjenje za takve kontradiktorne rezultate moglo bi biti da sindekan-2 ima ipak važniju ulogu u upali sinovijalne ovojnice kod OA (nego što se čini u rezultatima primarnog dijela studije), ali isto tako i u ranoj fazi upalnog posttraumatskog odgovora kod pacijenata s prijelomom vrata bedrene kosti (kontrolne skupine mog istraživanja). Drugo zapažanje je da sindekan-1 pokazuje negativnu korelaciju u intimalnom sloju i pozitivnu korelaciju u subintimalnom sloju, što je moguće s obzirom na različitost staničnih populacija u tim slojevima. Ako taj nalaz povežemo s rezultatom koji nam govori da je sindekan-1 u svim istraživanim skupinama signifikantno izraženiji u intimi u odnosu na subintimu (Slika 10), možemo spekulirati da povećan izražaj sindekana-1 u intimi ima protuupalno (protektivno) djelovanje dok u subintimi ima proupalno djelovanje. Za sindekan-4 možemo reći da ima tek blagu pozitivnu signifikantnu kliničku korelaciju u intimalnom sloju, dok u subintimalnom sloju ta korelacija nije signifikantna. Egzostozini i sulfo-transferaze ne pokazuju signifikantnu korelaciju s kliničkim parametrima, vjerojatno stoga što je njihovo djelovanje nespecifično, u sintezi i modifikaciji glikozaminoglikanskih lanaca i drugih molekula, a ne samo sindekana.

Svjestan sam i nekih značajnih ograničenja moje studije. Kontrolnu skupinu čine bolesnici s prijelomima koji, iako bez kliničkih znakova OA, nisu potpuno zdrave osobe zbog činjenice da su nedavno pretrpjeli značajnu traumu kuka. Anatomske probleme i probleme povezane sa sigurnošću pacijenta čine uzorkovanje sinovijalne membrane u zdravih mladih osoba ili u ranim fazama osteoartritisa gotovo nemogućim. Relativno mala veličina uzorka ispitivane sinovijalne membrane također može igrati ulogu jer je dokazano da sinovitis niskog stupnja kod OA ima nejednaku distribuciju na različitim anatomskim mjestima sinovije (123). Nisam istraživao ulogu topivih (odvojenih) sindekana u korelaciji s njihovom ekspresijom u sinovijalnim stanicama, što bi mogao biti važan *in vivo* mehanizam djelovanja sindekana (87).

## 6. ZAKLJUČCI

Hipoteze moga istraživanja djelomično su potvrđene, djelomično nepotvrđene te djelomično odbačane što bih mogao sažeti ovako:

1. hipoteza: *Ekspresija svih istraživanih molekula biti će signifikantno povećana kod svih istraživanih molekula (sindekan-1, -2 i -4, egzostozin-1 i -2, NDST-1 i -2) u sinovijalnoj membrani bolesnika s OA u usporedbi s kontrolama.* Hipoteza je djelomično potvrđena: signifikantno povećanje ekspresije pronašli smo za sindekan-1, sindekan-4, NDST1, NDST2 i egzostozin-2, u intimalnom sloju.

2. hipoteza: *Zapaženo povećanje ekspresije biti će izraženije u istraživanoj podskupini s većim histološkim stupnjem sinovitisa u odnosu na skupinu s manjim histološkim stupnjem sinovitisa.* Hipoteza je djelomično potvrđena, djelomično odbačena: potvrđena za sindekan-4, za sindekan-1, NDST2 i egzostozin-2 potvrđena obrnuta povezanost (veća ekspresija kod manje izraženog sinovitisa).

3. hipoteza: *Povećana ekspresija istraživanih molekula bit će izraženija u intimi sinovijalne membrane u odnosu na subintimu (stromu).* Hipoteza je djelomično potvrđena: za sindekan-1 i NDST1 u oba stupnja sinovitisa, za sindekan-4 i egzostozin-2 samo u skupini izraženijeg sinovitisa.

4. hipoteza: *Povećana ekspresija istraživanih molekula biti će u pozitivnoj korelaciji s kliničkim pokazateljima izražajnije bolesti.* Hipoteza je potvrđena za sindekan-2, djelomično potvrđena za sindekan-1 (negativna korelaciju u intimalnom sloju i pozitivna korelaciju u subintimalnom sloju).

