

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Jelena V. Francuski

***EX VIVO* KARAKTERISTIKE
MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA
IZOLOVANIH IZ SINOVIJALNE TEČNOSTI
KOLENOG ZGLOBA PASA RAZLIČITE
STAROSTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jelena V. Francuski

**AGE RELATED *EX VIVO*
CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL
STEM CELLS ISOLATED FROM CANINE
STIFLE JOINT SYNOVIAL FLUID**

PhD thesis

Belgrade, 2014.

Članovi komisije,

Mentor: **Dr Milica Kovačević Filipović**, vanredni profesor Fakulteta veterinarske medicine,
Univerziteta u Beogradu

Dr Anita Radovanović, vandredni profesor Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u
Beogradu

Dr Mirjana Lazarević Macanović, vandredni profesor Fakulteta veterinarske medicine,
Univerziteta u Beogradu

Dr Goran Tulić, vandredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ovo je poseban kutak za sve one bez čije pomoći ovo ne bi bilo ostvarljivo

Zahvaljujem se svima koji su mi pružili stručnu, materijalnu i psihološku podršku prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Od srca vam dugujem

Posebna zahvalnost:

Prof. dr Milici Kovačević Filipović i Prof. dr Aniti Radovanović, na bezuslovnoj pomoći prilikom izrade i pisanja ove teze kao i podršci koju su mi pružile kao mentori i kao prijatelji onda kada je bilo najteže..... i svemu što su me naučile.

Prof. dr Mirjani Lazarević Macanović na stručnoj i moralnoj podršci prilikom izrade eksperimentalnog dela ove teze.

Doc. dr Nenadu Andriću na nesebičnoj trpeljivosti, razumevanju i podstreku da nikada ne odustajem od svog cilja i na velikoj pomoći koju mi je pružio prilikom eksperimentalnog rada.

Svom nastavnom i nenastavnom osoblju Katedre za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači na velikoj pomoći i podršci koju su mi pružili kako bi cilj ove disertacije bio sproveden u delo. Zahvaljujem se na svemu što su me naučili i što su od mene napravili veterinaru

Mojim profesorima i prijateljima iz Francuske: Prof. dr Jerome Guicheux, Prof. dr Olivier Gauthier, Prof. dr Sarah Beck-Cormier i Sophie Sourice Petit sa Fakulteta veterinarske medicine u Nantu i Laboratorije za Osteo-artikularni inženjering INSERM u Nantu na svemu što su me naučili o regeneraciji hrskavice i tehnikama in situ hibridizacije i imunohistohemije.

Prof. dr Tatjani Božić, velikom čoveku i pravom prijatelju, ženi koja mi pomogla da istrajem i opstanem.

Dr Jasmini Debeljak Martačić, na svojoj pomoći i korisnim savetima koje mi je pružila prilikom uzgajanja ćelija, kao i na vremenu i trudu koji je uložila da ovu tezu završim.

Veliko HVALA dugujem

Svojim kolegama **Dr vet. med. Vladimiru Hadžiću** i **Dr vet. med. Milanu Vidakoviću**, koji su mi pružili maksimalnu pomoć prilikom uzorkovanja materijala kao i na svim kasnim satima koje su proveli sa mnom da bih ostvarila ovaj cilj.

Svom prijatelju **Siniši Rodiću**, na velikom poverenju i podršci koju mi je pružio kao i na materijalnoj pomoći u ostvarenju ovog cilja.

Obradu Đokiću na velikoj stručnoj pomoći iz oblasti kinologije.

Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Srbije koje je finansijski podržalo izradu ove doktorske disertacije (projekat **Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja**, broj 175061)

COST projektu (European Cooperation in Science and Tehnology) i projektu **Pavle Savić** za pruženu materijalnu pomoć

Mojim najmilijima:

Ocu, majci i baki, koji su me uvek podržavali i koji su mi stvorili ambijent pun ljubavi. Hvala vam što ste izdržali moje odsustvo tokom mnogih noći i vikenda za vreme izrade ove disertacije i što ste razumeli moju ljubav ka veterini. Vi ćete uvek ostati najveće ljubavi mog života.

Ovu tezu posvećujem svima vama

Jelena

***Ex vivo* karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti kolenog zgloba pasa različite starosti**

REZIME

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi: da li ćelije izolovane iz sinovijalne tečnosti (ST) sadrže ćelije koje imaju fenotipske i funkcionalne karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija (MMĆ), kao i da se *in vivo* ispita njihov hondrogeni potencijal, uporede karakteristike izolovanih matičnih ćelija (MĆ) tokom starenja i okarakterišu zglobne strukture kolenog zgloba pasa kako bi se definisale promene vezane za starenje.

Uzorci ST, sinovijalne membrane (SM) i hrskavice sa subhondralnom kosti uzeti su iz kolenog zgloba 28 pasa rase nemački ovčar, muškog pola, koji su prema uzrastu i nivou fizičke aktivnosti svrstani u 4 grupe: mladi radni policijski psi (n = 4) i mladi neradni vlasnički psi (n = 5) starosti 3-5 godina; stari radni policijski psi (n = 13) starosti 10-12 godina i stari neradni vlasnički psi (n = 6) starosti 10-13 godina. Kultura adherentnih ćelija je uspostavljena iz ST 5 mladih i 5 starih radnih pasa. Adherentne ćelije su uzgajane tokom 3 nedelje pre određivanja CD90 i CD34 molekula metodom protočne citometrije. Istovremeno, ispitano je njihovo vreme udvajanja u kulturi (PTD), broj CFU-F i aktivnost markera starenja β -galaktozidaze. Adipogeni, osteogeni i hondrogeni potencijal su ispitani nizom imunocitohemijskih, biohemijskih, imunohistohemijskih i molekularnih metoda. Hondrogeni potencijal reprezentativnog uzorka ćelija je ispitano i metodom ksenotransplantacije umnoženih ćelija imunodeficientnim miševima. Da bi se stekao sveobuhvatni uvid u promene koštano-zglobnog sistema tokom procesa starenja i da bi se ustanovio mogući značaj fizičke aktivnosti za nastanak ovih promena, pored kliničkog pregleda, izvršeno je radiološko ispitivanje oba kolena zgloba, zgloba kuka i lumbosakralnog dela kičme, makroskopski pregled svih zglobnih struktura kao i histološka i imunohistohemijska (IHH) analiza hrskavice i SM. Sinovijalna tečnost je ispitana sa citološkog i biohemijskog aspekta kako bi se isključilo prisustvo inflamacije. Ukupna debljina hrskavice, broj hondrocita na vertikalnom preseku, njihova gustina i površina određeni su histomorfometrijski. Analiziran je i izgled površine hrskavice, oblik hondrocita, morfologija izogenih grupa, zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice, subhondralna kost i zastupljenost proteoglikana i glikozamioglikana (PG/GAG). Na SM, procenjivan je broj slojeva ćelija, prisustvo prstolikih nabora i ćelijske infiltracije. Imunohistohemijski je ispitivano prisustvo i distribucija kolagena tipa I, II i X u hrskavici i CD44 molekula u sinovijalnoj membrani.

U trećoj pasaži, 66% ćelija je eksprimiralo CD90 marker, dok su ćelije bile negativne na prisustvo CD34 markera. Kod starih pasa fenotipizacija nije urađena jer je broj ćelija u kulturi bio previše nizak za ovaj tip analize. Ćelije izolovane iz ST mladih pasa su imale prosečno vreme udvajanja 31 sat, a kod starih 46.5 sati. Stariji psi su imali više β -galaktozidaza pozitivnih ćelija u odnosu na mlade pse. CFU-F test je pokazao da između mladih (0.55 ± 0.05 %) i starih pasa (0.43 ± 0.23 %) nema značajnih razlika u broju ćelija sposobnih da formiraju kolonije, ali sa starenjem opada brzina udvajanja ćelija u kulturi. Adipogeneza je bila slabo indukovana, što je pokazano Oil Red O bojenjem. Aktivnost alkalne fosfataze (dokazana biohemijski i citohemijski) se povećavala sa starenjem, kao i sposobnost deponovanja soli kalcijuma (dokazano bojenjem Alizarin crvenim). U hondrogenom i kontrolnom medijumu, ćelije su formirale pelete u kojima je bojenjem sa alcijan plavim dokazano prisustvo velike količine sulfatisanih glikozaminoglikana (sGAG), a IHH prisustvo kolagena tipa II. *In situ* hibridizacijom pokazana je ekspresija mRNA kolagena tipa I na površini peleta. Posle tronedeljne *in vitro* hondrogene diferencijacije, dokazano je da ispitivane ćelije *in vivo* zadržavaju potencijal ka hondrogenezi s obzirom da su nakon 6 nedelja po transplantaciji i dalje sintetisale komponente ECM karakteristične za hrskavicu. Uočeno je da sa starenjem dolazi do smanjivanja debljine hrskavice tibije, hipertrofije hondrocita površinske i srednje zone hrskavice femura i ekspresije kolagena tipa X u nekalcifikovanoj hrskavici femura i tibije, što ukazuje na postojanje degenerativnih promena. Fizička aktivnost je imala pozitivan uticaj na očuvanje strukture hrskavice tokom starenja i uslovlila je lokalnu pojavu dugih prstolikih nabora na sinovijalnoj membrani. Samo starenje je bilo povezano sa mestimičnim povećanjem broja slojeva ćelija intime SM.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ST sadrži ćelije koje imaju karakteristike mezenhimalnih progenitora sa jakim hondrogenim potencijalom, što otvara mogućnost njihove primene u terapiji oboljenja hrskavice. Na hrskavici se usled starenja javljaju degenerativne promene dok umerena fizička aktivnost ima pozitivan uticaj na očuvanje strukture hijaline hrskavice tokom starenja.

Ključne reči: hrskavica, hondrogeneza, mezenhimalne matične ćelije, pas, sinovijalna tečnost.

Naučna oblast: veterinarska medicina

Uža naučna oblast: matične ćelije

UDK broj: 619:636.7.75:612.08

Age related *ex vivo* characteristics of mesenchymal stem cells isolated from canine stifle joints synovial fluid

ABSTRACT

The aim of this study was to determine: whether synovial fluid (SF) of dogs contains cells that have phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs), to investigate there *in vivo* chondrogenic potential, to compare MSCs characteristics during aging and to define the changes associated with aging in stifle joints structures.

Samples of SF, synovial membrane (SM) and cartilage with subchondral bone were taken from the 28 German Shepherd dogs, all males, who were assigned to four groups according to their age and physical activity: young working military dogs (n = 4) from 3 to 5 years old (3.8 ± 0.9); young non-working client-owned dogs (n = 5) from 3 to 5 years old (3.8 ± 0.8); aged working military dogs (n = 13) from 10 to 12 years old (10.5 ± 0.7) and aged non-working, client-owned dogs (n = 6), from 10 to 13 years old (11 ± 1.5). Canine SF adherent cells (cSFSc) from 5 young and 5 aged dogs were expanded (37°C , 5% CO_2 , humidified atmosphere) for three weeks before their phenotypes were characterized by flow-cytometry for the presence of CD90 and CD34. At the same time, population doubling time (PDT), number of CFU-F and SA- β -galactosidase activity (marker of cell ageing) have been determined. Adipogenic, osteogenic and chondrogenic potentials have been tested using immunocytochemical, biochemical, immunohistochemical (IHC) and molecular methods. Chondrogenic potential of representative cell samples was examined using xenotransplantation method in immunodeficient mice.

In order to gain a comprehensive insight into the age related changes of musculoskeletal system and to determine the possible role of physical activity for the occurrence of these changes, in addition to clinical examination, radiological examination of both stifle and hip joints and lumbosacral part of the spine, macroscopic examination of all stifle structure as well as histological and IHC analysis of cartilage and SM was performed. SF cytological and biochemical analysis were done in order to exclude the presence of joint inflammation. The whole cartilage thickness, total chondrocytes number per vertical section, chondrocyte density and chondrocyte surface area in each cartilage zone were determined by histomorphometry. It was also analyzed: the appearance of the cartilage surface, chondrocyte shape and isogenous group morphology, tidemark morphology, subchondral bone structure and PG/GAG content. On SM, it was evaluated the number of cell layers, the presence of short and finger-like villi and the presents of cell infiltration. The presence and distribution of

collagen type I, II and X in cartilage and expression of CD44 molecule in SM was determined using IHC.

In third passage, 66% of cells expressed CD90 marker while being negative for the presence of CD34 marker. Aged dogs cells were not phenotyped due to low number of cells in the culture. In young dogs PTD was 31 hours and 46.5 hours in aged dogs. Aged dogs had higher β -galactosidase-positive cells compared to young dogs. CFU-F test showed no significant difference in the number of cells able to form colonies between young ($0.55 \pm 0.05\%$) and aged dogs ($0.43 \pm 0.23\%$). Oil red O staining shown weak adipogenesis in both young and aged dogs. Using biochemical and immunocytochemical methods it was demonstrated that alkaline phosphatase activity increased with aging as well as the ability for deposition of calcium salts, shown by alizarin red staining. In chondrogenic and control medium, cSFSc formed cartilage-like tissue (pellets) in which alcian blue staining have shown significant amount of glycosaminoglycans (GAGs) and IHC analysis collagen type II expression. *In situ* hybridization shown mRNA collagen type I expression at the surface of pellets. After 3 weeks of *in vitro* chondrogenic differentiation it was show that expanded cells retain chondrogenic potential given that after the 6 weeks of transplantation they continue to synthesize characteristic hyaline cartilage ECM components. It was observed that aging, leads to: thinning of tibial cartilage, hypertrophy of chondrocytes in the femoral superficial and intermediate zone and type X collagen expression in femoral and tibial non-calcified cartilage indicating the presence of slight degenerative changes. Physical activity had positive influence on preservation of cartilage integrity during aging while in SM caused the local occurrence of finger-like villi that formed in response to prolonged physical activity. Only aging was associated with local increase in the number of cell layers in SM intima.

In conclusion, SF contains cells that have characteristics of mesenchymal progenitors with strong chondrogenic potential enabling their potential use in the treatment of cartilage diseases. Aging leads to cartilage degenerative changes which only provide an opportunity for the development of OA, whereas moderate physical activity has a positive impact on the preservation of cartilage structure during aging.

Key words: cartilage, chondrogenesis, dog, mesenchymal stem cells, synovial fluid.

Scientific field: veterinary medicine

Narrow scientific field: stem cells

UDK number: 619:636.7.75:612.08

LISTA SKRAĆENICA

2D - dvodimenzionalni uslovi

3D - trodimenzionalni uslovi

AA - antibiotik antimikotik rastvor

ADAMTS - engl. *Adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*

AFBP/aP2 - engl. *Anti-adipocyte fatty acid binding protein*

ANK - engl. *Cell associated ankylosisprotein*

AP - Alkalna fosfataza

BCA - engl. *Bicinchoinic Acid*

BMP - *Bone morphogenetic protein*

BSA - engl. *Bovine Serum Albumine*

BSP - Koštani sialoprotein

C/EBP α - engl. *CAAT/enhancer binding protein α*

C/EBP β - engl. *CAAT/enhancer binding protein β*

CD - engl. *clusters of differentiation*

cDNK - engl. complementary DNK

CFU-F - engl. *Colony Forming Unit - Fibroblasts*

COMP - engl. *Cartilage oligomeric matrix protein*

cSFSc - engl. *Canine mesenchimal stem cells*

DIG - Digoksigenin

DMEM - engl. *Dulbecco Modified Eagles Medium*

ECM - Ekstracelularni matriks

EDTA - Etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina

EGF - engl. *Epidermal grow factor*

EPR - Endoplazmatski retikulum

FBS – engl. *Fetal bovine serum*

FGF - engl. *Fibroblast growth factor*

FVMUB - Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

GA - Goldžijev aparat

GAG - Glikozaminoglikani

HK - Hijaluronska kiselina

IA - Infektivni artritis

IGF - engl. *Insulin-like growth factor*

IHH - imuno histohemija
IHH (protein) – *Indian hedgedoh (protein)*
IL - Interleukin
ISCT- engl. *The International Society for Cellular Therapy*
ISH - *In situ* hibridizacija
ITS - Insulin-tranferin-selenit
MAPĆ - Multipotentne adultne progenitorske ćelije
MĆ - Matične ćelije
MIAMI - engl. *Marrow-isolated adult multilineage inducible*
mitRNK - Mitohondrijalna RNK
MMĆ - Mezenhimalne matične ćelije
MMP - Matriks metalo proteinaze
MPĆ - Mezodermalne progenitorske ćelije
N-CAM - engl. *Neural cell adhesion molecule*
NIPP - Neerozivni imunski posredovani poliartritis
OA - Osteoartritis
OARSI - engl. *Osteoarthritis Research Society International*
OC - Osteokalcin
ON - Osteonektin
OP - Osteopontin
OSX – Osterix
P/MĆ - Progenitori matičnih ćelija
PBS - engl. *Phosphate buffered saline* – fosfatni pufer
PcG - engl. *Polycomb proteins group*
PDT - engl. *Population doubling time*
PG - Proteoglikani
Pi - Neorganski fosfat
pNPP - p-nitrofenil-fosfat
PPAR γ - engl. *Peroxisome proliferator activated recceptor γ*
PPi - Neogranski pirofosfat
Pref-1 - Preadipocitni faktor 1
PRELP - engl. *Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein*
PTHrP - *Parathyroid hormone related peptide*
RA - Reumatoidni artritis