Uzimajući u obzir značajnu socioekonomsku i medicinsku važnost OA, istražuju se brojni načini poboljšanja farmakoloških intervencija s ciljem smanjenja progresije bolesti i boli u bolesnika s OA, uključujući imunomodulatore usmjerene na sinovitis i bol (41, 124). Moduliranje komunikacije između stanica u zglobu radi smanjenja upale predstavlja atraktivan pristup u pogledu tog cilja (50). Moje je istraživanje pokazalo da su SDC1 i SDC4, kao i molekule koje su uključene u regulaciju sindekana (egzostozini, sulfotransferaze) pokazale povećanu ekspresiju kod sinovitisa povezanog s OA u usporedbi s kontrolama. Interpretacija rezultata je teška zbog delikatne interakcije između ispitivanih molekula i zbog njihovih potencijalnih pro- i protuupalnih učinaka. Ipak, zaključujem da sindekani (SDC1, SDC4), egzostozini (EXT2) i sulfotranferaze (NDST1) igraju ulogu u progresiji i kontroli sinovitisa te su stoga potencijalna terapijska meta. Sindekani su

već istraživani kao potencijalni terapijski cilj za brojne kronične upalne bolesti (86, 87) uključujući OA, ali bez konačnih rezultata. Bez obzira na to, mišljenja sam da moj rad dokazuje potrebu za nastavkom istraživanja ovih molekularnih putova u regulaciji upalnog odgovora sinovijalne ovojnice.



## 8. SAŽETAK

Pozadina istraživanja: Uvriježeno je mišljenje da je postupno propadanje zglobne hrskavice središnji događaj u nastanku i progresiji osteoartritisa (OA), no nedavne su studije pokazale iznimnu važnost sinovitisa niskog stupnja u progresiji OA. Poznato je da sindekanska (SDC) obitelj membranskih proteoglikana sudjeluje u regulaciji upale, ali postoje ograničeni dokazi koji razmatraju ulogu sindekana u OA sinovitisu. Cilj mog rada bio je istražiti obrasce ekspresije sindekana-1 (SDC1), sindekana-2 (SDC2) i sindekana-4 (SDC4) u sinovijalnoj membrani (intimi i subintimi) OA kuka, kao i egzostozina (EXT) i sulfotransferaza (NDST) (enzima uključenih u polimerizaciju i modifikaciju heparan-sulfatnih lanaca sindekana).

Metode: kirurški prikupljene uzorke sinovijalne ovojnice pacijenata s OA podijelio sam u dvije skupine s obzirom na izraženost sinovitisa ocijenjenog histološkim bodovanjem sinovitisa po Krennu. Zatim sam analizirano imunohistokemijsku ekspresiju SDC1, SDC2, SDC4, EXT1, EXT2, NDST1 i NDST2 u sinovijalnoj intimi i subintimi i potom je usporedio s kontrolnom skupinom (pacijenti s prijelomom vrata bedrene kosti, bez OA). Dodatno sam istražio povezanost ekspresije ovih molekula s kliničkim i radiološkim pokazateljima težine osteoartritisa kuka.

Rezultati: prema mojoj studiji, imunoekspresija SDC1, NDST1 i EXT2 značajno je povećana u stanicama intime OA sinovijalne membrane u bolesnika s nižim histološkim rezultatom sinovitisa, i SDC4 u bolesnika s višim rezultatom sinovitisa, u usporedbi s kontrolama bez OA. Razlika u ekspresiji SDC2 između OA i ne-OA skupine je beznačajna. Nasuprot tome, klinički i radiološki pokazatelji težine OA najbolje koreliraju s ekspresijom sindekana-2, od svih ispitivanih molekula, kako u intimalnom tako i u subintimalnom sloju sinovijalne ovojnice.

Zaključci: čini se da SDC1, SDC4, NDST1 i EXT2 imaju ulogu kao moderatori upale u OA sinovitisu niskog stupnja. Tumačenje rezultata je teško zbog delikatnih interakcija između testiranih molekula i njihovih potencijalnih pro- i protuupalnih učinaka. Usprkos tome, mišljenja sam da rezultati moje studije dokazuju da bi upalne mehanizme povezane sa sindekanima trebalo dodatno istražiti kao potencijalne markere progresije bolesti i terapijskog cilja u OA.

## 9. SUMMARY

**Background:** The gradual deterioration of articular cartilage was thought to be the central event in osteoarthritis (OA), but recent studies demonstrated importance of low-grade synovitis in progression of OA. Syndecan (SDC) family of membrane proteoglycans is known to be involved in regulation of inflammation but there is a limited evidence considering the role of syndecans in OA synovitis. The aim of my study was to investigate hip OA synovial membrane expression patterns (intimal and subintimal) of syndecan-1 (SDC1), syndecan-2 (SDC2), and syndecan-4 (SDC4) as well as exostosins (EXT) and sulfotransferases (NDST) (enzymes involved in polymerisation and modification of syndecans' heparan-sulfate chains).

**Methods:** surgically collected synovial membrane samples of patients with OA were divided into two groups according to their Krenn synovitis score grading. Immunohistochemical expression of SDC1, SDC2, SDC4, EXT1, EXT2, NDST1, and NDST2 in synovial intima and subintima was then analyzed and compared with control group (patients with femoral neck fracture, without OA). Additionally, I investigated the association of the expression of these molecules with clinical and radiological indicators of hip osteoarthritis severity.

**Results:** according to my study, immunoexpression of SDC1, NDST1 and EXT2 is significantly increased in intimal cells of OA synovial membrane in patients with lower histological synovitis score, and SDC4 in patients with higher synovitis score, in comparison with non-OA controls. Difference in expression of SDC2 among OA and non-OA group is insignificant. Contrary, clinical and radiological indicators of OA severity correlate best with syndecan-2 expression, of all investigated molecules, both in intimal and subintimal layers of synovial membrane.

**Conclusions:** SDC1, SDC4, NDST1 and EXT2 seem to be involved as inflammation moderators in low-grade OA synovitis. The interpretation of the results is difficult due to the delicate interactions between the tested molecules and their potential pro- and anti-inflammatory effects. However, I am of the opinion that the results of my study prove that syndecan related inflammation pathways should be further investigated as potential markers of disease progression and therapeutic goal in OA.

## 9. LITERATURA

1. Ebnezar J. Disorders of joints (Arthritis). In: Ebnezar J, John R, editors. Textbook of orthopaedics: Includes Clinical Examination Methods in Orthopedics. 5th edition, New Delhi / London, Jaypee Brothers Medical Pub, 2017.
2. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015 Aug;23(8):1233–41.
3. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022 Feb;30(2):184–95.
4. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011 Nov;19(11):1270–85.
5. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2018 Mar;30(2):160–7.
6. Guillemin F, Rat AC, Mazieres B, Pouchot J, Fautrel B, Euller-Ziegler L, et al. Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey<sup>1</sup>. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011 Nov;19(11):1314–22.
7. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*. 2013 Mar 1;105(1):185–99.
8. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jul;73(7):1323–30.
9. Steinmetz JD, Culbreth GT, Haile LM, Rafferty Q, Lo J, Fukutaki KG, et al. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023 Sep;5(9):e508–22.
10. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*. 1986 Aug;29(8):1039–49.

11. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 2016 Aug;474(8):1886–93.
12. Castaneda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology*. 2014 Jan 1;53(1):1–3.
13. Herrero-Beaumont G, Castro-Dominguez F, Migliore A, Naredo E, Largo R, Reginster JY. Systemic osteoarthritis: the difficulty of categorically naming a continuous condition. *Aging Clin Exp Res*. 2024 Feb 20;36(1):45.
14. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013 Jan;21(1):16–21.
15. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism*. 2012 Jun;64(6):1697–707.
16. Coaccioli S, Sarzi-Puttini P, Zis P, Rinonapoli G, Varrassi G. Osteoarthritis: New Insight on Its Pathophysiology. *JCM*. 2022 Oct 12;11(20):6013.
17. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021 Feb 9;325(6):568.
18. Geyer M, Schönfeld C. Novel Insights into the Pathogenesis of Osteoarthritis. *CRR*. 2018 Jul 6;14(2):98–107.
19. Murphy NJ, Eyles JP, Hunter DJ. Hip Osteoarthritis: Etiopathogenesis and Implications for Management. *Adv Ther*. 2016 Nov;33(11):1921–46.
20. Sharma A, Jagga S, Lee SS, Nam JS. Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis. *IJMS*. 2013 Sep 30;14(10):19805–30.
21. Murphy LB, Helmick CG, Schwartz TA, Renner JB, Tudor G, Koch GG, et al. One in four people may develop symptomatic hip osteoarthritis in his or her lifetime. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010 Nov;18(11):1372–9.
22. Culliford DJ, Maskell J, Kiran A, Judge A, Javaid MK, Cooper C, et al. The lifetime risk of total hip and knee arthroplasty: results from the UK general practice research database. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012 Jun;20(6):519–24.

23. 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 & Rheumatism*. 2008 Jan;58(1):26–35.
24. Lespasio MJ, Sultan AA, Piuze NS, Khlopas A, Husni ME, Muschler GF, et al. Hip Osteoarthritis: A Primer. *TPJ*. 2018 Mar;22(1):17–084.
25. Altman R, Alarcón 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 & Rheumatism*. 1991 May;34(5):505–14.
26. Felson DT. Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Ann Intern Med*. 2000 Oct 17;133(8):635.
27. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005 Sep;13(9):769–81.
28. Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X, et al. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2011 Mar;78(2):150–5.
29. MacGregor AJ, Antoniadou L, Matson M, Andrew T, Spector TD. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: Results of a classic twin study. *Arthritis & Rheumatism*. 2000 Nov;43(11):2410–6.
30. Zengini E, Finan C, Wilkinson JM. The Genetic Epidemiological Landscape of Hip and Knee Osteoarthritis: Where Are We Now and Where Are We Going? *J Rheumatol*. 2016 Feb;43(2):260–6.
31. Ganz R, Leunig M, Leunig-Ganz K, Harris WH. The Etiology of Osteoarthritis of the Hip: An Integrated Mechanical Concept. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 2008 Feb;466(2):264–72.
32. Klaue K, Durnin C, Ganz R. The acetabular rim syndrome. A clinical presentation of dysplasia of the hip. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 1991 May;73-B(3):423–9.
33. Gregory JS, Waarsing JH, Day J, Pols HA, Reijman M, Weinans H, et al. Early identification of radiographic osteoarthritis of the hip using an active shape model to quantify

changes in bone morphometric features: Can hip shape tell us anything about the progression of osteoarthritis? *Arthritis & Rheumatism*. 2007 Nov;56(11):3634–43.