Rev - revijalni rad

RT-PCR - engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*

RUNX2 - engl. *Runt-related Transcription Factor 2*

SA- β -gal - engl. *Senescence-associated β -galactosidase*

sGAG - Sulfatisani glikozaminoglikani

SHH - engl. *Sonic hedgehog*

SIBLING - engl. *Small Integrin-binding Ligandn-linked glycoprotein*

SLRPs - engl. *Small leucine-rich repeat proteoglycans*

SM - Sinovijalna membrana

Sox - engl. *Sex related Y-type high-mobility-group box*

ST - Sinovijalna tečnost

SZP - engl. *Superficial zone protein*

TGF- β - engl. *Transforming Growth Factor- β*

TNCC - engl. *Total nucleated cell count*

TNF- α - Faktor nekroze tumora α

TSP - Trombospondini

VEGF - engl. *Vascular endothelial growth factor*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Matične ćelije: pojam, definicija i samoobnova.....	4
2.2. Podela matičnih ćelija	5
2.3. Niša matičnih ćelija	6
2.4. Mezenhimalne matične ćelije.....	7
2.4.1. Karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija.....	9
2.4.2. Potencijali za diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija.....	9
2.4.3. Adipogeneza.....	10
2.4.4. Osteogeneza	11
2.4.5. Hondrogeneza.....	13
2.5. Plastičnost mezenhimalnih matičnih ćelija	20
2.6. Matične ćelije poreklom iz sinovijalne membrane i sinovijalne tečnosti	23
2.7. Starenje i biomarkeri ćelijskog starenja	25
2.8. Matične ćelije u veterinarskoj medicini	27
3. Anatomske, histološke i fiziološke karakteristike struktura kolenog zgloba pasa	29
3.1. Sinovijalna tečnost	29
3.2. Upotreba biomarkera u dijagnostici oboljenja zglobova.....	32
3.2.1. Serum amiloid A (SAA).....	32
3.3. Zglobna hrskavica	33
3.3.1. Histološka građa zglobne hrskavice	34
3.3.2. Sastav zglobne hrskavice	35
3.3.2.1. Hondrociti.....	35
3.3.2.2. Kolagena vlakna.....	36
3.3.2.3. Proteoglikani, glikozaminoglikani i njihovi receptori.....	38
3.3.3. Mehanička svojstva i uticaj fizičke aktivnosti	41
3.3.4. Uticaj starenja i degenerativne promene	42
3.3.5. Patofiziologija osteoartritisa.....	44
3.4. Zglobna kapsula	45
3.5. Struktura sinovijalne membrane.....	45
4. Ćelijska terapija i tkivni inženjering u tearpiji artropatija	47
5. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	51

6. MATERIJAL I METODE	53
6.1. Životinje	53
6.2. Opšti klinički, ortopedski i neurološki pregled pasa	54
6.3. Radiološko ispitivanje	54
6.4. Uzorkovanje i analiza sinovijalne tečnosti.....	54
6.5. Izolacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz sinovijalne tečnosti.....	55
6.6. Vreme udvajanja broja ćelija u kulturi	56
6.7. Određivanje CFU-F.....	56
6.8. Određivanje fenotipa ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti.....	56
6.9. Diferencijacija ćelija <i>in vitro</i>	57
6.9.1. Adpigena diferencijacija i Oil Red O bojenje	57
6.9.2. Osteogena diferencijacija	58
6.9.2.1. Određivanje aktivnosti enzima alkalne fosfataze u ćelijskom lizatu	59
6.9.2.2. Imunocitohemijsko određivanje prisustva alkalne fosfataze	59
6.9.2.3. Bojenje alizarin S crvenim	59
6.9.3. Hondrogena diferencijacija	60
6.9.3.1. Uzgajanje ćelija u trodimenzionalnim (3D) uslovima	60
6.9.3.2. Histološka i imunohistohemijska analiza peleta	60
6.9.3.3. Uzgajanje ćelija u adherentnoj kuturi (2D).....	61
6.9.4. <i>In vivo</i> hondrogeni potencijal	61
6.9.5. Određivanje koncentracije sGAG	62
6.9.6. Kvantifikacija DNK	62
6.9.7. Koncentracija proteina u ćelijskom lizatu.....	62
6.10. Ispitivanje prisustva β -galaktozidaze	63
6.11. Makroskopski pregled zglobnih struktura i način uzorkovanja hrskavice i sinovijalne membrane	63
6.12. Histološka analiza hrskavice i sinovijalne membrane.....	65
6.13. Imunohistohemijska analiza hrskavice i sinovijalne membrane	67
6.14. <i>In situ</i> hibridizacija.....	67
6.14.1. Postupak sinteze RNK proba.....	68
6.14.2. Tehnika izvođenja <i>in situ</i> hibridizacije	68
6.15. Statistička analiza.....	68
7. REZULTATI	70
7.1. Opšti klinički, ortopedski i neurološki pregled	70

7.2. Radiološko ispitivanje	70
7.3. Analiza sinovijalne tečnosti	71
7.4. Proliferacija ćelija	71
7.5. Ekspresija površinskih markera	73
7.6. Diferencijacija mezenhimalnih matičnih ćelija	73
7.6.1. Adipogena diferencijacija	74
7.6.2. Osteogena diferencijacija	76
7.6.3. Hondrogena diferencijacija	77
7.6.4. <i>In vivo</i> hondrogeni potencijal ćelija	80
7.7. Određivanje aktivnosti β-galaktozidaze tokom kultivacije ćelija	81
7.8. Makroskopski pregled zglobnih struktura	83
7.9. Histološka i histomorfometrijska analiza zglobne hrskavice	83
7.10. Bojenje proteoglikana i glikozaminoglikana u zglobnoj hrskavici	95
7.11. Imunohistohemijska analiza kolagena u zglobnoj hrskavici	95
7.12. Procena histoloških promena na zglobnoj hrskavici prema OARSI sistemu	97
7.13. Procena histoloških promena na sinovijalnoj membrani prema OARSI sistemu	97
7.14. Imunohistohemijska analiza sinovijalne membrane	101
8. DISKUSIJA	102
8.1. Sinovijalna tečnost sadrži ćelije koje imaju karakteristike MPC	102
8.1.1. Ćelije sinovijalne tečnosti mladih pasa brže proliferišu od ćelija starih pasa	103
8.1.2. Više od polovne ćelija sinovijalne tečnosti eksprimira CD90	105
8.1.3. Ćelije sinovijalne tečnosti imaju visok hondrogeni potencijal	107
8.1.4. Mladi psi imaju veći broj ćelija u sinovijalnoj tečnosti koje nemaju znake starenja u odnosu na stare pse	109
8.2. Hrkavica mladih i starih pasa ima uočljive morfološke razlike	110
8.3. Sinovijalna membrana mladih i starih pasa nema uočljivih morfoloških razlika	115
9. ZAKLJUČCI	116
10. LITERATURA	117
11. PRILOG	129

1. UVOD

Mezenhimalne matične ćelije (MMC) su ćelije koje imaju veliki proliferativni potencijal i koje se mogu diferencirati u ćelije različitih tkiva, na prvom mestu u adipocite, osteoblaste i hondrocite. Ove osobine čine MMC atraktivnim za primenu u ćelijskoj terapiji i regenerativnoj medicini koštano-zglobnog sistema. Mezenhimalne matične ćelije se mogu izolovati iz svih tkiva koja u sebi sadrže vezivno-tkivne komponente, ali njihove funkcionalne karakteristike u koje spadaju sposobnost samoobnove, proliferativni potencijal i potencijal za diferencijaciju u navedene ćelijske tipove zavise od vrste tkiva iz kog su izolovane.

Dosadašnjim istraživanjima je dokazano da praktično sva tkiva odraslih organizama sadrže populaciju MMC. U tkiva najbogatija MMC u postnatalnom periodu se ubrajaju kostna srž, masno tkivo i različita tkiva u vezi sa razvojem zuba (*Bianco i sar., 2010*). *In vivo*, MMC učestvuju u obnavljanju i reparaciji različitih tkiva, ali čak i njihova maksimalna aktivacija tokom patoloških promena velikog obima ne može da dovede do regeneracije oštećenog hrskavičavog ili koštanog tkiva (*Caplan i Correa, 2011*). Terapijski potencijal MMC leži u činjenici da uprkos njihovom relativno malom broju u tkivima, *in vitro* ove ćelije imaju veliki proliferativni potencijal i mogućnost samoobnove, što omogućava njihovu dugotrajnu *in vitro* ekspanziju i značajnu mogućnost obnavljanja pojedinih tkiva posle *ex vivo* ekspanzije (*Bianco i sar., 2010*). Eksperimentima izvedenim u *ex vivo* i *in vivo* je pokazano da posle *ex vivo* ekspanzije, ove ćelije imaju antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva (*Kaplan i sar., 2011*), kao i da luče brojne faktore rasta koji mogu stimulisati regeneraciju različitih tkiva posle oštećenja (*Meirelles i sar., 2009*). Osim toga, po stimulaciji određenim biološki aktivnim molekulima, one se *ex vivo* mogu diferencirati u ćelije koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva i mogu se koristiti u tkivnom inženjeringu (*Bianco i sar., 2010*). Zbog toga je *ex vivo* manipulacija MMC jedan od načina da se njihov veliki regenerativni kapacitet najbolje iskoristi u terapijske svrhe.

Kod pasa su do sada izolovane MMC iz kostne srži (*Csaki i sar., 2007*), masnog tkiva (*Martinello i sar., 2011, Reich i sar., 2012*), različitih tkivnih struktura u vezi razvoja zuba (*Dissanayaka i sar., 2011*) i delimično iz sinovijalne tečnosti (*Krawetz i sar., 2011*). U ovoj jednoj jedinoj studiji o karakteristikama MC poreklom iz sinovijalne tečnosti pasa podaci su vrlo oskudni jer su dobijeni na dva psa upoređivanjem promena kod OA u sklopu proučavanja istih promena kod ljudi. Jedan od ciljeva izolacije i

karakterizacije MĆ je njihova primena u terapiji oštećenja hrskavice kod različitih oblika OA pasa (*Guercio i sar., 2012*). Istraživanja mogućnosti primene MMĆ u terapiji OA se intenzivno sprovode i u humanoj medicini (*Perera i sar., 2012*), pa su ispitivanja na životinjama važna i sa aspekta mogućnosti korišćenja rezultata u humanoj ortopediji. Osim toga, Međunarodno udruženje za proučavanje osteoartritisa (OARSI) preporučilo je psa kao model za proučavanje OA ljudi. Ipak, uzimanje uzoraka kostne srži, masnog tkiva ili sinovijalne membrane, kao tkiva iz kojih se mogu izolovati MMĆ, predstavljaju invazivne procedure koje dovode do oštećenja tkiva i zahtevaju opštu anesteziju životinje. S druge strane sva nabrojana tkiva, osim sinovijalne membrane, imaju varijabilan hondrogeni potencijal (*McGonagle i Jones, 2008*) te je kao izvor ćelija za regeneraciju hrskavice potrebno odabrati tkiva koja ontogenetski imaju potencijal da se razviju u hrskavicu, kao što je perihondrijum, ili čak i ST.

Veoma mali broj istraživanja je posvećen ispitivanju MMĆ poreklom iz ST i ona su do sada izvedena na govedima, ovcama i ljudima (*Jones i sar., 2008; Morito i sar., 2008*). Sinovijalna tečnost je lako dostupna i prilikom njenog uzorkovanja ne dolazi do oštećenja tkiva. Sinovijalna tečnost nastaje kao ultrafiltrat krvne plazme obogaćen hijaluronskom kiselinom koju stvaraju sinoviociti tipa B. U njoj se nalaze i mononuklearne ćelije koje prema važećem shvatanju predstavljaju ćelije odlupljene od intime SM. Poznato je da hijalina hrskavica diartroza kunića ima veliki regenerativni kapacitet zahvaljujući činjenici da je prekrivena sinovijalnom membranom koja sadrži populaciju ćelija sa velikim hondrogenim potencijalom koja verovatno pripada MMĆ (*Hunziker i Rosenberg, 1996*). Nasuprot kunićima, kod ljudi i pasa građa hijaline hrskavice je takva da nema direktan kontakt sa sinovijalnom membranom (*Hunziker i sar., 2002*). Zbog toga je od velikog interesa proceniti da li su u ST pasa različitih starosnih kategorija, zastupljene MMĆ i kakav je njihov potencijal, na prvom mestu za hondrogenezu, a potom i osteogenezu i adipogenezu. Iako sva dosadašnja istraživanja ukazuju na to da u ST postoje MMĆ i da one imaju izuzetan hondrogeni potencijal, razlike između vrsta (*McGonagle i Jones, 2008*) i starosnih kategorija (*Stolzing i sar., 2008*) bi mogle da budu značajne i da utiču na njihovu moguću terapijsku primenu. Iz tih razloga tokom ispitivanja bilo je najvažnije utvrditi potencijal ovih ćelija da *in vivo* proliferišu i da se diferencijuju u hondrocyte koji mogu da sintetišu ekstarcelularni matriks karakterističan za hijalnu hrskavicu.

Tokom starenja dolazi do opadanja regenerativnih kapaciteta tkiva i postavlja se pitanje da li i matične ćelije koje su odgovorne za regeneraciju stare i da li se matične

ćelije starijih jedinki mogu iskoristiti u cilju autologe ćelijske terapije? Osim toga, postavlja se pitanje kakve se tačno promene tokom starenja dešavaju na hrskavici koja ima veoma neobičnu građu koja podrazumeva nedostatak krvnih sudova i nervnih vlakana na zapremini od nekoliko milimetara kubnih tkiva. Poznavanje građe hrskavice starih i mladih pasa može da pomogne u prepoznavanju onih odlika hondrogenih ćelija koje mogu da dovedu do stvaranja takvog tkiva koje može da preuzme funkciju oštećene hrskavice.

Kako pas nije samo najveći prijatelj čoveka, već i preporučen model za proučavanje promena na koštano-zglobnom sistemu, ovo istraživanje je sprovedeno sa ciljem da njegovi rezultati posluže i za unapređenje terapije OA samih pasa, ali i ljudi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Matične ćelije: pojam, definicija i samoobnova

U poslednjih nekoliko godina matične ćelije (MĆ) izazivaju veliku pažnju javnosti i naučne zajednice zbog njihove potencijalne primene u terapiji različitih patoloških stanja kako kod ljudi tako i kod životinja. Naziv mezenhimalne matične ćelije je popularizovao Caplan na osnovu sopstvenih istraživanja (*Caplan i Correa, 2011*) i istraživanja Friedenstein-a i Owen-a (*Friedenstein i sar., 1970*) koji su opisali prisustvo ćelija fibroblastoidnog oblika koje adheriraju na plastiku. Sam pridev „mezenhimalne“ je dosta nejasan jer ukazuje da su te ćelije povezane sa mezenhimom koga zapravo nema kod odraslih jedinki, ali kako je termin brzo opšte prihvaćen u naučnoj zajednici, nije nikada promenjen.

Matične ćelije se definišu kao nediferentovane ćelije koje imaju sposobnost da održavaju sopstvenu populaciju procesom samoobnove, imaju veliki proliferativni potencijal i mogu se diferencirati u najmanje jedan tip ćelija (*Verfaillie i sar., 2002*).

Šezdesetih godina prošlog veka *McCulloch i Till* su prvi pokazali klonalnost hematopoetskih ćelija izolovanih iz kostne srži. Deceniju kasnije, *Alexandar Friedenstein* (*Friedenstein i sar., 1966, 1970*) je to potvrdio na stromalnim ćelijama izolovanim iz kostne srži uz pomoć nekoliko različitih eksperimentalnih pristupa. On je dokazao da se među stromalnim adherentnim ćelijama nalaze ćelije koje *in vivo* mogu da se diferenciraju u stromu kostne srži, osteoblaste i hondrocite, a *in vitro* formiraju kolonije fibroblasta. Prema tada već uvedenoj terminologiji za opisivanje ranih prethodnika krvnih ćelija, ćelije koje formiraju kolonije sastavljene od fibroblasta nazvane su *Colony Forming Unit - Fibroblasts* (CFU-F). Njihova klonalna priroda potvrđena je pozitivnom linearnom zavisnošću broja zasađenih ćelija kostne srži i broja nastalih CFU-F (*Friedenstein i sar., 1970*). Ovaj funkcionalni test je i do danas ostao osnova za definisanje proliferativnog potencijala ćelija i stanja njihove diferencijacije. *Friedenstein* je u svojim eksperimentima takođe pokazao da CFU-F nakon serije transplantacija zadržavaju mogućnost ektopičnog formiranja koštanog tkiva, odnosno pokazao je mogućnost samoobnove MMĆ.