34. Loureiro A, Mills PM, Barrett RS. Muscle weakness in hip osteoarthritis: A systematic review. *Arthritis Care & Research*. 2013 Mar;65(3):340–52.

35. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1957 Dec 1;16(4):494–502.

36. Huang BK, Tan W, Scherer KF, Rennie W, Chung CB, Bancroft LW. Standard and Advanced Imaging of Hip Osteoarthritis. What the Radiologist Should Know. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2019 Jun;23(03):289–303.

37. Mourad C, Vande Berg B. Osteoarthritis of the hip: is radiography still needed? *Skeletal Radiol*. 2023 Nov;52(11):2259–70.

38. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care & Research*. 2020 Feb;72(2):149–62.

39. Günther KP, Deckert S, Lützner C, Lange T, Schmitt J, Postler A. Total hip replacement for osteoarthritis. *Deutsches Ärzteblatt international* [Internet]. 2021 Oct 29 [cited 2024 Sep 14]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.m2021.0323>

40. National Health Service (NHS) Digital: Finalised patient reported outcome measures (PROMs) in England for hip and knee replacement procedures (April 2019 to March 2020) <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/patient-reported-outcomemeasures-proms/finalised-hip-and-knee-replacement-april2019---march-2020> (last accessed on 02 August 2021)

41. Vrouwe JPM, Burggraaf J, Kloppenburg M, Stuurman FE. Challenges and opportunities of pharmacological interventions for osteoarthritis: A review of current clinical trials and developments. *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2021 Dec;3(4):100212.

42. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):580–92.

43. D. Smith M. The Normal Synovium. *TORJ*. 2011 Dec 30;5(1):100–6.

44. Geraghty T, Winter DR, Miller RJ, Miller RE, Malfait AM. Neuroimmune interactions and osteoarthritis pain: focus on macrophages. *PR9*. 2021;6(1):e892.
45. Li F, Tang Y, Song B, Yu M, Li Q, Zhang C, et al. Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Dec;10(1):260.
46. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Nov;6(11):625–35.
47. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol*. 2022 May;18(5):258–75.
48. Deligne C, Casulli S, Pigenet A, Bougault C, Campillo-Gimenez L, Nourissat G, et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015 Nov;23(11):1843–52.
49. Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, Zheng DH, et al. The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008 Aug 1;67(8):1184–7.
50. Terkawi MA, Ebata T, Yokota S, Takahashi D, Endo T, Matsumae G, et al. Low-Grade Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Cellular and Molecular Mechanisms and Strategies for Future Therapeutic Intervention. *Biomedicines*. 2022 May 10;10(5):1109.
51. Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JHP, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis: Implications for cartilage repair. *Acta Orthopaedica*. 2016 Dec 16;87(sup363):6–14.
52. Bigoni M, Sacerdote P, Turati M, Franchi S, Gandolla M, Gaddi D, et al. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *Journal Orthopaedic Research*. 2013 Feb;31(2):315–21.
53. Evers BJ, Van Den Bosch MHJ, Blom AB, Van Der Kraan PM, Koëter S, Thurlings RM. Post-traumatic knee osteoarthritis; the role of inflammation and hemarthrosis on disease progression. *Front Med*. 2022 Aug 22;9:973870.
54. Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*. 2007 Aug 1;28(5):521–74.

55. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov;8(11):665–73.
56. Thijssen E, Van Caam A, Van Der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology*. 2015 Apr 1;54(4):588–600.
57. Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM, Weissfeld LA. Obesity as a Risk Factor for Osteoarthritis of the Hand and Wrist: A Prospective Study. *American Journal of Epidemiology*. 1994 Jan 15;139(2):119–29.
58. Ushiyama T. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003 Feb 1;62(2):108–12.
59. Huang ZY, Stabler T, Pei FX, Kraus VB. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016 Oct;24(10):1769–75.
60. Farnaghi S, Crawford R, Xiao Y, Prasad I. Cholesterol metabolism in pathogenesis of osteoarthritis disease. *Int J Rheum Dis*. 2017 Feb;20(2):131–40.
61. Leong D, Choudhury M, Hirsh D, Hardin J, Cobelli N, Sun H. Nutraceuticals: Potential for Chondroprotection and Molecular Targeting of Osteoarthritis. *IJMS*. 2013 Nov 21;14(11):23063–85.
62. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 11 [cited 2024 Jul 27];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01081/abstract>
63. Liu S, Li G, Xu H, Wang Q, Wei Y, Yang Q, et al. “Cross-talk” between gut microbiome dysbiosis and osteoarthritis progression: a systematic review. *Front Immunol*. 2023 Apr 25;14:1150572.
64. Pap T, Bertrand J. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Jan;9(1):43–55.
65. Gondelaud F, Ricard-Blum S. Structures and interactions of syndecans. *The FEBS Journal*. 2019 Aug;286(15):2994–3007.



66. Oh ES, Couchman JR. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells*. 2004 Apr 30;17(2):181–7.
67. Couchman JR. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010 Nov 10;26(1):89–114.
68. Afratis NA, Nikitovic D, Multhaupt HAB, Theocharis AD, Couchman JR, Karamanos NK. Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions. *The FEBS Journal*. 2017 Jan;284(1):27–41.
69. Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Feb;39(2):157–67.
70. Deligny A, Dierker T, Dagälv A, Lundquist A, Eriksson I, Nairn AV, et al. NDST2 (N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2) Enzyme Regulates Heparan Sulfate Chain Length. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Sep;291(36):18600–7.
71. Alexopoulou AN, Multhaupt HAB, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(3):505–28.
72. Duplancic R, Roguljic M, Puhar I, Vecek N, Dragun R, Vukojevic K, et al. Syndecans and Enzymes for Heparan Sulfate Biosynthesis and Modification Differentially Correlate With Presence of Inflammatory Infiltrate in Periodontitis. *Front Physiol*. 2019 Sep 25;10:1248.
73. Xian X, Gopal S, Couchman JR. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):31–46.
74. De Rossi G, Whiteford JR. Syndecans in angiogenesis and endothelial cell biology. *Biochemical Society Transactions*. 2014 Dec 1;42(6):1643–6.
75. Gopal S. Syndecans in Inflammation at a Glance. *Front Immunol*. 2020 Feb 18;11:227.
76. Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, et al. Syndecan-4 Deficiency Leads to High Mortality of Lipopolysaccharide-injected Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Dec;276(50):47483–8.
77. Sebestyén A, Gallai M, Knittel T, Ambrust T, Ramadori G, Kovalszky I. Cytokine Regulation of Syndecan Expression in Cells of Liver Origin. *Cytokine*. 2000 Oct;12(10):1557–60.

78. Lunde IG, Herum KM, Carlson CC, Christensen G. Syndecans in heart fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):539–52.
79. Tanino Y, Wang X, Nikaido T, Misa K, Sato Y, Togawa R, et al. Syndecan-4 Inhibits the Development of Pulmonary Fibrosis by Attenuating TGF- $\beta$  Signaling. *IJMS.* 2019 Oct 9;20(20):4989.
80. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains by Thrombin and Growth Factor Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry.* 1997 Jun;272(23):14713–20.
81. Manon-Jensen T, Multhaupt HAB, Couchman JR. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *The FEBS Journal.* 2013 May;280(10):2320–31.
82. Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, et al. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1072–6.
83. Barre PE, Redini F, Boumediene K, Vielpeau C, Pujol JP. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2000 Jan;8(1):34–43.
84. Bollmann M, Pinno K, Ehnold LI, Märtens N, Märtson A, Pap T, et al. MMP-9 mediated Syndecan-4 shedding correlates with osteoarthritis severity. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2021 Feb;29(2):280–9.
85. Patterson AM, Cartwright A, David G, Fitzgerald O, Bresnihan B, Ashton BA, et al. Differential expression of syndecans and glypicans in chronically inflamed synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2007 Aug 17;67(5):592–601.
86. Agere SA, Kim EY, Akhtar N, Ahmed S. Syndecans in chronic inflammatory and autoimmune diseases: Pathological insights and therapeutic opportunities. *Journal Cellular Physiology.* 2018 Sep;233(9):6346–58.
87. Bertrand J, Bollmann M. Soluble syndecans: biomarkers for diseases and therapeutic options. *British J Pharmacology.* 2019 Jan;176(1):67–81.