Sposobnost samoobnove je glavni kriterijum koji definiše da li se jedna ćelijska populacija može smatrati matičnom. Termin samoobnova označava deobu ćelije na dve ćelije ćerke od kojih najmanje jedna ima istovetne kapacitete za samoobnovu,

proliferaciju i diferencijaciju kao i ćelija majka. U zavisnosti od uslova mikrosredine u kojima se MĆ nalaze može doći do njihove asimetrične ili simetrične deobe. Kod asimetrične deobe jedna ćelija majka daje dve različite ćelije ćerke, od kojih je jedna identična sa ćelijom majkom (i održava populaciju MĆ), a druga je sposobna za razmnožavanje i diferencijaciju u različite ćelije pojedinih tkiva. Ovo asimetrično razdvajanje podrazumeva da tokom mitoze neki proteini i mitRNK migriraju ka jednom polu ćelije (*Gonczy i sar., 2008, Roegiers i sar., 2004*). Sa druge strane, ukoliko se u odgovarajućoj mikrosredini populacija MĆ smanji ispod određenog praga, odigraće se simetrična deoba ćelije majke koja će dovesti do stvaranja dve MĆ identične ćeliji majci. Tačan mehanizam samoobnove kod viših organizama još uvek nije opisan i jasno definisan.

2.2. Podela matičnih ćelija

Na osnovu potencijala za diferencijaciju, MĆ mogu biti svrstane u totipotentne, pluripotentne i multipotentne MĆ.

Totipotentne (omnipotentne) MĆ se mogu izolovati posle prve deobe oplodene jajne ćelije do stadijuma morule (8-16 ćelija) ili u prva 4 dana nakon oplodnje kod čoveka. Od totipotentnih MĆ nastaju sva tkiva i organi jedne jedinke. Od njih se razvijaju sva tri klicina lista: endoderm, mezoderm i ektoderm i formiraju se embrionalni omotači (žumančana kesa, amnion, alantois, horion) i pupčana vrpca (*Das i sar., 2008*).

Pluripotentne MĆ imaju sposobnost da se diferenciraju u sve tipove ćelija jednog organizma koje vode poreklo od sva tri lista embriona, ali se one ne mogu diferencirati u ćelije ekstra embrionalnih omotača (*Ulloa-Montoya i sar., 2005*). Kod ljudi, ove ćelije se nalaze sa unutrašnje strane blastociste nakon 5.-7. dana oplodjenja (embrionalno telašće). Pluripotentne MĆ se mogu naći i u mnogo kasnijem stadijumu razvoja humanih fetusa (5-9 nedelja razvoja) i one iz njih mogu biti izolovane nakon abortusa. Postoje dve kategorije MĆ fetusa: somatske fetalne MĆ i ćelije zametka (embrionske germinativne ćelije) (*Turnpenny i sar., 2006*). Do revolucije u ćelijskoj biologiji dovelo je otkriće da se bilo koja somatska ćelija *in vitro* može indukovati da postane pluripotentna (*Takahashi i sar., 2006*).

Indukovane pluripotentne MĆ se reprogramiraju forsiranom ekspresijom faktora transkripcije kao što su Oct 3/4, Sox2, Myc-C, Klf-4, NANOG i Lin 28

(Takahashi i sar., 2006). Najveći značaj ovog otkrića leži u definisanju mehanizama važnih za održanje ćelija u nediferentovanom stanju. Za otkriće da se zrele ćelije mogu reprogramirati da postanu pluripotentne dodeljena je Nobelova nagrada 2012. godine. Ova mogućnost pruža veliku nadu u oblasti regenerativne medicine jer se ćelije poreklom iz ovog jedinstvenog izvora mogu propagirati beskonačno i diferencirati se u bilo koju ćeliju u organizmu.

Multipotentne MĆ se mogu izolovati iz različitih tkiva tokom fetalnog razvoja, posle rođenja jedinke kao i u organizmu odraslih jedinki pa se stoga nazivaju i adultnim MĆ. One imaju manji kapacitet samoobnove i manji proliferativni potencijal u odnosu na embrionalne MĆ, ali su zbog činjenice da su lako dostupne, interesantne za kliničku primenu. Izvesno je da multipotentne MĆ imaju sposobnost da se diferenciraju u sve tipove ćelija koje pripadaju pojedinim klicinim listovima. Ipak, poslednjih desetak godina su u *in vitro* uslovima izvedeni eksperimenti koji potvrđuju da MĆ postnatalno imaju izraženu međutkivnu plastičnost, odnosno da se ćelije poreklom od jednog embrionalnog lista mogu diferencirati u ćelije drugog klicinog lista. Obim takvih promena je *in vivo* svakako ograničen. Postnatalno, MĆ se u većini tkiva nalaze u nediferentovanom stanju i učestvuju u održavanju homeostaze tkiva i organa tokom života jedinke (Wagers i sar., 2004). Postnatalno izolovane MĆ su: MĆ hematopoeze, mezenhimalne MĆ (rev. Kovačević Filipović., 2014), neuronske MĆ (Uchida i sar., 2000), muskularne MĆ (Boldrin i sar., 2010), MĆ kože (Tanimura i sar., 2011), MĆ intestinalnog epitela (Marshman i sar., 2002), hepatobilijarne MĆ (Sell., 2001). Osim matičnih ćelija mogu se izolovati i ćelije koje nemaju sposobnost samoobnove i mogu se diferencirati samo u jednu ćelijsku lozu, kao što su progenitori hondrocita (Alsalameh i sar., 2004; Dowthwaite i sar., 2004).

2.3. Niša matičnih ćelija

Tokom rasta i razvoja kao i u adultnom periodu, MĆ svakog tkiva ponaosob se uvek nalaze u specifičnoj mikrosredini koja se naziva niša MĆ. Nišu čine različite ćelije, ekstracelularni matriks i brojni fizičko-hemijski faktori (koncentracija O₂, pH, temperatura) koji MĆ obezbeđuju signale važne za preživljavanje, proliferaciju, diferencijaciju i samoobnovu (Li i Xie., 2005, Kovačević Filipović i sar., 2007). Tkiva poput kože, crevnog epitela ili krvi se stalno obnavljanju zbog kratkog životnog veka ćelija koje ih sačinjavaju. U ovim uslovima, niša održava ravnotežu između

samoobnove i diferencijacije, kako bi se obezbedilo stvaranje tih ćelija bez iscrpljivanja zaliha MĆ. U drugim tkivima poput skeletnih mišića, kostiju ili hrskavice, diferencirane ćelije imaju dug život. Njihova obnova se najčešće vrši usled delovanja različitih patoloških ili traumatskih faktora. U ovoj situaciji, niša fiziološki mora da obezbedi ambijent u kome je inhibirana diferencijacija MĆ sve dok nedođe do povrede, odnosno oštećenja tkiva, kada se proces diferencijacije ponovo aktivira (*Li i sar., 2005*). Zanimljivo je da broj progenitora MĆ nije konstantan tokom vremena i da je obrnuto proporcionalan starosti - što je jedinka mlađa njihov broj je veći i obrnuto. Dokazano je da se kod ljudi broj MMC kostne srži sa starošću smanjuje, tako da je u 80. godini života njihov broj redukovana za 50% u odnosu na početnu populaciju (*Oreffo i sar., 1998*). Problematika starenja MĆ još uvek nije dovoljno ispitana.

2.4. Mezenhimalne matične ćelije

U početku je pojam MMC označavao stromalne ćelije kostne srži koje su identifikovane 60-tih i 70-tih godina od strane *Friedenstein*-a i saradnika. Pomenuti autori su iz kostne srži i timusa izolovali ćelije koje su imale sposobnost da stvaraju kolonije ćelija nalik fibroblastima i da se diferenciraju u više linija (*Pittenger i sar., 1999; Friedenstein i sar., 1966, 1968, 1970, 1972, 1976*). Potom su ćelije sa takvim osobinama izolovane iz različitih tkiva kao što su masno tkivo, sinovijalna membrana, skeletni mišići, koža, periost, perihondrium, pupčana vrpca, krv, dentalna pulpa i drugi.

Pored adipogenog, osteogenog i hondrogenog potencijala, MMC imaju potencijal ka miogenezi (*Zuk i sar., 2002*), tendogenezi (rev. *Minguell i sar., 2001*) kao i sposobnost da se diferenciraju ka ćelijama ektodermalnog porekla (*Vindigni i sar., 2009*). Pored toga, *Verfaillie*-e je izolovala populaciju ćelija nehematopoetskog porekla iz kostne srži i nazvala ih je mezodermalnim progenitorskim ćelijama (MPC). Kasnije su one označene kao multipotentne adlutne progenitorske ćelije (MAPC) koje, kada se uzgajaju u posebnim uslovima, mogu da daju ćelije sva tri klicina lista (*Reyes i sar., 2001*) i eksprimiraju markere embrionalnih ćelija. Iz tih razloga pojam MMC treba široko posmatrati jer još uvek nisu u potpunosti definisane njihove karakteristike. Paralelno sa MAPC izolovana je i druga populacija MĆ iz kostne srži čoveka takozvane *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells* (MIAMI). Ove ćelije takođe eksprimiraju markere embrionalnih ćelija i imaju sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondrocite, adipocite (ćelije mezoderma), nervne ćelije (ektodermalne

ćelije) pankreasne ćelije (ćelije endoderma) (*D'Ippolito i sar., 2004*). Karakteristike MAPĆ i MIAMI su do danas kontroverzne i prevazilaze definiciju MMĆ.

2.4.1. Karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija

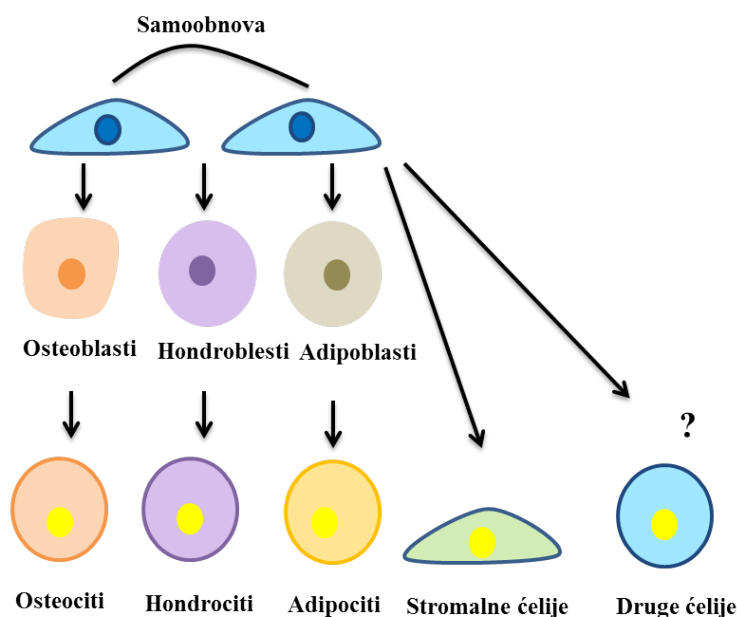
Populacije MMĆ izolovane iz različitih tkiva i na različite načine pokazuju određeni stepen fenotipske heterogenosti (*Gregoire i sar., 1998; Pittenger i sar., 1999; Wagner i Ho., 2007*). U odsustvu specifičnih markera kojima se mogu razlikovati od drugih ćelija, njihova karakterizacija se uglavnom zasniva na skupu osobina. Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju (ISCT) je 2006. godine definisalo da se multipotentnim MMĆ mogu smatrati one ćelije koje ispunjavaju sledeća 3 kriterijuma (*Dominici i sar., 2006*):

1. Imaju sposobnost adhezije za plastiku;
2. Imaju izraženu ekspresiju površinskih markera: CD105, CD73 i CD90 i odsustvo markera leukocita (CD45), endotelnih ili primitivnih hematopoetskih ćelija (CD34), monocita (CD14 ili CD11b), B limfocita (CD79 α ili CD19) i T limfocita (HLA klasa II markera (HLA-DR));
3. Imaju sposobnost diferencijacije u adipocite, osteoblaste i hondrocite.

Ova tri kriterijuma predstavljaju važnu podršku u standardizaciji ekspresije površinskih markera MĆ, ali ne pomažu u definisanju prirode ovih ćelija niti rešavaju dilemu o njima u naučnoj zajednici. Iako je ISCT istaklo da MĆ ekspimiraju CD105, CD73 i CD90 površinske markere, jedino je za CD105 dokazano da je ekspimiran u svežem nativnom uzorku humanih MMĆ i progenitorskih ćelija (*Majumdar i sar., 2000*). Za CD73 i CD90 za sada nema takvih podataka na PubMed-u. Zbog svega toga, postoji potreba da se izvrši preciznija karakterizacija MMĆ na osnovu ekspresije površinskih markera i potencijala samoobnove, kako bi se pojasnile razlike u populaciji MMĆ i kako bi se prevazišle razlike u tehnikama njihove izolacije.

2.4.2. Potencijal za diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija

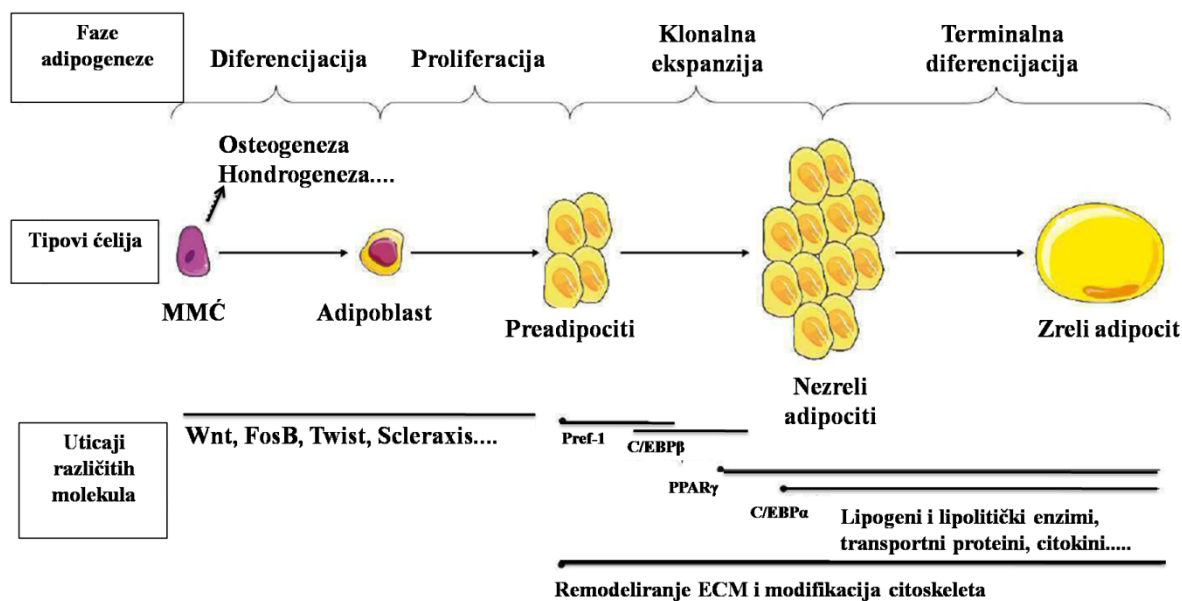
Jedna od glavnih funkcionalnih karakteristika MMĆ-a je njihova sposobnost diferencijacije. MMĆ imaju potencijal da se diferenciraju u adipocite, osteoblaste i hondrocite (*Dominici i sar., 2006*).



Šema 1. Mezenhimalne matične ćelije kostne srži. Sposobnost diferencijacije u osteocite, hondrocite i adipocite. Sposobnost diferencijacije MMC u druge ćelije mezodermalnog i nemezodermalnog porekla je takođe ustanovljena ali su rezultati i dalje kontraverzni.

2.4.3. Adipogeneza

Adipogeneza je proces tokom kojeg se MMC diferenciraju u adipocite, zrele ćelije masnog tkiva. Ovaj proces se odvija u četiri faze: faza diferencijacije, proliferancije, klonske ekspanzije i završna hipertrofična faza (rev. *Gregoire i sar., 1998*). U fazi diferencijacije, MMC se pod uticajem faktora rasta usmeravaju ka procesu adipogeneze, što podrazumeva promenu u sastavu ECM-a koji postaje bogat fibronektinom, kolagenom tipa IV i PG. Remodeliranje ECM i modifikacija strukture citoskeleta dovodi do morfoloških promena samih ćelija koje dobijaju kružnu formu i nazivaju se adipoblasti. Adipoblasti zatim ulaze u fazu proliferacije, da bi na kraju od njih nastali preadipociti. Paralelno sa proliferacijom odvija se i maturacija preadipocita usled aktiviranja transkripcionih faktora: *pref-1*, *C/EBP β / δ* , *PPAR γ* i *C/EBP α* (rev. *Gregoire i sar., 1998*, *White i sar., 2010*). Aktiviranjem *PPAR γ* i *C/EBP α* dolazi do sazrevanja preadipocita i ekspresije receptora *AFBP/aP2* za leptin. U završnoj fazi sazrevanja adipociti sadrže enzime neophodne za odvijanje metaboličkih procesa (*Gregoire i sar., 1998*, *Otto i sar., 2005*). Zreli adipociti su sposobni da u citoplazmi u vidu vakuola akumuliraju lipide i da ih po potrebi hidrolizuju kako bi obezbedili energiju organizmu.