88. Busse-Wicher M, Wicher KB, Kusche-Gullberg M. The extostoin family: Proteins with many functions. *Matrix Biology*. 2014 Apr;35:25–33.
89. Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, et al. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat*. 2009 Dec;30(12):1620–7.
90. Roehl HH, Pacifici M. Shop talk: Sugars, bones, and a disease called multiple hereditary exostoses. *Developmental Dynamics*. 2010 Jun;239(6):1901–4.
91. Carter NM, Ali S, Kirby JA. Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *Journal of Cell Science*. 2003 Sep 1;116(17):3591–600.
92. Presto J, Thuveson M, Carlsson P, Busse M, Wilén M, Eriksson I, et al. Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Mar 25;105(12):4751–6.
93. Krenn V, Morawietz L, Burmester G, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*. 2006 Oct;49(4):358–64. 1.
94. Rošin M, Kelam N, Jurić I, Racetin A, Ogorevc M, Corre B, et al. Syndecans, Exostosins and Sulfotransferases as Potential Synovial Inflammation Moderators in Patients with Hip Osteoarthritis. *IJMS*. 2024 Apr 22;25(8):4557.
95. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jul;10(7):437–41.
96. Atukorala I, Kwok CK, Guermazi A, Roemer FW, Boudreau RM, Hannon MJ, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? *Ann Rheum Dis*. 2016 Feb;75(2):390–5.
97. 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 Mar;24(3):458–64.
98. Ishibashi K, Sasaki E, Ota S, Chiba D, Yamamoto Y, Tsuda E, et al. Detection of synovitis in early knee osteoarthritis by MRI and serum biomarkers in Japanese general population. *Sci Rep*. 2020 Jul 23;10(1):12310.

99. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jan;11(1):35–44.
100. Lopes EBP, Filiberti A, Husain SA, Humphrey MB. Immune Contributions to Osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*. 2017 Dec;15(6):593–600.
101. De Roover A, Escribano-Núñez A, Monteagudo S, Lories R. Fundamentals of osteoarthritis: Inflammatory mediators in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2023 Oct;31(10):1303–11.
102. Dainese P, Wyngaert KV, De Mits S, Wittoek R, Van Ginckel A, Calders P. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022 Apr;30(4):516–34.
103. Wood MJ, Miller RE, Malfait AM. The Genesis of Pain in Osteoarthritis: Inflammation as a Mediator of Osteoarthritis Pain. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2022 May;38(2):221–38.
104. Knights AJ, Redding SJ, Maerz T. Inflammation in osteoarthritis: the latest progress and ongoing challenges. *Current Opinion in Rheumatology*. 2023 Mar;35(2):128–34.
105. Najm A, Le Goff B, Venet G, Garraud T, Amiaud J, Biha N, et al. IMSYC immunologic synovitis score: A new score for synovial membrane characterization in inflammatory and non-inflammatory arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019 Jan;86(1):77–81.
106. Schmidt T, Najm A, Mussawy H, Burghardt R, Oehler N, Krenn V, et al. General synovitis score and immunologic synovitis score reflect clinical disease activity in patients with advanced stage rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2019 Jun 11;9(1):8448.
107. Zhu Z, Ling X, Zhou H, Xie J. Syndecan-4 is the key proteoglycan involved in mediating sepsis-associated lung injury. *Heliyon*. 2023 Aug;9(8):e18600.
108. Angsana J, Chen J, Smith S, Xiao J, Wen J, Liu L, et al. Syndecan-1 Modulates the Motility and Resolution Responses of Macrophages. *ATVB*. 2015 Feb;35(2):332–40.
109. Brauer R, Ge L, Schlesinger SY, Birkland TP, Huang Y, Parimon T, et al. Syndecan-1 Attenuates Lung Injury during Influenza Infection by Potentiating c-Met Signaling to Suppress Epithelial Apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Aug 1;194(3):333–44.
110. Voyvodic PL, Min D, Liu R, Williams E, Chitalia V, Dunn AK, et al. Loss of Syndecan-1 Induces a Pro-inflammatory Phenotype in Endothelial Cells with a Dysregulated Response to Atheroprotective Flow. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Apr;289(14):9547–59.

111. Teng YHF, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology*. 2012 Jan;31(1):3–16.
112. Chanalaris A, Clarke H, Guimond SE, Vincent TL, Turnbull JE, Troeberg L. Heparan Sulfate Proteoglycan Synthesis Is Dysregulated in Human Osteoarthritic Cartilage. *The American Journal of Pathology*. 2019 Mar;189(3):632–47.
113. Hattori Y, Hasegawa M, Iino T, Imanaka-Yoshida K, Sudo A. Role of Syndecan-4 in the Inhibition of Articular Cartilage Degeneration in Osteoarthritis. *Biomedicines*. 2023 Aug 12;11(8):2257.
114. Zhao J, Ye X, Zhang Z. Syndecan-4 is correlated with disease activity and serological characteristic of rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol*. 2022 Dec;62(1):21.
115. Godmann L, Bollmann M, Korb-Pap A, König U, Sherwood J, Beckmann D, et al. Antibody-mediated inhibition of syndecan-4 dimerisation reduces interleukin (IL)-1 receptor trafficking and signalling. *Ann Rheum Dis*. 2020 Apr;79(4):481–9.
116. Chou CH, Jain V, Gibson J, Attarian DE, Haraden CA, Yohn CB, et al. Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Sci Rep*. 2020 Jul 2;10(1):10868.
117. Harris WH. Traumatic arthritis of the hip after dislocation and acetabular fractures: treatment by mold arthroplasty. An end-result study using a new method of result evaluation. *J Bone Joint Surg Am*. 1969 Jun;51(4):737–55.
118. Wamper KE, Sierevelt IN, Poolman RW, Bhandari M, Haverkamp D. The Harris hip score: Do ceiling effects limit its usefulness in orthopedics?: A systematic review. *Acta Orthopaedica*. 2010 Dec;81(6):703–7.
119. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol*. 1988 Dec;15(12):1833–40.
120. McConnell S, Kolopack P, Davis AM. The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis & Rheumatism*. 2001 Oct;45(5):453–61.