Šema 2. Prikaz procesa adipogene diferencijacije. Šema preuzeta iz: Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. *Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev, 1998. 78(3): 783-809.*

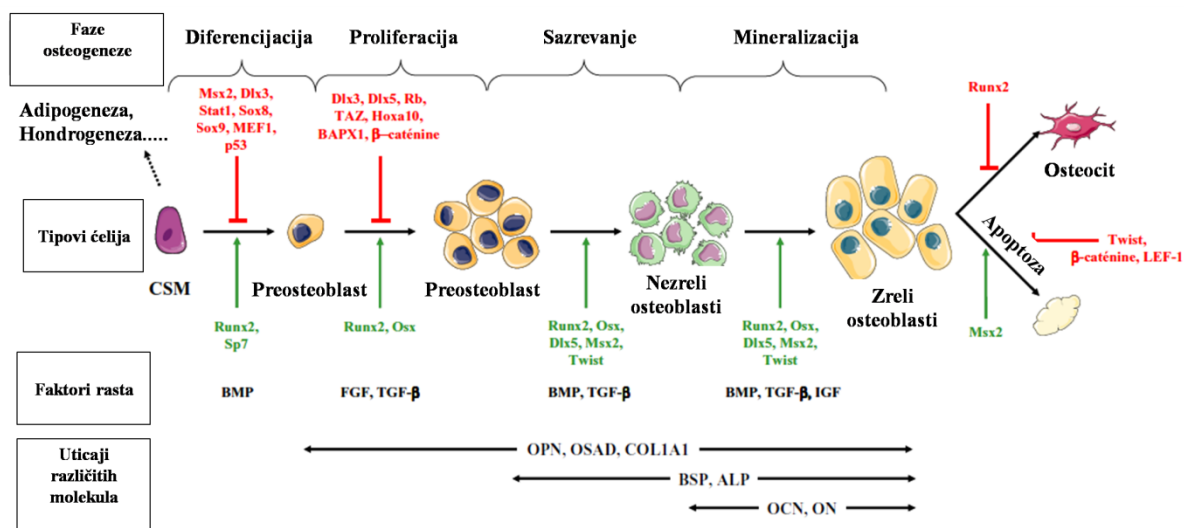
2.4.4. Osteogeneza

Osteogeneza je strogo regulisan proces koji karakteriše niz događaja: usmeravanje osteoprogenitora ka procesu osteogeneze, njihova diferencijacija u pre-osteoblaste i sazrevanje pre-osteoblasta u osteoblaste, koji sintetišu matriks karakterističan za koštano tkivo, nakon čega nastaje njegova mineralizacija.

Proces osteogeneze započinje fazom **diferencijacije**, gde od MMĆ nastaju osteoprogenitori od kojih, pod uticajem transkripcionih faktora BMP i RUNX-2, nastaju pre-osteoblasti. Pre-osteoblasti se pod uticajem FGF i TGFβ usmeravaju ka sledećoj fazi, a to je **faza proliferacije**. U sledećoj fazi, koja se označava kao **faza sazrevanja**, nastaju osteoblasti koji sintetišu organske materije, da bi u poslednjoj fazi osteogeneze, (**faza mineralizacije**) deponovali soli kalcijuma i neorganske fosfate. Tada postaju zreli osteoblasti ili osteociti. Osteoblasti su ćelije koje su odgovorne za rast u toku embrionalnog razvoja i za neprekidno obnavljanje i nadoknadu koštanog tkiva. Zanimljivo je da osteoblasti žive nekoliko meseci (do 200 dana), osteoklasti samo nekoliko dana (do 25 dana), a osteociti od 1 do 50 godina. Jedine dugoživeće ćelije u kostima su MMĆ (rev. Manolagas i Parfitt 2010).

Smatra se da FGF ima glavnu ulogu u procesu diferencijacije tokom osteogeneze. Nakon stvaranja osteoprogenitora dolazi do formiranja veza između samih ćelija, ali i ćelija i ECM putem eksprimiranja adhezivnih molekula (receptora) za integrine, kao što

su koneksin i kadherin (rev. Marie., 2008). To stimuliše aktiviranje faktora rasta, kao što je morfogeni protein kostiju - BMP, koji imaju važnu ulogu u indukciji diferencijacije dovodeći do aktiviranja ekspresije faktora transkripcije, posebno RUNX-2 (rev. Marie., 2008). Ovaj faktor (RUNX-2) je glavni regulator diferencijacije osteoblasta koji, kada postane aktivan, omogućava da se pokrene transkripcija velikog broja gena koji kodiraju sintezu proteina kao što su kolagen tipa I, osteopontin, osteokalcin, i koštani sialoprotein. Smatra se da FGF-2, 4 i 18 kao i receptor FGFR-1 i 2 imaju posebnu ulogu u kontroli procesa signalizacije tokom osteogeneze (rev. Marie., 2008). Oni stimulišu ekspresiju glavnog faktora transkripcije u razvoju kostiju, a to je ostetriks (ostetrix – OSX). Iako je ekspresija OSX pod kontrolom faktora transkripcije RUNX2, on omogućava odvijanje završnog dela osteogeneze, dok sam RUNX2 nije odlučujući faktor jer je takođe uključen i u proces hondrogene diferencijacije. Na kraju faze proliferacije preosteoblasti luče enzim alkalnu fosfatazu i osteonektin. Tokom faze sazrevanja, ćelije stvaraju proteine ECM karakteristične za koštano tkivo (kolagen tip I osteopontin, osteoadherin i osteomodulin), koji učestvuju u adheziji ćelija za komponente ECM. Glavna uloga osteoblasta je mineralizacija koštane materije, za koju je potrebna značajna količina kalcijuma i neorganskih fosfata. Transport jona kalcijuma iz ekstracelularnog prostora u citoplazmu osteoblasta vrši se na pasivan ili aktivan način (kalcijumske pumpe). Na isti način se odvija i transport fosfata, s tim da se aktivan transport vrši preko ATP zavisnih natrijumovih pumpi za fosfate PiT-1 i PiT-2. Pi nastaje hidrolizom neorganskih pirofosfata od strane AP koji se vezuje za kalcijum stvarajući na taj način kristale hidroksil apatita, usled čega nastaje faza mineralizacije kostiju (rev. Marie., 2008).



Šema 3. Prikaz procesa osteogene diferencijacije. Šema preuzeta iz Marie P.J. *Transcription factors controlling osteoblastogenesis*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 473(2): 98-105.

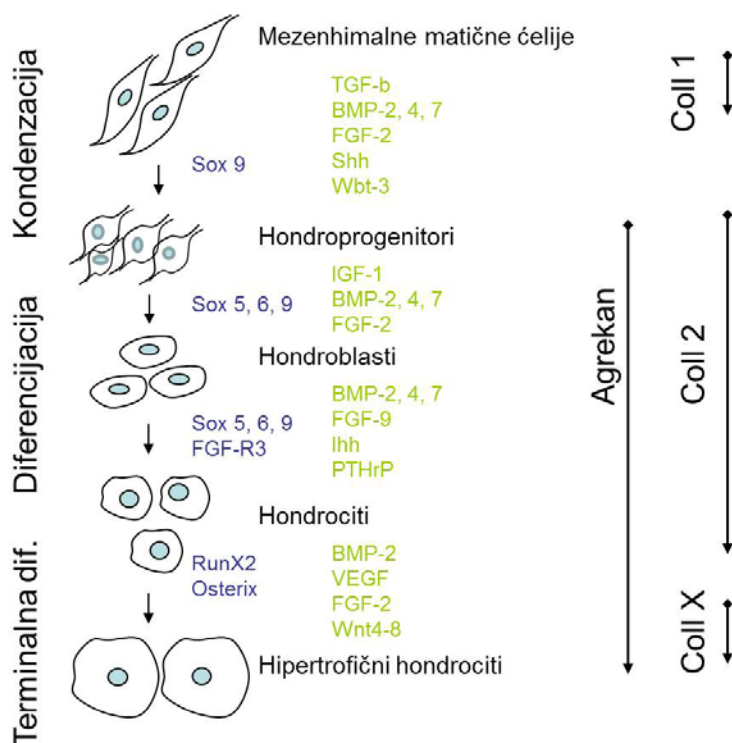
2.4.5. Hondrogeneza

Tokom embrionalnog razvoja, hondrogeneza prethodi osteogenezi jer je hrskavica prva koja formira sve delove skeleta koji nastaju endohondralnom osifikacijom. Hondrogeneza je regulisan proces u toku koga se od nediferentovanih ćelija stvara hrskavično tkivo. Mehanizmi uključeni u proces hondrogeneze najviše su proučavani u nivou zone rasta, koja ima najvažniju ulogu u procesu endohondralnog okoštavanja. To je prelazna zona hrskavice koja postoji do sazrevanja skeleta i odgovorna je za rast dugih kostiju. Hrkavica se postepeno zamenjuje koštanim tkivom, ali zglobna hrskavica nikada ne okoštava i ona ostaje trajna. Hondrogeneza započinje diferencijacijom ćelija koje potiču iz tri glavna izvora: ćelija nervne kreste ektodermalnog porekla koje najverovatnije formiraju kosti glave i lica, ćelija skelotome, koje su mezodermalnog porekla i ćelija somatopleuralnog mezoderma (rev. Quintana i sar., 2009).

Hondrogeneza i endohondralna osifikacija se odvijaju u više etapa:

- kondenzacija MĆ,
- diferencijacija ka hondrogenezi,
- proliferacija hondrocita,
- diferencijacija različitih subpopulacija hondrocita: proliferativnih, prehipertrofičnih i hipertrofičnih oko kojih je perihondrijum ili pokosnica,

- vaskularizacija i mineralizacija hrskavice i progresivna zamena koštanim tkivom,
- pojava sekundarnih centara okoštavanja u distalnim delovima.



Šema 4. Prikaz hondrogene diferencijacije

Kondenzacija matičnih ćelija

Najranija faza hondrogeneze je migracija MMC ka mestu skeletogeneze, koju prati kondenzacija MMC (rev. Quintana i sar., 2009). Pre početka kondenzacije, MMC stvaraju matriks bogat hijaluronskom kiselinom (HK), fibronektinom, kolagenom tipa I i IIA. Nakon kondenzacije dolazi do degradacije HK i sinteze adhezivnih molekula (N-CAM i N- kadherin, COMP, tenascin-c) koji omogućavaju uspostavljanje interakcije između samih ćelija, kao i ćelija i ECM. Transformišući faktor rasta (TGF- β) je jedan od prvih faktora uključenih u proces hondrogeneze, a naročito značajnu ulogu ima u regulaciji ekspresije adhezivnih molekula pri kondenzaciji. U centru kondenzovanih ćelija pod uticajem različitih faktora rasta (FGF, BMP, SHH i WNT), ćelije počinju da eksprimiraju markere za hondrocyte uključujući transkripcioni faktor Sox9 koji ima glavnu ulogu u diferencijaciji MMC ka hondrogenezi (de Crombrughe i sar., 2000, Akiyama i sar., 2008, rev. Quintana i sar., 2009). Ekspresija Sox9 se zadržava tokom diferencijacije sve do hipertrofičnog stadijuma i veoma je važna jer doprinosi adekvatnom odvijanju procesa organogeneze. Dokazano je da inaktivacija gena za

SOX9 kod mišijih embriona dovodi do poremećaja u razvoju skeleta (*Akiyama i sar., 2008*).

Diferencijacija hondrocita

Diferencijaciju hondroprogenitora u hondrocite odlikuje sinteza specifičnih komponenti ECM: kolagena tipa IIB, IX i XI, i PG (agrekan, verzikan, perlekan i biglikan). Faktor transkripcije Sox9 ima centralnu ulogu u odvijanju ove faze jer je neophodan za ekspresiju kolagena tipa II kao i kolagena tipa IX, XI, COMP i agrekana (rev. *de Crombrughe i sar., 2000*, rev. *Akiyama, 2008*). Sox9 reguliše ekspresiju dva druga člana porodice Sox: L-Sox5 (velika izoforma Sox5) i Sox6, koji nisu bili eksprimirani u toku faze kondenzacije. L-Sox5 i Sox6 ne prepoznaju mesta inhibicije ili aktivacije transkripcije, ali imaju veliki značaj za diferencijaciju hondrocita. Oni mogu da formiraju homo i heterodimere koji reaguju zajedno sa Sox9 i raznim drugim faktorima stabilizujući tako transkripcioni kompleks. Pored svoje uloge u hondrogenoj diferencijaciji, Sox9 ima ulogu u inhibiciji mineralizacije i sprečava vaskularizaciju ECM-a, što je u potpunoj korelaciji sa izostankom eksprimiranja Sox9 na hipertrofičnim hondrocitima. Transkripcija Sox9 je regulisana i drugim faktorima transkripcije kao što su Pax1, Pax9, Nkx3.1, Nkx3.2, HIF-1 α (rev. *Akiyama., 2008*).

Proliferacija hondrocita

U početku proliferativne faze, mali sferični hondrociti postaju spljošteni i organizuju se paralelno u kolonama u kojima najudaljeniji hondrociti od centra okoštavanja imaju najjaču stopu proliferacije. Ona se zatim progresivno smanjuje što se više približava centru okoštavanja. Hondrociti prestaju sa proliferacijom kada dostignu stadijum prehipertrofičnog sazrevanja tokom koga na ovim ćelijama dolazi do povećane ekspresije određenih gena koji kodiraju sintezu proteina ECM-a, kao što su: agrekan, PRELP, protokadherin 17 i COMP i geni koji regulišu diferencijaciju ili proliferaciju, kao što su: diferencijacioni faktor rasta 10, receptor 3 za FGF (FGFR3), IHH protein i PTHrP (rev. *de Crombrughe i sar., 2000*, rev. *Kronenberg., 2003*, rev. *Akiyama., 2008*, rev. *Quintana i sar., 2009*).

Na nivou proliferativnih hondrocita eksprimiranje IHH-proteina omogućava da se inaktiviše hipertrofična diferencijacija indukcijom proizvodnje PTHrP. Naime, aktiviranjem signalizacionog puta PTHrP-a preko receptora PTH/PTHrP (PprL) na proliferativnim i prehipertrofičnim hondrocitima onemogućava se diferencijacija u

hipertrofične hondroците usled ekspimiranja IHH proteina. Tokom hondrogeneze odnos između BMP i FGF određuje stopu proliferacije hondroćita. Proteini iz porodice BMP-a kao i njihovi receptori najviše su ekspimirani na hondroćitima u toku hondrogeneze. Pored toga, proteini iz porodice FGF-a indukuju hipertofiju hondroćita, suprotno efektima BMP-a. Oni dovode do aktiviranja mitogene protein kinaze i fosforilacije faktora transkripcije STAT1. Efekat FGF-a ne zavisi samo od njihove ekspresije nego i od ekspresije njihovog receptora. Naime, FGFR2 receptor se najranije ekspimirira na samom početku procesa kondenzacije MMC, kao i kasnije pri završetku ovog procesa. Ekspresija FGFR3 je povezana sa proliferacijom hondroćita pa je tako, u početku rasta, FGFR3 važan faktor proliferacije ovih ćelija. Kod ahondroplazije ljudi, dolazi do inhibicije proliferacije hondroćita i ubrzane hipertrofične diferencijacije što dovodi do zastoja u rastu, usled mutacije gena za FGFR3. Ekspresija FGFR1 je povećana na prehipertrofičnim i hipertrofičnim hondroćitima i ima važnu ulogu u preživljavanju, diferencijaciji i smrti ćelije. Ostali faktori transkripcije takođe imaju značaj u regulisanju proliferacije i sazrevanja hondroćita, kao i u organizaciji proliferativnih kolona. L-Sox5 i Sox6 su neophodni za razvoj i održavanje kolona proliferativnih hondroćita. Dokazano je da se kod dvostruko mutirajućih miševa za L-Sox5 i Sox6 javlja odsustvo kolona proliferativnih hondroćita, a prisutna je prehipertrofična zona. Nasuprot ovome, Sox9, inhibira proliferaciju hondroćita. Miševi kod kojih je previše ekspimiran Sox9 imaju skraćene kolone proliferativnih hondroćita. Runx2 stimuliše proliferaciju i organizaciju hondroćita u kolonama. Runx2 je ekspimiran i u hipertrofičnim hondroćitima. Miševi bez gena za Runx2 imaju smanjenu proliferativnu sposobnost hondroćita kao i poremećaj u njihovom sazrevanju. Ova važna uloga Runx2 u proliferaciji hondroćita ostvaruje se indirektno preko ekspimiranja IHH proteina na prehipertrofičnim hondroćitima. Dokazano je da IHH protein stimuliše proliferaciju hondroćita u kolonama. Transkripcioni faktori iz porodice Gli (Gli1, 2, 3) uključeni su u signalni put Hedgehog. Tako, Gli1 može da aktivira gene za Hedgehog, Gli2 i 3 mogu takođe biti aktivirajući faktori transkripcije u svom potpunom obliku (Gli2A i 3A), dok njihovi oblici nastali u procesu proteolitičkog razdvajanja (Gli2R i 3r) mogu reagovati kao represori i onemogućiti transkripciju. Ovaj proteolitički proces je regulisan negativnom povratnom spregom Hedgehog. Kod miševa sa smanjenom ekspresijom Gli3R javlja se smanjenje rasta distalne zone, što ukazuje na to da je represivna funkcija Gli3 neophodna za njegov razvoj. Gli2A i 3A dovode do smanjenja distalne zone, ali su

neophodni za održavanje i organizaciju kolona hondrocita u proliferativnoj zoni (rev. *de Crombrughe i sar., 2000*, rev. *Akiyama., 2008*).