121. Nilsson A, Bremander A. Measures of hip function and symptoms: Harris Hip Score (HHS), Hip Disability and Osteoarthritis Outcome Score (HOOS), Oxford Hip Score (OHS), Lequesne Index of Severity for Osteoarthritis of the Hip (LISOH), and American Academy of Orthopedic Surgeons (AAOS) Hip and Knee Questionnaire. *Arthritis Care & Research* [Internet]. 2011 Nov [cited 2024 Oct 27];63(S11). Available from: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.20549>
122. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care & Research* [Internet]. 2011 Nov [cited 2024 Oct 27];63(S11). Available from: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.20543>
123. Mussawy H, Zustin J, Luebke AM, Strahl A, Krenn V, R  ther W, et al. The histopathological synovitis score is influenced by biopsy location in patients with knee osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2021 Apr 10;142(11):2991–7.
124. Li S, Cao P, Chen T, Ding C. Latest insights in disease-modifying osteoarthritis drugs development. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal*. 2023 Jan;15:1759720X2311698.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Matko Rošin

Adresa: Osječka 5a

Telefon: 091 5334472

Elektronička pošta: mrosin@kbsplit.hr

Državljanstvo: Republika Hrvatska

Datum i mjesto rođenja: Split, 21. rujna 2024.

ORCID 0009-0001-6567-4714

### **OBRAZOVANJE:**

- osnovno – Split
- srednje – Centar za odgoj i obrazovanje djelatnika u kulturi i obrazovanju („Natko Nodilo“), Split, smjer: suradnik u kulturno-znanstvenim ustanovama
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - diplomirao 20.09.2001. (prosječna ocjena tijekom studija 4,22) i stekao zvanje doktora medicine

### **RADNO ISKUSTVO**

- 2002 – 2003. obvezni pripravnički staž za doktora medicine u KB Split
- 2002 – 2003. Kineziološki fakultet u Splitu, suradnik u nastavi iz područja kineziološke fiziologije

- 2003. – ordinacija opće medicine, Orebić, Dom zdravlja Korčula
- 2004 – liječnik specijalizant opće kirurgije na Klinici za kirurgiju KBC Split
- 2009 – 2015. liječnik specijalist opće kirurgije na Klinici za kirurgiju KBC Split
- 2015 – do sada: liječnik specijalist opće kirurgije s užom specijalizacijom iz traumatologije na Zavodu za ortopediju i traumatologiju Klinike za kirurgiju KBC Split

## **STRUČNO OBRAZOVANJE I PRAKSA**

- specijalizacija iz opće kirurgije 2004 – 2009. u KBC Split
- 07.05.2009. položio specijalistički ispit i stekao titulu specijalista opće kirurgije
- od 2009.g. zaposlen na Kliničkom odjelu za traumatologiju Zavoda za ortopediju i traumatologiju Klinike za kirurgiju KBC Split, kao liječnik - specijalist opće kirurgije
- staž iz uže specijalizacije iz traumatologije 2013 – 2015.
- 12.11.2015. položio subspecijalistički ispit iz traumatologije

## **ZNANSTVENO OBRAZOVANJE**

- polaznik poslijediplomskog doktorskog studija „Medicina utemeljena na dokazima“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu od 2008 - 2010.g.

## **PUBLIKACIJE**

A retrospective study of antibiotic prophylaxis value in surgical treatment of lower limb fracture. Bandalović A, Zindović A, Boschi V, Bakota B, Marinović M, Čoklo M, **Rošin M**, Parać Z, Čukelj F. Injury. 2015 Nov;46 Suppl 6:S67-72. doi: 10.1016/j.injury.2015.10.038. Epub 2015 Nov 14.

The Results of Internal Fixation of Proximal Humeral Osteoporotic Fractures with PHILOS Locking Plate. Bandalović A, Cukelj F, Knežević J, Ostojić M, Pavić A, Parać Z, **Rošin M**. Psychiatr Danub. 2014 Dec;26 Suppl 2:376-81.



**Rošin, M.**, Kelam, N., Jurić, I., Racetin, A., Ogorevc, M., Corre, B., Čarić, D., Filipović, N., & Vukojević, K. (2024). Syndecans, Exostosins and Sulfotransferases as Potential Synovial Inflammation Moderators in Patients with Hip Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 25(8), 4557. <https://doi.org/10.3390/ijms25084557>

#### **KONGRESNA IZLAGANJA I SAŽECI (objavljeno u časopisima):**

Frankić G, Bandalović A, Čukelj F, Pavić A, Knežević J, Boschi V, **Rošin M**, Parać Z Treatment of trochanteric femoral fractures: Our initial experience with proximal femoral nail antirotation (PFNA). 3rd Central European Congress of Surgery, Dubrovnik 2010. *Eur Surg* 2010; 42 (suppl. 235): 113

**Rošin M**, Juričić J, Bandalović A, Bilan K, Parać Z, Čukelj F, Pavić A. Preperitonealna tamponada zdjelice kod politraumatiziranih hemodinamski nestabilnih bolesnika s prijelomima zdjelice. 6. hrvatski kirurški kongres, Zagreb 2014. *Acta Chirurgica Croatica* 2014; 11 (suppl. 1); 50

#### **IZLAGANJA NA KONGRESIMA I SIMPOZIJIMA**

**Rošin M**, Bilan K, Bandalović A, Čukelj F, Parać Z, Lukšić B, Knežević J, Bekavac J, Roguljić L, Pavić A. Bicolunar volar variable-angle locking plates in treatment of distal radial fractures – evaluation of clinical experience in University hospital Split. 10th Central European Orthopaedic Congress & Congress of the Croatian Orthopaedic and Traumatology Association, Split, Croatia, 2014.

Čukelj F, Knežević J, Bandalović A, Pavić A, Boschi V, Bilan K, **Rošin M**, Parać Z, Lukšić B, Roguljić L, Bekavac J. Treatment of trochanteric femoral fractures: our experience and complications with Proximal Femoral Nail Antirotation (PFNA). 10th Central European Orthopaedic Congress & Congress of the Croatian Orthopaedic and Traumatology Association, Split, Croatia, 2014.

**Rošin M**. Treatment of hemodynamically unstable patients with pelvic ring injuries – introduction of guidelines in the local clinical practice (with examples). 5. Hrvatski traumatološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska, 2017.

**Rošin M**. Can we improve treatment and care of patients with hip fractures? – comparison of guidelines, registries and local practice. 5. Hrvatski traumatološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska, 2017.

**Rošin M**, Čarić D, Bandalović A. Traumatic periprosthetic multifragmentary posterior wall and dome acetabular fracture with cup dislocation: a case report. 6. kongres Hrvatskog traumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, Hrvatska, 2022.

Bandalović A, Poljak D, Lukšić B, **Rošin M**. Septic arthritis of pubic symphysis in athletes: a case report of 19 years old soccer player and a review of literature. 6. kongres Hrvatskog traumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, Hrvatska, 2022.

Čarić D, **Rošin M**, Knežević J. Periprosthetic hip fractures after total hip arthroplasty – an overview and clinical examples. Hip à la carte, Osijek, Hrvatska 2023.

## **STRUČNO USAVRŠAVANJE**

- Laparoscopska kirurgija koledokusa, Bjelovar 2005.
- Rane: postupci liječenja, Zagreb 2007.
- Metode liječenja vaskularne i endovaskularne kirurgije, Supetar 2008.
- AO trauma course: Principles in Operative Fracture Management, Zagreb 2009.
- AO trauma course: Pelvis and Acetabulum, Graz 2010.
- Polytrauma Symposium, Zagreb 2013.
- AO trauma Advanced Course – Pelvic (with practical excersises on human specimens), Graz 2013.
- Special problems in Upper and Lower Extremity Surgery Symposium, Split 2014.
- AO trauma Course – Upper Extremity, Zagreb 2014.
- AO trauma Course – Lower Extremity, Zagreb 2015.
- AO foundation – Faculty education program, Prag, 2017.
- AO Trauma Course – Acetabular and Pelvis Fracture Management, Rijeka, 2019.

## **EDUKACIJSKE AKTIVNOSTI**

- Medicinski fakultet u Splitu, Katedra za kirurgiju, asistent u nastavi, 2013 – 2024.
- AO Trauma – predavač i demonstrator na osnovnim i naprednim međunarodnim tečajevima iz ortopedske traumatologije 2016 - 2024.
- Federation of Orthopaedic and Trauma Trainees in Europe (FORTE) 7th Summer School, Split 2024. (predavač)

## **POSEBNI INTERESI U STRUCI**

- prijelomi zdjelice i acetabula
- politrauma

## **ČLANSTVO U STRUČNIM UDRUGAMA**

- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatsko traumatološko društvo
- AO foundation / AO Trauma

## **MATERINSKI JEZIK**

- hrvatski jezik

## **OSTALI JEZICI**

- engleski jezik