Diferencijacija pre-hipertrofičnih i hipertrofičnih hondrocita

Diferencijacija proliferativnih hondrocita u pre-hipertrofične i hipertrofične hondrocite predstavlja važnu fenotipsku promenu. Hondrociti povećavaju zapreminu citoplazme za više od 10 puta: od $100 \mu\text{m}^3$ u proliferativnoj zoni na više od $1500 \mu\text{m}^3$ u hipertrofičnoj zoni (*Bush i sar., 2010*). Ovo povećanje zapremine hipertrofičnih hondrocita nastaje usled eksprimiranja membranskog Na-K-Cl kotransportera (NKCC1) koji dovodi do povećanja osmolarnosti u intracelularnom prostoru i posledičnog unošenja vode unutar ćelije (*Bush i sar., 2010*). U prehipertrofičnom stadijumu hondrociti su usmereni ka sintezi proteina ECM-a (kolagena tipa II, IX i XI, agrekana, COMP-a), i eksprimiraju gene za sintezu PTH, receptora PTHrP, IHH proteina i kolagena tipa X. U hipertrofičnom stadijumu hondrociti prestaju da eksprimiraju gene odgovorne za početne faze formiranja hrskavice i eksprimiraju receptore za PTHrP i IHH protein. Ligandi za receptore PTHrP i IHH protein stimulišu ekspresiju kolagena tipa X i aktiviraju ekspresiju gena za VEGF (*Bluteau i sar., 2007*).

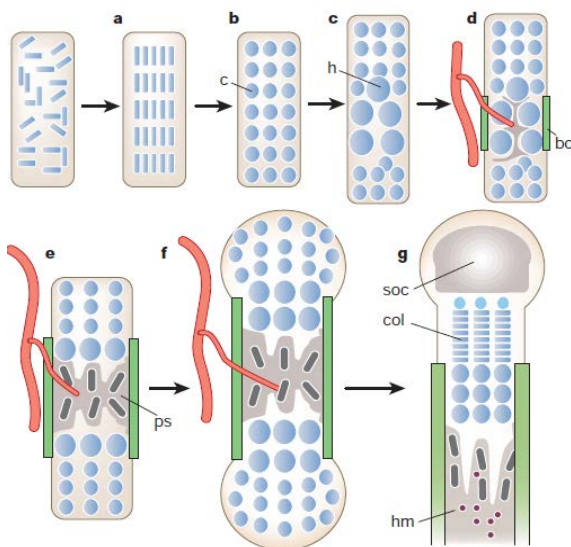
Koštani morfogenski protein (BMP) ima važnu ulogu u kontroli brojnosti hondrocita koji će se diferencirati u prehipertrofične hondrocite (rev. *Kronenberg., 2003*). IHH protein eksprimiran na prehipertrofičnim hondrocitima inhibira hipertrofičnu diferencijaciju hondrocita i odlaže mineralizaciju. IHH protein takođe stimuliše sintezu PTHrP-a u periartikularnim hondrocitima koji blokiraju diferencijaciju proliferativnih hondrocita dovodeći do smanjenja broja prehipertrofičnih hondrocita i smanjenja ekspresije IHH proteina mehanizmom negativne povratne sprege (rev. *Kronenberg., 2003*). L-Sox5 i Sox6 odlažu prehipertrofiju, ali su neophodni za njen nastanak. Kod mišijih embriona kod kojih ne postoje Sox5 i Sox6 hondrociti se rano orijentišu prema stadijumu prehipertrofije. Ovi hondrociti eksprimiraju FGFR3, što favorizuje njihov sazrevanje. Kod *knock-out* miševa za Sox5 i Sox6 prehipertrofični hondrociti ne postaju hipertrofični i ne eksprimiraju kolagen tipa X. Eksprimiranje L-Sox5, Sox6 i Sox9 je suprimirano kod hipertrofičnih hondrocita, što objašnjava gubitak ranih markera hipertrofije hrskavice. Runx2 je važan u indukciji hipertrofije. Kod miševa *knock-out* za Runx2 ne dolazi do hipertrofije hrskavice i kosti. Runx2 takođe stimuliše sintezu kolagena tipa X, i ekspresiju IHH proteina. PTHrP utiče na stabilnost transkripcionih faktora Runx2 i 3 (rev. *Kronenberg., 2003*). Runx2 reguliše

transkripciju kolagena tipa X, što jasno ukazuje da Runx2 negativnom povratnom spregom preko PTHrP/ IHH proteina kontroliše sazrevanje hondrocita u zoni rasta. Ovi stadijumi hondrogeneze se odvijaju u avaskularnom okruženju sa niskom koncentracijom kiseonika. U ovakvim uslovima transkripcioni faktori familije HIF- α imaju ključnu ulogu u diferencijaciji hondrocita, kontroli hipertrofije kao i u održavanju fenotipa prehipertrofičnih hondrocita kod adultne hrskavice.

Završno sazrevanje hondrocita

Tokom terminalne faze diferencijacije hipertrofični hondrociti još jednom trpe fenotipsku promenu. U prelaznoj fazi, hondrociti prestaju da eksprimiraju kolagen tipa X i aktiviraju ekspresiju novih gena kao što su: matriks metaloproteinaze (MMP), ADAMTS gene iz porodice SIBLING koji sadrže: dentin matrix protein 1, sialoprotein kostiju, osteopontin, sialofosfoprotein i alkalnu fosfatazu. Ovi markeri završne diferencijacije se smatraju markerima osteoblasta. Naime, kao i osteoblasti, hondrociti u fazi završne diferencijacije su sposobni da mineralizuju ECM zahvaljujući ekspresiji ANK-a čija je uloga da izbaci intracelularni PPI u spoljašnju sredinu. PPI se potom raščlanjuje na Pi i pod dejstvom AP povećava koncentraciju Pi van ćelije. Ova homeostaza PPI/Pi nastaje prilikom završne diferencijacije i u apoptozi hondrocita u zoni rasta (*Kim i sar., 2010*). Okoštavanje ECM hrskavice podrazumeva izraženu vaskularizaciju u perihondrijumu i u hipertrofičnoj zoni. U procesu okoštavanja dolazi do povećanja koncentracije enzima odgovornih za degradaciju ECM hrskavice MMP, ADAMTS kao i angiogenetskog faktora VEGF (*Bluteau i sar., 2007*). Matriks metalo proteinaze (MMP) su svrstane u četiri grupe prema supstratu koji razlažu: MMP koje razlažu kolagen (MMP-1, 2, 8, 9 i 13), MMP koje razlažu želatin i kolagen tipa IV (MMP-2 i 9), MMP koje razlažu proteine ECM (MMP-3, 10 i 11) i MMP membranskog tipa (MMP-1, 14, 15, 16, 17, 18, 24, i 25). Dokazano je da kod MMP-13 *knock-out* miševa dolazi do značajne akumulacije kolagena koji je odgovoran za povećanje debljine hipertrofične zone i za odloženu mineralizaciju (*Quintana i sar., 2009*). Takođe je dokazano da je MMP-13 odgovoran za razgradnju kolagena tipa II i da njegova aktivnost zavisi od MMP-14. Nedavne studije ukazuju na to da su MMP-9 i 14 od suštinskog značaja za degradaciju komponenti hrskavice kako bi omogućili pojačanu vaskularizaciju u nivou epifize. Imunodeficijentni miševi za MMP-9 i 14 imaju smanjenu vaskularizaciju u nivou epifize, što dovodi do pojave deformiteta na ploči

rasta kao i do smanjenog rasta kostiju (*Ortega i sar., 2010*). Poznato je da ADAMTS utiču na razvoj, angiogenezu, koagulaciju i progresiju OA. Za ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15 i 20 je potvrđeno da razlažu proteoglikane koji se vezuju za hijaluronan. ADAMTS-2, 3 i 14 su odgovorni za degradaciju prokolagena tipa I, II i III, a ADAMTS-7 i 12 za degradacija COMP-a. ADAMTS-13 razlaže *Von Willebrand*-ov faktor, dok je uloga ADAMTS-6, 10, 16, 17, 18, i 19 nedovoljno definisana (*rev. Jones i Riley., 2005*). Angiogenetski faktori VEGF-A, B, C i D su eksprimirani na hipertrofičnim hondrocitima (*Bluteau i sar.,2007*). Kada se jednom sintetiše, VEGF se vezuje za receptore VEGFR-1, 2 i 3 ili koreceptore kao što su neuropirini 1 i 2. VEGF je na taj način eksprimiran u ECM-u. Delovanjem enzima koji razlažu komponente ECM (MMP i ADAMTS) VEGF će se osloboditi i tako ispoljiti svoju angiogenetsku aktivnost. Dalja sudbina hondrocita je kontroverzna. Oni umiru usled aktiviranja procesa apoptoze / autofagije ili se transdiferentuju ka osteoblastima. Najprihvatljivija pretpostavka je da hondrociti u najvećem broju umiru usled apoptoze. Remodeliranje ECM-a hrskavice kao i vaskularizacija su neophodni za diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta koji će postepeno zameniti matriks hrskavice kostima.



Šema 5. Proces endohondralne osifikacije. **a.** Kondenzacija matičnih ćelija. **b.** Kondenzovane ćelije postaju hondrociti (c). **c.** Hondrociti u centru kondenzacije prestaju da proliferišu i postaju hipertrofični (h). **d.** Perihondralne ćelije susedne sa hipertrofičnim hondrocitima postaju osteoblasti i formiraju koštanu kragnu (bc). Hipertrofični hondrociti iniciraju mineralizaciju matriksa, privlače krvne sudove i podvrgavaju se procesu apoptoze **e.** Osteoblasti primarnog spongioznog dela kosti prate vaskularnu invaziju i formiraju spongiozu kostiju (ps). **f.** Hondrociti nastavljaju da proliferišu produžavajući na taj način kost. Osteoblasti primarnog spongioznog dela kosti predstavljaju prekursore eventualnog

trabekularnog dela kosti. Osteoblasti koštane kragne postaju kortikalni deo kosti. **g.** Na krajevima kosti formiraju se sekundarni osifikacioni centri (soc) kroz ciklus hipertrofije hondrocita, vaskularne invazije i osteoblastne aktivnosti. Ploča rasta ispod sekundarnih centara osifikacije formira vertikalne kolone proliferativnih hondrocita (col). Hematopoetska srž (hm) se proširuje u koštanom prostoru zajedno sa stromalnim ćelijama. Šema preuzeta iz: *Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature, 2003. 423(6937): 332-6.*

2.5. Plastičnost mezenhimalnih matičnih ćelija

Pojam plastičnosti podrazumeva sposobnost bilo koje ćelije da stekne morfološke i funkcionalne osobine drugog ćelijskog tipa. Unutar tkivna plastičnost se odnosi na preobražaj koji se dešava unutar ćelijskih loza istog porekla u odnosu na klicine listove, dok se međutkivna plastičnost odnosi na preobražaj ćelija poreklom od jednog klicinog lista u ćelije koje vode poreklo od drugog klicinog lista. Dokazano je da populacija MĆ diferencirana ka osteoblastima može zadržati adipogeni i hondrogeni potencijal, kao i da diferencirani hondrociti ili adipociti zadržavaju osteo-adipogeni i osteo-hondrogeni potencijal. Pored toga, potvrđeno je da MĆ hematopoeze (ćelije mezoderma) mogu da se diferenciraju u ćelije ektodermalnog porekla kao što su neuroni, glija ćelije, astrociti i keratinociti (*Woodbury i sar., 2000*), ali i ćelije endodermalnog porekla, kao što su hepatociti.

Uprkos velikom broju studija, koncept plastičnosti adultnih MĆ je još uvek predmet velike rasprave zbog nepostojanja precizne definicije i nedovoljnog broja neoborivih eksperimentalnih dokaza. Međutim, postoje tri kriterijuma koji se za sada smatraju ključnim u definisanju plastičnosti, a to su:

1. sposobnost diferencijacije u različite ćelijske tipove
2. funkcionalnost diferenciranih ćelija u *in vitro* i *in vivo* uslovima
3. postojanost ovih karakteristika u funkciji vremena (*rev. Theise., 2010*).

Fenomen plastičnosti se objašnjava ćelijskom fuzijom, odnosno postojanjem embrionalnih MĆ u adultnom organizmu i fenomenima dediferencijacije i rediferencijacije ćelija.

Fuzija je fiziološki mehanizam koji dovodi do formiranja višejedarnih ćelija, pa tako fuzijom mioblasta nastaju mišićna vlakna, a fuzijom ćelija monocitno-makrofagnog sistema osteoklasti. Ova homotipska fuzija, odnosno fuzija ćelija iste vrste, nije dovoljna da objasni pojam plastičnosti. Plastičnost zasnovana na mehanizmu fuzije ćelija može biti registrovana *in vitro* između embrionalnih MĆ i MĆ kostne srži

ili neuronskih MĆ i takva fuzija se označava kao heterotipska (rev. *Theise., 2010*). U ovim uslovima, fuzionisane ćelije mogu steći osobinu pluripotentnosti svojstvene embrionalnim MĆ dok eksprimiraju specifične markere diferenciranog tipa ćelija. Iz tih razloga se javlja teškoća u identifikaciji homogene populacije MĆ. Međutim, fenomen fuzije je retka pojava i procenjuje se da se dešava sa verovatnoćom od 1:100.000 što dovodi do formiranja tetraploidnih ćelija. Ova anomalija genetski ne dozvoljava dugoročni opstanak takvih ćelija i one ne ispunjavaju treći pomenuti kriterijum plastičnosti. Fenomen ćelijske fuzije je retka pojava i zbog toga ne može da objasni fenomen plastičnosti MĆ kod odraslih organizama.

Hipoteza transdiferencijacije ili reprogramiranja je zasnovana na principu transformacije jedne zrele somatske ćelije u drugu zrelu somatsku ćeliju bez prolaska kroz međufaze progenitorskih ćelija u kojima gubi ćelijske markere specifične za dato tkivo i stiče nove markere i funkcionalne karakteristike novog ćelijskog tipa. Ova hipoteza je još uvek predmet velike polemike naučne javnosti. Prema njoj bi se, transdiferencijacijom direktno aktivirao latentni program diferencijacije ili bi se uklonili njeni inhibitori. U prilog ovoj tvrdnji idu rezultati studije koja jasno ukazuje na to da razlika u ekspresiji genskih profila uslovljava klasifikaciju MĆ na embrionalne, mezenhimalne MĆ i multipotentne adultne progenitorske ćelije. Analiza PcG represivnih markera, modifikacije histona i metilacije gena promotera diferencijacije i pluripotentnih gena pokazala je da populacija MĆ sa širim potencijalom diferencijacije kao što su embrionalne i multipotentne adultne progenitorske ćelije pokazuju snažniju zastupljenost epigenetskih represivnih markera tokom diferencijacije koja se postepeno gubi sa smanjivanjem potencijala za diferencijaciju MĆ (*Aranda i sar., 2009*). Proces transdiferencijacije je dobro proučen kod pojedinih vrsta riba i vodozemaca. Vodozemcima reda *Caudata/Urodeles*, ovaj mehanizam omogućava kompletnu regeneraciju udova, repa, oka ili srčanih zalistaka (rev. *Theise., 2010*). Diferencirane ćelije, kada se izdvoje iz svoje niše i smeste u novo mikrookruženje, mogu se spontano reprogramirati.

Osim opisane međutkivne plastičnosti, demonstrirana je i unutar tkivna plastičnost. Dokazano je da ćelije za koje se verovalo da su u potpunosti diferencirane, mogu da se dediferentuju i rediferentuju u drugu ćeliju istog tkiva. Tako, na primer, relativno zreli B limfociti koji su u *in vitro* uslovima stimulirani određenim citokinima, mogu da stvaraju ćelije mijeloidne loze (rev. *Theise., 2010*). Iako plastičnost MĆ adultnih tkiva predstavlja fenomen koji obiluje kontroverzama i zahteva dalja

ispitivanja, plastičnost embrionalnih MĆ predstavlja realni fenomen čije ispitivanje je u punom zamahu. Plastičnost embrionalnih i adultnih MĆ su od potencijalno velikog kliničkog značaja.

2.6. Matične ćelije poreklom iz sinovijalne membrane i sinovijalne tečnosti

U poslednjoj deceniji, sinovijalna membrana i sinovijalna tečnost su okarakterisane kao tkiva koja sardže mezenhimalne progenitorske / matične ćelije koje se funkcionalno razlikuju od progenitorskih / matičnih ćelija (P/MĆ) kostne srži (Ando i sar., 2007; Ando i sar., 2008; Jones i sar., 2008; Horie i sar., 2009). *In vitro* i *in vivo* je pokazano da se mezenhimalne progenitorske / matične ćelije SM i ST mogu koristiti u reparaciji zglobove hrskavice. Progenitorske ćelije ST imaju jači hondrogeni potencijal u odnosu na MMĆ kostne srži, kao i jaču ekspresiju receptora za hijaluronsku kiselinu (CD44 molekula) i enzim difosfo-gluko-dehidrogenazu (UDPGD), koji je neophodan za sintezu HK. Mezenhimalne MĆ kostne srži i druge progenitorske / matične ćelije ne ekspimiraju UDPGD (Archer i sar., 2003; Fan i sar., 2009).

Rezultati studija obavljenih na kunićima *in vivo* potvrđuju da kada postoji delimičan defekt hrskavice, ćelije SM doprinose reparaciji hrskavice sa ili bez prisustva molekula stimulatora hondrogeneze (Hunziker i sar., 1996, Hunziker 2001). Takođe je *in vivo* dokazano da ćelije sinovijalne membrane ljudi i svinja mogu da se koriste u regeneraciji defekata na hrskavici (ksenotransplantacija i alotransplantacija) (Ando i sar., 2007 i 2008). Pored toga, druga grupa autora je nedavno potvrdila da MMĆ sinovijalne membrane imaju sposobnost da se *in vitro* u roku od par minuta direktno vežu za hrskavicu i da mogu učestvovati u reparaciji njenih defekata (Koga i sar., 2008).

Zbog svega toga, MMĆ sinovijalne tečnosti postaju interesantan predmet istraživanja u veterinarskoj i humanoj medicini gde se ispituje njihova potencijalna primena kod različitih patoloških stanja koja se odnose na degenerativna i inflamatorna oštećenje zglobove hrskavice, uključujući i osteoartritis. Prvi izveštaji dobijeni na ljudima sugerišu da nema razlike u hondrogenom potencijalu MMĆ sinovijalne tečnosti iz zdravih zglobova, zglobova sa osteoartritisom ili reumatoidnim artritisom, bez obzira na to što u zglobovima zahvaćenim osteoartritisom postoji povećanje broja MMĆ sinovijalne tečnosti (Jones i sar., 2008). Nasuprot ovim nalazima, ista grupa autora nedavno je objavila da je kod reumatoidnog artritisa inflamacija odgovorna za smanjenje hondrogenog potencijala MMĆ sinovijalne tečnosti. Efektivno smanjenje zapaljenske reakcije u zglobu je od suštinskog značaja za primenu MMĆ u terapiji reumatoidnog artritisa (Jones i sar., 2010). Pretpostavlja se da mikrosredina zgloba zahvaćenog reumatoidnim artritisom i OA ima fundamentalno različit uticaj na proliferaciju i

diferencijaciju MMC sinovijalne tečnosti. Ukoliko ove ćelije učestvuju u procesu održavanja homeostaze zgloba i procesu reparacije hrskavice, potreba za potpunijim razumevanjem njihove prirode je potpuno opravdana jer one predstavljaju potencijalna terapijska sredstva u lečenju OA.

2.7. STARENJE I BIOMARKERI ĆELIJSKOG STARENJA

Dva fundamentalna mehanizma starenja ćelija su skraćivanje telomera i oksidativno oštećenje ćelija. Starenje ćelija dovodi do promene njihovog fenotipa, povećanja aktivnosti enzima beta galaktozidaze, do povećanog formiranja heterohromatinskih struktura, oštećenja DNK, i hromozomske nestabilnosti (*Martin i Buckwalter 2001, rev. Loeser 2009, rev. Sikora i sar., 2011*). Smatra se da ovi procesi dovode do gubitka funkcije svih ćelija tokom starenja. Merenje aktivnosti enzima β galaktozidaze u praksi predstavlja najčešće primenjivan marker starenja ćelija. Enzim β galaktozidaza je hidrolaza lokalizovana u lizozomima ćelija eukariota koja u β -D-galaktozidima odvajava β -D-galaktoza rezidue. Aktivnost enzima je maksimalna pri pH 3-5 i zavisna je od vrste, organa, i supstrata. *Dimri i sar. (1995)* su objavili da ćelije koje su ostarele eksprimiraju određeni tip β -galaktozidaze, koji se može detektovati citohemijskim bojenjem korišćenjem hromogenog supstrata 5-bromo-4-hloro-3-indolil β -D-galactopiranozida (X-Gal) pri pH 6.0. Zbog toga što se β -galaktozidazna aktivnost kod ostarelih fibroblasta i ćelija kože povećava sa starenjem, enzim je dobio ime β -galaktozidaza vezana za starenje (SA- β Gal). SA- β Gal je merena *in vitro* u ćelijama različitog porekla i *in vivo* na uzorcima tkiva dobijenih biopsijom. Metoda citohemijskog određivanja prisustva enzima β -galaktozidaze nije precizna jer se teško može adekvatno kvantifikovati. Ona se zasniva na semikvantitativnoj proceni boje ćelija u kojima se uočava prisustvo aktivnosti ovog enzima u vidu slabog, srednje jakog i jakog intenziteta boje i negativno obojenih ćelija. Rezultat se izražava kao procenat pozitivnih ćelija koje eksprimiraju enzim β -galaktozidazu (*Yang i Hu., 2004*). Da bi na adekvatan način tumačili procese starenja potrebno je definisati šta je starenje. Posmatrano sa citološkog aspekta, dalji izazov se javlja u razlikovanju starenja ćelija *in vivo* i *in vitro*, iz čega proizlazi pitanje da li se starenje ćelija u kulturama može smatrati validnim modelom za ispitivanje starenja *in vivo*. Trenutno su u nauci aktuelne dve definicije starenja. Prema jednoj: „Starenje predstavlja zbir primarnih ograničenja u regenerativnim mehanizmima višćelijskih organizama“ (*rev. Sethe i sar., 2006*), dok prema drugoj „Starenje predstavlja suštinski gubitak deoba ćelija“ (*Campisi., 2000*).

S obzirom na to da se potencijalna primena MĆ u kliničkoj praksi zasniva na njihovoj prethodnoj izolaciji iz različitih tkiva i kultivaciji *in vitro*, starenje ćelija se može posmatrati kroz promene u njihovoj morfologiji i funkciji koje se dešavaju prilikom njihove kultivacije. Zabeleženo je da ćelije uzgajane *in vitro* pokazuju znake

starenja, što se odražava na njihove strukturne i funkcionalne promene. Čelije koje su ostarile postaju veće, šire su i imaju više produžetaka i tzv. aktinskih stres filamenata (*rev. Sethe i sar., 2006*). Nasuprot tome, mlade ćelije imaju više igličast oblik. Praćenjem formiranja CFU-F se retrospektivo može pratiti prisustvo P/MĆ. Neki autori tvrde da sa starenjem opada broj kolonija dok drugi potvrđuju da je taj broj nepromenjen. Takođe, postoji pretpostavka da ćelije usled starenja gube potencijal ka diferencijaciji u različita tkiva. Pojedini autori su zaključili da se sa starenjem gubi najpre osteogeni pa potom adipogeni potencijal što dovodi do razvoja osteoporoze, dok drugi smatraju da se sa starenjem adipogeni potencijal povećava (*rev. Sethe i sar., 2006, Muraglia i sar., 2000*). Međutim, bez obzira na neke značajne istraživačke rezultate, ne može se definitivno tvrditi kakav je uticaj starenja na proliferativni potencijal matičnih ćelija (*rev. Sethe i sar., 2006*). Postoji značajna tendencija da sa starenjem opada broj CFU-F mada je kod ljudi takva razlika minimalna. Koliko starenje utiče na matične ćelija je teško definisati jer je njihov broj *in vivo* jako mali, a svaki pokušaj kultivacije dovodi do promena kojima se gube originalne karakteristike ovih ćelija.

2.8. MATIČNE ĆELIJE U VETERINARSKOJ MEDICINI

U veterinarskoj kliničkoj praksi, MMĆ su najpre našle primenu u terapiji povreda tetiva a potom i ligamenta konja (Herthel, 2002). Herthel (2002) je prvi upotrebio MĆ u terapiji rupture ligamenata kod konja gde je direktno ubrizgao veliku količinu nativnog aspirata kostne srži (20 do 60 mL) u povređeni ligament, što je dovelo do poboljšanja i povećanja atletske sposobnosti u odnosu na dotadašnje konvencionalne terapijske procedure (rev. Fortier i Travis., 2011). Međutim, malo je verovatno da su uočeni rezultati nastali zbog MMĆ kako se tada smatralo, jer je poznato da su u nativnom aspiratu kostne srži one zastupljene u veoma malom broju. Mezenhimalne matične ćelije čine 0.001 % do 0.01 % ukupne količine mononuklearnih ćelija u kostnoj srži pa se može pretpostaviti da je pozitivan terapijski efekat koji su opisali pomenuti autori nastao usled uticaja brojnih bioaktivnih supstanci kao što su faktori rasta proizvedeni od strane hematopoetskih ćelija ili trombocita. U međuvremenu, to je dovelo do realizacije nekih pokušaja terapije pomoću MĆ koji nisu pokazali efikasnost ni *in vitro* ni u predkliničkim studijama sprovedenim na eksperimentalnim životinjama i modelima (rev. Fortier i Travis., 2011). Međutim, i dalje nije jasno da li po aplikaciji MMĆ u oštećeno tkivo dolazi do njihove diferencijacije u specifične ćelije tog tkiva i organa ili se iz aplikovanih ćelija luče imuno modulatorne i bioaktivne supstance koje utiču na aktivaciju regenerativnog potencijala ćelija tog tkiva. Moguće je da *in vivo* postoje oba mehanizma.

Nakon obavljenih pretkliničkih studija, javila se ideja o eventualnoj primeni MĆ u lečenju OA pasa jer su veterinari do sada mahom simptomatski lečili OA. Do sada je u nekoliko studija potvrđeno postojanje MĆ kod pasa i izvršena je njihova karakterizacija iz masnog tkiva, kostne srži (Csaki i sar., 2007, Vieira i sar., 2010) i na samo dva psa iz sinovijalne tečnosti (Krawetz i sar., 2012). Masno tkivo je zbog lake dostupnosti mnogo atraktivnije kao izvor MĆ od kostne srži, naročito kod malih rasa pasa od kojih se može uzeti samo mala količina uzorka. Sinovijalna tečnost je lako dostupna, za njeno uzorkovanje nije neophonda opšta anestezija i predstavlja neinvazivnu metodu u poređenju sa uzorkovanjem masnog tkiva i kostne srži. Klinička primena MĆ u maloj praksi još uvek nije zaživela, a naučna istraživanja iz ove oblasti su u stalnom razvoju. S obzirom na zaključak Internacionalnog društva za proučavanje osteoartritisa (OARSI) da pas predstavlja najbolji model za proučavanje OA ljudi, bilo je važno na modelu psa ispitati koje ćelije imaju dobar i stabilan hondrogeni potencijal, a

dobijene rezultate iskoristiti kao izvor informacija u humanoj i veterinarskoj medicini. Do ovog trenutka terapija životinja matičnim ćelijama nije zakonski regulisana ni u jednoj zemlji.

3. ANATOMSKE, HISTOLOŠKE I FIZIOLOŠKE KARAKTERISTIKE STRUKTURA KOLENOG ZGLOBA PASA

Sinovijalna tečnost je telesna tečnost koja ispunjava prostor zglobnih šupljina slobodno pokretnih zglobova (rameni, lakatni, koleni, tarzalni, karpalni zglob i zglob kuka), koji se zbog toga još nazivaju i sinovijalnim zglobovima (lat. *diarthroses*). Oni omogućavaju pokrete u tačkama kontakta artikulacionih površina kostiju i za razliku od drugih zglobova imaju kapsulu koja okružuje artikulacione površine u kojoj se nalazi ST. Šest različitih vrsta tkiva učestvuje u izgradnji sinovijalnih zglobova: kosti, ligamenti, tetive, zglobna kapsula, sinovijalna membrana i hrskavica hijalinog tipa.

3.1. Sinovijalna tečnost

Sinovijalna tečnost predstavlja ultrafiltrat plazme, u kojoj je koncentracija elektrolita, glukoze i uree slična onoj u krvi, dok je koncentracija proteina niska, jer kroz fenestrirajuće kapilare sinovijalne membrane prolaze samo proteini male molekulske mase. Fiziološki se u ST ne nalazi fibrinogen, niti drugi faktori koagulacije, pa ona ne koaguliše ni *in vivo* ni *in vitro*. Jedna od bitnih karakteristika ST je viskoznost koja potiče od hijaluronske kiseline (HK), a stepen viskoznosti zavisi od dužine, strukture i interakcije polisaharidnih lanaca HK. Što su lanci duži i više polimerizovani to je veća viskoznost ST. Uz pomoć tzv. mucinskog testa određuje se stepen viskoznosti ST. Fiziološki, ona je slabo celularna, bez eritrocita koji se ponekad mogu naći u tragu. Prisustvo velike količine eritrocita ukazuje na hemoragiju u zglobu ili na kontaminaciju ST krvlju, nastalu usled oštećenja krvnih sudova prilikom artrocenteze. Najveću populaciju ćelija ST čine mononuklearne ćelije, dok polimorfonukleari čine manje od 10% ukupne ćelijske populacije. Povećanje ukupnog broja ćelija u ST kao i povećanje zastupljenosti polimorfonuklearnih ćelija i vakuolizovanih mononuklearnih ćelija ukazuje na postojanje artropatija različite etiologije (tabela 1).

Tabela 1. Čelijski sastav sinovijalne tečnosti zdravih pasa i pasa sa različitim artropatijama

Dijagnoza	Ukupni broj ćelija ($\times 10^9/L$)	Mononuklearne ćelije(%)	Neutrofilni granulociti(%)	Vakuolizovane mononuklearne ćelije
Zdravo	< 2	94-100	<10	< 2
OA	2-5	88-100	0-12	2-5
RA	8-38	20-80	20-80	8-38
NIPP	4-370	5-85	15-95	4-370
IA	40-267	1-10	90-100	40-267

Villiers E, Blackwood L: BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Disorders, 2006.

Sinovijalna tečnost ima nutritivnu i lubrikantnu ulogu. Ona ishranjuje hrskavicu i ne dozvoljava pojavu trenja prilikom fleksije, ekstenzije i rotacije zgloba.

Uzorkovanje ST se izvodi pod aseptičnim uslovima procesom artrocenteze pomoću sterilne igle i šprica. Količina aspirirane ST zavisi od vrste i rase životinje kao i od vrste zgloba iz koga se uzorkovanje obavlja. Pregled ST ima veliki značaj u dijagnostici artropatija različite etiologije i obuhvata: određivanje fizičkih (količina, boja, prozirnost, viskoznost, pH) i biohemijskih karakteristika (koncentracija proteina, mucinski test koagulacije hijaluronata), određivanje ukupnog broja ćelija, citološki i mikrobiološki pregled. Fiziološki, ST je: bistra, blede žute boje, viskozna, neutralnog pH (7.2-7.4), sa koncentracijom proteina od 15 do 30 g/L i ukupnim brojem ćelija do 3000ćelija/ μ L (tabela 1).

Ukupan broj ćelija (engl. *Total nucleated cell count* - TNCC) može se odrediti na nekoliko načina: u komorici za brojanje ćelija odnosno hemocitometru, u automatskim analizatorima ili na razmazu, brojanjem ćelija na 10 reprezentativnih polja nakon čega se izračunata srednja vrednost pomnoži sa uvećanjem pod kojim je brojanje izvršeno (400x ili 1000x). Prilikom određivanja TNCC u komorici, uzorak se mora razrediti fiziološkim rastvorom ili tretirati hijaluronidazom.

Za citološki pregled ST neophodno je napraviti preparat neposredno po uzorkovanju. Nakon sušenja i bojenja Romanovskim tipom bojenja (*May Grunwald Giemsa* ili *Diff-Quick* metodom) diferencijalni broj ćelija određuje se pod imerzijom. U fiziološkim uslovima, citološki preparat ima ružičastu pozadinu koja potiče od proteina i HK u kojoj dominira populacija mononuklearnih ćelija (limfociti, monociti i

sinoviociti). Mikrobiološki pregled ST se radi ukoliko postoji sumnja na infektivni ili imunološki posredovani artritis. Uzorak koji se šalje na mikrobiološki pregled ne sme se stavljati u epruvete koje sadrže EDTA zbog moguće inhibicije rasta bakterija, već se stavlja u sterilne epruvete bez antikoagulansa.

3.2. Upotreba biomarkera u dijagnostici oboljenja zglobova

Savremena istraživanja usmerena su ka upotrebi biomarkera u ranoj dijagnostici OA, ljudi i životinja. U kliničkoj praksi postoji akutna potreba za pronalaženjem biomarkera koji će olakšati ranu dijagnostiku OA, uputiti nas na prognozu bolesti, dalji monitoring i terapiju. Pod biomarkerima se smatraju proteini, proteinski fragmenti, metaboliti, nukleinske kiseline (RNK i DNK) i ćelije. Oni se objektivno mogu izmeriti i daju realnu sliku fizioloških, patoloških procesa ili farmakološkog odgovora na primenjenu terapiju

Prema OARSI, biomarkeri se dele na takozvane vlažne biomarkere koji se mere u telesnim tečnostima (puna krv, plazma, serum, urin, ST itd) i na takozvane suve biomarkere u koje spadaju nukleinske kiseline i ćelije. Pored toga, biomarkeri se mogu podeliti na kolagenske biomarkere koje čine fragmenti degradacije kolagena i MMP i nekolagenske u koje spadaju biomarkeri hrskavice - COMP. Savremena istraživanja ukazuju na značaj kolagenskih i nekolagenskih biomarkera u kliničkoj praksi i na važnost daljih ispitivanja u toj oblasti (*Garvican i sar., 2010*).

3.2.1. Serum amiloid A (SAA)

Kod pasa, SAA predstavlja glavni protein akutne faze (*Ceron i sar., 2005*), čija se sinteza odigrava u jetri. Međutim, dokazana je i njegoa ekstrahepatična sinteza kod različitih vrsta životinja (sinovijalna tečnost, epitel mlečne žlezde) (*Marhaug i sar., 1997; McDonald i sar., 2001, Jacobsen i sar., 2005 i 2006*). Prisustvo različitih izoformi SAA u krvnom serumu i ST pasa uočeno je kod patološki stanja kao što su inflamatorna i degenerativna oboljenja zglobova, kao i kod inflamatornih i neinflamatornih oboljenja van zglobnog sistema (*Kjelgaard-Hanseni sar., 2007*). U ST inflamiranih zglobova dokazana je alkalna izoforma SAA (*Vallon i sar., 2001, Jacobsen i sar., 2006*) koja se lokalno sintetiše u zglobu pasa, konja, kunića i ljudi. Kod goveda, miševa i kunića detektovana je ekstrahepatična izoforma SAA, SAA3 (*McDonald 2001; Vallon i sar., 2001; Jacobsen i sar., 2005*), za razliku od ljudi kod kojih su SAA1 i SAA2 detektovani intraartikularno (*Vallon i sar., 2001*). Na osnovu dosadašnjih rezultata SAA se može smatrati dijagnostičkim markerom oboljenja zglobova. Pored SAA, ispitivanja su vršena i sa drugim proteinima akutne faze poput C reaktivnog proteina koji nije našao primenu u dijagnostici oboljenja zglobova.

Proteini akutne faze predstavljaju senzitivnije markere u dijagnostici inflamacije lokomotornog sistema od tradicionalnog radiološkog pregleda. Dosadašnja saznanja o kvalitativnim karakteristikama SAA izoformi kod pasa i stepen njihove sinteze u ekstrahepatičnim tkivima su malobrojna i potrebno je sprovesti dalja ispitivanja na tom polju.

3.3. Zglobna hrskavica

Hrskavica predstavlja vezivno tkivo koje je vrlo rasprostranjeno u organizmu sisara. Razlikujemo tri tipa hrskavice: hijalinu, elastičnu i fibroznju. **Hijalina hrskavica** je staklasta i ima providno belu boju pa zato njen naziv i potiče od grčke reči *hyalin*, što znači providan. Ona je u najvećoj meri sastavljena od PG koji imaju visoko refraktarni indeks i kolagena tipa II. Ovaj tip hrskavice najčešće oblaže epifize kostiju i olakšava klizanje koštanih delova, omogućavajući tako amortizaciju i raspodelu potisnih sila i sila trenja koje se javljaju prilikom pokretanja zglobova. Hijalina hrskavica se takođe nalazi u nosnoj pregradi, laringsu, traheji, bronhusima i oblaže artikulacione površine sternebri. U stadijumu fetusa, na samom početku stvaranja skeleta, hijalina hrskavica predstavlja osnovni element, koji će u procesu endohondralnog okoštavanja omogućiti razvoj i rast dugih kostiju. **Elastična hrskavica** se razlikuje od hijaline po velikom broju vlakana elastina koji joj daju osobine širenja i velike fleksibilnosti. Ovaj tip hrskavice se nalazi u spoljašnjem uhu, nozdrvama i epiglotisu. **Fibroznju hrskavicu** predominantno čini kolagen tipa I i ona ima veliku otpornost na pritisak i istežanje. Zbog toga se nalazi na spojevima hijaline hrskavice sa ligamentima i tetivama, a takođe ulazi u sastav meniskusa i intervertebralnih diskova.

Zglobna hrskavica predstavlja vezivno tkivo hijalinog tipa, koja prekriva površinu zglobova. Ona je avaskularna, alimfatična i aneuralna, pa zbog toga ima vrlo ograničenu mogućnost spontane reparacije i slab proliferativni potencijal. Sastoji se samo od jednog tipa ćelija, hondrocita, koji stvaraju i obnavljaju ECM, veoma bogat kolagenim vlaknima i PG/GAG. Ishrana hrskavice se vrši difuzijom hranljivih materija iz ST i subhondralne kosti (*Mobasheri i sar., 2008*), a ovi putevi su takođe uključeni u proces izlučivanja metaboličkih produkata. Difuzija hranljivih materija zavisi od veličine, oblika i težine molekula, kao i od koncentracije PG koja predstavlja jedan od faktora regulisanja difuzije. Pri opterećenju zglobova dolazi do kompresije i izbacivanja metaboličkih produkata u ST, dok pri rasterećenju dolazi do vraćanja tečnosti i

hranljivih materija u hrskavicu. Ekstracelularni matriks stvara jedno molekularno sito koje vrši selekciju molekula koji kroz hrskavicu prolaze. Tako molekuli čija je molekularna masa veća od 70 kDa ne mogu da prođu kroz ovu barijeru. Zglobna hrskavica ima jedinstvena mehanička svojstva. Usled delovanja različitih faktora (mehanička oštećenja, inflamacija, infektivni agensi i drugo) dolazi do prevage kataboličkih procesa u hrskavici i nastanka OA, kada je kompromitovano očuvanje njenog integriteta (rev. *Becerra i sar., 2010*).

3.3.1. Histološka građa zglobne hrskavice

Posmatrano sa histološkog aspekta, zglobna hrskavica je podeljena u četiri zone. To su: površinska ili tangentna zona, tranziciona ili srednja zona, duboka ili radijalna zona i zona okoštavanja odnosno kalcifikovana zona. Ova podela je bazirana na osnovu veličine i oblika ćelija, orijentacije kolagenih vlakana i zastupljenosti PG/GAG (rev. *Becerra i sar., 2010*).

Površinska ili tangentna zona je u kontaktu sa ST, čini 5-10% debljine hrskavice i sastoji se iz dva pod sloja. Prvi sloj je acelularan, prekriva površinu zgloba i sastoji se iz kolagena tipa I, II i III i male količine PG. Drugi sloj se nalazi dublje, sadrži hondrocite elipsoidnog oblika, kolagena vlakna, fibronektin i malu količinu PG. Kolagena vlakna i hondrociti su orijentisani paralelno sa površinom zglobne hrskavice (rev. *Clouet i sar., 2009*, rev. *Becerra i sar., 2010*).

Srednja ili tranziciona zona čini 40-45% debljine zglobne hrskavice. Hondrociti ovog sloja su ovalnog oblika i veći su od hondrocita površinske zone. Imaju neravnomeran raspored i vrlo su aktivni u sintezi PG i kolagena tipa: II, IX i XI. Kolagena vlakna se prepliću tako da stvaraju neorijentisanu mrežu, manje čvrstu i manje hidrantnu nego što je ona u površinskoj zoni. Uloga ove zone je da rasporedi i apsorbuje sile pritiska koje deluju na hrskavicu (rev. *Clouet i sar., 2009*).

Duboka ili radijalna zona čini 40-45% debljine hrskavice. Naziv radijalna potiče od načina rasporeda hondrocita koji su raspoređeni u kolonama zbog toga što su kolagena vlakna vertikalno orijentisana u odnosu na površinu zglobne hrskavice. Najzastupljenija kolagena vlakna ove zone su kolageni tipa II, IX i XI. Ona imaju najveću debljinu, proporcionalan sadržaj PG u ECM u poređenju sa ostalim slojevima hrskavice i jako mali sadržaj vode. Ova zona omogućava zglobnoj hrskavici otpornost na sile pritiska (rev. *Clouet i sar., 2009*).

Kalcifikovana zona hrskavice čini samo 5-10% njene debljine. Ovaj sloj razdvaja hrskavicu od subhondralne kosti. Organizacija sastavnih delova ECM je slična dubokoj zoni, međutim gustina hondrocita je manja, oni su hipertrofični i karakteriše ih sinteza kolagena tipa X. Karbonati koji se talože na kolagenim vlaknima direktno prolaze do epifize kosti omogućavajući na taj način učvršćavanje hrskavice. Duboka zona je odvojena od kalcifikovane hrskavice jednim tankim, gustim slojem koji se naziva *tidemark*. Ova gusta zona je bogata kolagenim vlaknima, HK ali ne sadrži PG i GAG (*Lane i Bullough., 1980*). Histološki sastav i organizacija zglobne hrskavice nije konstantan tokom života i menja se sa starenjem (*Lane i Bullough., 1980, rev. Becerra i sar., 2010*).

3.3.2. Sastav zglobne hrskavice

Zglobnu hrskavicu čine hondrociti, komponente ECM (kolagena vlakna, PG/GAG) i voda koja predstavlja najzastupljeniju komponentu (70-80%) (*Aigner i Stöve., 2003*).

3.3.2.1. Hondrociti

Hondrociti su visoko diferencirane ćelije zglobne hrskavice koje čine oko 10% ukupnog tkivnog volumena. Oblik, veličina i ultrastruktura hondrocita zavise od stepena njihove aktivnosti. Mladi hondrociti su aktivniji i najčešće su okruglog oblika, a na njihovoj površini se nalaze brojne mikroresice koje se mogu uočiti elektronskom mikroskopijom. Aktivni hondrociti imaju bazofilnu citoplazmu zbog većeg broja gEPR i svetlu zonu u blizini jedra što odgovara poziciji GA. Kod starijih hondrocita bazofilija opada, a citoplazma postaje svetlija usled nagomilavanja inkluzija glikogena i masti. Zbog odsustva krvnih sudova hondrociti imaju anaerobni metabolizam. Oni sintetišu komponente ECM (PG, HK), enzime (katepsin B i L), matriks metaloproteinaze (MMP), kolagenaze, agrekanaze i druge molekule iz porodice ADAMTS peptidaza (*Jones i sar., 2005*). Brzina obnavljanja različitih proteina ECM zavisi od vrste molekula, pa tako poluživot kolagena tipa II iznosi nekoliko stotina godina (100-400) (*Verzijl i sar., 2000*), dok je poluživot agrekana znatno kraći i iznosi dvadesetak godina (*Maroudas i sar., 1998*).

Metabolizam zglobne hrskavice se neprekidno odvija pod uticajem fizičko hemijskih faktora i cikličnih sila koje deluju oko hondrocita i utiču na njihov oblik. To

ima za posledicu modifikovanje aktinskih filamenata citoskeleta, što može uticati na ekspresiju pojedinih gena, čime se potvrđuje direktna veza između mehaničkih uticaja i metabolizma hondrocita (*Sommarin i sar., 1989*). Fizičko-hemijski i mehanički stimulusi regulišu anaboličke i kataboličke aktivnosti u hrskavici. Tako fiziološko opterećenje čiji je pritisak manji od 15 MPa u hrskavici favorizuje anaboličke procese, dok stres nastao usled ponavljanog pojačanog opterećenja može rezultirati pojavom njenog oštećenja (*Burgin i sar., 2008*). Delovanje različitih nadražaja na zglobnu hrskavicu može dovesti do promena u veličini ćelija, pH vrednosti i jačini jonskih sila, stvarajući na taj način signale koji određuju obnavljanje ECM.

Ovi različiti stimulusi podstiču lučenje citokina (IL, IFN, TNF) i faktora rasta koji stimulišu anaboličke ili kataboličke procese. Stvaranjem IL-1 β ili TNF- α od strane hondrocita stimuliše se sinteza kataboličkih enzima kao što su MMP i ADAMTS koji su odgovorni za razgradnju kolagena i PG ili za sintezu proinflamatornih molekula NO ili PGE2 (*Jones i sar., 2005*). Neki faktori rasta kao što su FGF, IGF, TGF- β i BMP stimulišu sintezu sastavnih komponenti ECM zglobne hrskavice. Različiti hormoni, poput hormona rasta, insulina, kalcitonina i steroida, stimulišu proliferaciju hondrocita i sintezu komponenti ECM. Ovi podaci pokazuju da je biologija zglobne hrskavice dobro regulisana i usko povezana sa faktorima okoline.

3.3.2.2. Kolagena vlakna

Ekstracelularni matriks hrskavice čine kolagena vlakana (najvećim delom kolagen tipa II, IX i XI), voda, PG/GAG, nekolagenski proteini (COMP) i leucin. Kolageni su najzastupljeniji proteini sisara i kod čoveka predstavljaju približno trećinu svih proteina organizma (oko 5% njegove težine). Do sada je indentifikovano 29 različitih tipova kolagena, a u zglobnoj hrskavici ih ima dvanaest: kolagen tipa I, II, III, V, VI, IX, X, XI, XII, XIII, XIV i XV.

Kolagen tipa I je najrasprostranjeniji u organizmu kičmenjaka. Prisutan je najviše u tetivama, kostima, koži, rožnjači, zidovima krvnih sudova i hrskavici. Prisustvo kolagena tipa I koji se sastoji iz dva α lanca (rev. *van der Rest i Garrone., 1991*) potvrđeno je u površinskom delu zglobne hrskavice i subhondralnoj kosti. Mutacije na genu odgovornom za kodiranje sinteze kolagena tipa I su odgovorne za nastanak pojedinih bolesti. Tako *Osteogenesis imperfecta* predstavlja jedno od najčešćih oboljenja uzrokovanih promenom na genu COL1A1.

Kolagen tipa II čini 80% ukupne količine kolagena u zglobnoj hrskavici (Aigner i Stöve., 2003), ali se može naći i u drugim strukturama kao što su intervertebralni diskovi (Eyre i sar., 2002), mrežnjača, rožnjača i staklasto telo. Kolagen tipa II je sastavljen iz tri α lanca, a za njegovu sintezu je odgovoran gen COL2A1. Postoje dva oblika transkripta gena COL2A1, mitRNK tipa IIA i IIB. Izoforme IIA i IIB jedino se razlikuju u prisustvu ili odsustvu EXON2. Kolagen tipa IIA sadrži EXON2 i uključen je u adaptaciju, organizaciju i tkivnu interakciju. Nasuprot tome, kratka forma IIB ne sadrži EXON2 i izražena je u zrelih hondrocitima i adultnoj hrskavici. Transgeni miševi za gen COL2a1 oboljevaju od smrtonosne hondrodisplazije koja se karakteriše poremećajem u razvoju dugih kostiju i potpunim nedostatkom ploče rasta. Ovaj podatak ukazuje na značaj kolagena II u mehanizmima oblikovanja i stvaranja zglobne hrskavice, posebno u procesu endohondralnog okoštavanja (Li i sar., 1995). Mutacije na genu COL2a1 odgovorne su za ahondrogenezu ili hipohondrogenezu, displazije različitog tipa kao i neke oblike artroza.

Kolagen tipa III je drugi najrasprostranjeniji kolagen u organizmu posle kolagena tipa I. Prisutan je u kostima, adultnoj i fetusnoj hrskavici, hrskavici jedinki obolelih od artritisa, koži, krvnim sudovima i unutrašnjim organima. On ima strukturu trostrukog heliksa (rev. van der Rest i Garrone., 1991), a mutacije koje se mogu javiti na genu COL3a1 udružene su sa pojavom najtežeg oblika *Ehlers-Danlos* sindroma (Mao i sar., 2001) koji može dovesti do smrti jedinke usled ruptуре aortnog luka ili nekog drugog vitalnog organa.

Kolagen tipa VI ima strukturu trostrukog heliksa i nalazi se svuda u organizmu. Prisutan je u: zglobnoj hrskavici, *nucleus pulposus*, rožnjači, mišićima i koži. Mreža kolagena tipa VI je koncentrisana oko hondrocita (rev. van der Rest i Garrone., 1991, rev. Becerra i sar., 2010) i on učestvuje u održavanju tkiva, interakciji između ćelija i ECM i u interakciji komponenata ECM. Kolagen tipa VI međusobno intezueguje sa proteinima ECM kao što su fibronektin, dekorin, biglikan i HK. Uloge kolagena tipa VI su još uvek slabo definisane, ali je poznato da on učestvuje u prenošenju mehaničkih signala između hondrocita i komponenti ECM. Mutacije u genu za kolagen tipa VI dovode do pojave miopatija i mišićne distrofije (Lampe i sar, 2005). Preveliko prisustvo kolagena tipa VI dovodi se u vezu sa degenerativnim obolenjima zglobova (Swoboda i sar., 1998).

Kolagen tipa IX je svrstan među kolagene vlaknastog tipa sa prekinutim trostrukim helksom. On čini oko 1% ukupne količine kolagena u zglobnoj hrskavici,

što ga svrstava među takozvanim drugorazrednim kolagenima. Sastavljen je iz tri α lanca koji su kodirani od strane 3 različita gena COL9A1, COL9A2 i COL9A3. U hrskavici, kolagen tipa IX se vezuje za PG i prisutan je na njenoj površini. On ima važnu ulogu u očuvanju strukture zglobne hrskavice, što je pokazano kod miševa deficijentnih u kolagenu tipa IX kod kojih se javlja degeneracija zglobne hrskavice slična artrozi usled njegovog nedostatka (*Fassler i sar., 1994*).

Kolagen tipa X pripada porodici kolagena kratkih lanaca i sastavljen je iz tri α lanca. Prisutan je u ploči rasta stvoren od strane hipertrofičnih hondrocita, u kalusu koji se stvara tokom procesa zarastanja kostiju, zoni koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice, kalcifikovanoj zoni hrskavice, površinskom sloju zdrave zglobne hrskavice, intervertebranim diskovima, tetivama, ligamentima i meniskusima (*Lammi i sar., 2002*). Kod mladih hondrodistrofičnih pasa kao što su pri rase bigl, kolagen tipa X je osim u kalcifikovanoj prisutan i u nekalcifikovanoj hrskavici femura i tibije (*Lammi i sar., 2002*). Kolagen tipa X formira heksagonalnu fibrilarnu mrežu u ECM sa kolagenom tipa II i PG. Ekspresija gena za kolagena tipa X je detektovana u hondrocitima zglobne hrskavice zahvaćene artrozom koja se manifestuje okoštavanjem sa pojavom osteofita i sklerozom subhondralne kosti (*Girkontaite i sar., 1996*).

Kolagen tipa XI čini 3-10% ukupne količine kolagena u zglobnoj hrskavici, ima strukturu trostrukog heliksa koga čine tri jednaka α lanaca (*Eyre i sar., 2002*). Učestvuje u izgradnji kolagenske mreže, vezuje se za kolagen tipa II, heparin-sulfat i dermatan-sulfat. Iako je količina kolagena tipa XI u zglobnoj hrskavici mala, on ima važnu ulogu u stvaranju i organizaciji ECM u ranom stadijumu razvoja. Mutacije na genu za kolagen tipa XI dovode do hondrodisplazije. Miševi deficijentni za kolagen tipa XI po rođenju umiru i pokazuju anomalije u zglobnoj hrskavici ekstremiteta, vilice i dušnika.

3.3.2.3. Proteoglikani, glikozaminoglikani i njihovi receptori

Proteoglikani (PG) su po zastupljenosti organskih komponenti u hrskavici na drugom mestu. Sastoje se iz kovalentno vezanih glikozainoglikana (GAG). Njihova sinteza se vrši u GA koja započinje sintezom proteina u EPR, zatim se vrši dodavanje lanaca GAG, nakon čega dolazi do njihovog sazrevanja (epimerizacija i sulfatacija). Zbog prisustva sulfatne i karboksilne grupe su negativno naelektrisani. Proteoglikani su svrstani u pet različitih familija: hijalektani, PG bazalne membrane (perlakan, bamekan, agrin, leprekan), mali PG bogati leucinom (SLRPs) koji se sintetišu u ECM, površinski

PG (sindekan, betaklikan) i cirkulišući PG. U PG spadaju: agrekan, versikan, perlekan, biglikan, dekorin, sundekan i drugi. (rev. *Garvican i sar., 2010*). Glikozaminoglikani se sastoje od heksozamina i heksuronske kiseline, izuzev keratin-sulfata kod koga je heksuronska kiselina zamenjena ostatkom galaktoze. Postoje dve izomerne forme heksozamina i to N-acetil-D-glukozamin (GlcNAc) i N-acetil-galaktozamin (GalNAc), na osnovu kojih razlikujemo glikozaminoglikane u koje spadaju heparin-sulfat i keratin-sulfat i galaktozaminoglikane u koje spadaju hondroitin i dermatan sulfat. Hijaluronska kiselina je GAG koja ne sadrži sulfatne grupe i ne vezuje se ni sa jednim proteinom. Disaharidi HK se sastoje od D-glukuronske i D-glukozaminske kiseline.

Proteogikani su vrlo važni u očuvanju integriteta hrskavice, oni skladište i čuvaju faktore rasta i citokine i učestvuju u intracelularnoj signalizaciji. Agrekan ima jednu od najvažnijih uloga u zadržavanju vode u hrskavici. Svojim negativnim naelektrisanjem on privlači jone suprotnog naelektrisanja i tako dolazi do povećanja osmolarnosti i drenaže vode iz okoline.

Agrekan je najzastupljeniji PG u zglobnoj hrskavici (90%) koji spada u grupu hijalektana. Ovaj naziv su dobili zbog osobine da se mogu vezivati za HK i lektin. Agrekan se sastoji iz N i C-terminalnog kraja i centralnog dela. N-terminalni kraj ima dva globularna dela koji se označavaju kao G₁ i G₂ i koji su odvojeni jedan od drugog međuglobularnom zonom. Globularna oblast G₁ sadrži mesto za vezivanje HK, dok G₂ služi za vezivanje sa kolagenim vlaknima. Centralni deo agrekana se sastoji iz dva dela: keratin-sulfata (odgovoran za vezivanje sa kolagenim vlaknima) i hondroitin-sulfata (odgovoran za hidrataciju hrskavice). C-terminalni deo čine: lektin, koji ima ulogu u interakciji između ćelija, epidermalni faktor rasta (EGF) i proteini regulatori komplekta (rev. *Garvican i sar., 2010*). Pored kolagena i PG, postoji veliki broj proteina ECM poput glikoproteina i membranskih proteina koji imaju važnu ulogu u održavanju funkcije hrskavičavog tkiva, kao što su integrini, trombospondin, fibronektin, lubricin i CD44.

Površinski marker CD44 je receptor za HK. To je multifunkcionalni i multistrukturalni receptor (glikoprotein) na površini mnogih ćelija kao što su: hondrociti, epitelne ćelije, limfociti, monociti, makrofagi, tumorske ćelije i drugi. Teoretski posmatrano u organizmu može da se generiše oko 800 njegovih izoformi, ali je do danas poznato svega nekoliko desetina. Njegova polimorfna priroda može da objasni njegovu multifunkcionalnost i sposobnost da učestvuje u interakciji između mnogih ćelija i ekstracelularnih liganda, kao i ćelijskoj adheziji i migraciji u krvnim

sudovima i tkivima. On je receptor HK koji može da interaguje i sa drugim ligandima poput osteopontina, kolagena i MMP. Uključen je u ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i angiogenezu. Ćelije uključene u patološke procese, kao što su ćelije tumora, ćelije koje učestvuju u inflamatornom odgovoru i epitelne ćelije, koriste CD44 receptor kao marker lokalizacije i širenja ka ekstravaskularnom prostoru (Lesley i sar., 1998). U nativnoj formi, HK je polimer velike molekulske mase (preko 1MDa), ali tokom zapaljenja dolazi do akumuliranja fragmenata manje molekulske mase, manje od 500 kDa (McKee i sar., 1996). Fragmenti HK male molekulske mase se u većoj meri vezuju za CD44 receptor u odnosu na nativnu HK čija je molekulska masa veća, dovodeći do aktivacije i amplifikacije intracelularnih signala, aktivacije gena i ekspresije proinflamatornih medijatora, kao što su: NF- κ B, azot-oksidi-sintetaza (McKee i sar., 1997) i hemokini (McKee i sar., 1996). Fragmenti HK male molekulske mase takođe stimulišu angiogenezu (West i sar., 1985) koja predstavlja važan faktor u inflamaciji. Naime, aktivirana hijaluronidaza i reaktivni slobodni kiseonikovi radikali posreduju u fragmentaciji HK, što se događa u slučaju inflamatornih stanja zglobova pa tako dolazi akumulacije HK niske molekulske mase (Saari i sar., 1991).

Trombospondini (TSP) su glikoproteini ECM koji su podeljeni u dve podgrupe: TSP-1 i 2 i TSP-3, 4 i 5 koji se još **nazivaju cikličnim oligomernim matriks proteinima (COMP)**. Ovi proteini učestvuju u interakcijama između ćelija, kao i između ćelija i ECM i imaju antiangiogenu aktivnost (rev. Garvican i sar., 2010). U zdravoj, adultnoj hrskavici, TSP-1 je eksprimiran u srednjoj i dubokoj zoni, intereaguje sa CD36 i na taj način ispoljava snažno antiangiogeno dejstvo. Trombospondini 1 i 2 imaju sposobnost vezivanja sa različitim komponentama ECM zglobne hrskavice i sa proteinima na površini hondrocita, kao što su integrini, sindekani, fibronektin, laminin, kolagen tipa V i utiču na aktivnost faktora rasta (TGF- β , FGF-2 i bFGF) i MMP. Trombospondin 3 (TSP-3) je u adultnoj hrskavici eksprimiran u hipertrofičnoj zoni i u fazi okoštavanja hrskavice, TSP-4 je slabo eksprimiran u adultnoj hrskavici i najviše je izražen stadijumu fetusa, dok TSP-5 predstavlja važnu komponentu hijaline hrskavice. Ciklični oligomerni matriks proteini se vezuju za kolagen tipa II i IX, fibronektin i agrekan (Verzijl i sar., 2000, rev. Garvican i sar., 2010), a određivanje njihove koncentracije u ST i serumu može biti iskorišćeno u dijagnostici rane degeneracije zglobne hrskavice (rev. Garvican i sar., 2010). Nedavna studija izvedena na miševima pokazala je da mutirani oblik COMP-a dovodi do apoptoze hondrocita i pojave pseudo hondrodisplazije.

Lubricin i superficijalni zonalni protein (SZP) su mucinozni glikoproteini kodirani od strane istog gena PRG4. Luče ih sinoviociti i hondrociti površinske zone hrskavice, a kod OA dolazi do smanjenja njihove sinteze (*rev. Becerra i sar., 2010*). Smanjena glikozilacija lubricina i SZP dovodi do privlačenja neutrofilnih granulocita koji na taj način učestvuju u inflamatornom odgovoru. Miševi deficijentni za gen PRG4 pokazuju znake sinovijalne hiperplazije i fibroze. Ova zglobna disfunkcija je vrlo slična onoj koja je uočena kod ljudi sa artropatijama, deformitetima zgloba kuka usled poremećaja u odnosu glave i vrata butne kosti - *Coxa vara*.

3.3.3. Mehanička svojstva i uticaj fizičke aktivnosti

Osnovna uloga zglobne hrskavice je da pomaže pokrete zgloba i ublažava sile pritiska na duge cevaste kosti prilikom kretanja. Ta uloga se ostvaruje kretanjem tečnosti kroz hrskavicu koja omogućava transport hranljivih materija i produkata metabolizma. Intersticijalna tečnost koja sadrži vodu, metabolite i malu količinu proteina, filtrira se iz ST i absorbuje u matriks hrskavice. Ova tečnost hrani hondroците i daje elastičnost matriksu. Kada se hrskavica deformiše tokom faze opterećenja u pokretu, izvesna količina tečnosti se istiskuje u zglobnu šupljinu, noseći sa sobom produkte metabolizma i istovremeno podmazuje zglobne površine. Nakon izbacivanja vode započinje delovanje drugog mehanizma koji povećava elastičnost hrskavice prilikom koga dolazi do uzajamnog elektrostatičkog odbijanja negativno naelektrisanih karboksilnih i amino grupa PG prevashodno agrekana. Kao posledica ovoga dolazi do razdvajanja PG i nastaju prostori koje zauzima voda. Kada pritisak popusti tokom faze rasterećenja, voda se vraća u intersticijum između ogranaka PG i hrskavica dobija svoj prvobitni oblik. Agrekan štiti hondroците i kolagena vlakna od mehaničkih oštećenja, ali je zato on sam slabo zaštićen. Iz tih razloga gubitak agrekana predstavlja jedan od najranijih znakova oštećenja hrskavice i centralno mesto odvijanja patofiziološkog procesa OA.

Fizička aktivnost ima važnu ulogu u očuvanju integriteta hrskavice (*Newton i sar., 1997, Firth i sar., 2005*). Dokazano je da teško fizičko opterećenje dovodi do intenziviranja kataboličkih procesa u hrskavici (*Kiviranta i sar., 1992*). Takođe, opterećenje nestabilnog zgloba rezultira brojnim promenama u strukturi i funkciji hijaline hrskavice i pojave OA. Podaci iz humane medicine ukazuju na to da se OA češće javlja kod žena nego kod muškaraca (*Jones i sar., 2003*), dok u veterinarskoj

medicini za sada ne postoje objavljene studije o polu kao predisponirajućem faktoru za nastanak OA. Do sada je objavljen relativno mali broj studija na psima koje ukazuju na uticaj fizičkog opterećenja na hrskavicu. Ispitivanja su pokazala da dugotrajno opterećenje dovodi do promena različitog stepena koje se na hrskavici mogu razviti na različitim mestima. Kod mladih pasa je u literaturi opisana očuvana adaptaciona sposobnost hrskavice na dugotrajno fizičko opterećenja (*Newton i sar., 1997*), ali postoje i podaci koji ukazuju na pojavu fibrilacije, smanjivanja debljine hrskavice i gubitak PG/GAG (*Kiviranta J i sar., 1992*). Vrlo je teško jasno definisati uticaj fizičkog opterećenja na zglobnu hrskavicu kod pasa jer su literaturni podaci veoma raznovrsni. Ove razlike potiču od samog pristupa ispitivanju, tipu opterećenja koji je primenjivan i starosti pasa. Potrebne su dugoročne studije i studije na spontano nastalim promenama, a njih je najteže izvesti.

3.3.4. Uticaj starenja i degenerativne promene

Pojava osteoartritisa se često dovodi u vezu sa starenjem koje samo povećava rizik za razvoj ovog oboljenja (*Buckwalter i sar., 1997, Martin i sar., 2002, Loeser 2009*). Međutim, osteoartritis se ne javlja kod svih starijih jedinki i nisu svi zglobovi podjednako podložni razvoju OA. Veza između starenja i pojave OA nije još uvek u potpunosti razjašnjena, ali dosadašnja istraživanja ukazuju da promene na muskuloskeletnom sistemu koje nastaju usled starenja mogu voditi ka pojavi OA. Smatra se da gojaznost, povrede i genetski faktori predstavljaju značajne faktore rizika (*Loeser., 2009*), a eksperimentalna istraživanja su potvrdila da mehanički izazvana nestabilnost zgloba takođe dovodi do razvoja OA (*Loeser., 2009*).

Promene koje nastaju tokom OA nezahvataju samo zglobnu hrskavicu već i druge strukture zgloba: subhondralnu kost, ligamente, tetive, sinovijalnu membranu i meniskuse. Međutim, promene koje se javljaju na ovim strukturama nisu do te mere proučene kao promene nastale na zglobnoj hrskavici (*Loeser., 2009*). Vrlo je teško jasno razgraničiti promene na hrskavici koje se razvijaju isključivo kao posledica starenja od promena koje vode ka pojavi OA. Martin i Buckwalter su 2001. godine pokušali da diferenciraju promene koje se javljaju kao posledica starenja od degenerativnih promena koje mogu voditi ka pojavi OA.

Pomenuti autori smatraju da **usled starenja** dolazi do lokalne pojave fibrilacije na površini hrskavice, smanjenja količine vode usled strukturnih promena na agrekanu

na kome dolazi do skraćivanja njegovih lanaca. Pored toga, starenje dovodi do povećavanja dijametra kolagenih vlakana, smanjenja gustine hondrocita, kao i smanjenja njihove sintetske sposobnosti i sposobnosti za deobu.

Pod **degenerativnim promenama** na zglobnoj hrskavici koje mogu voditi ka pojavi OA navode se:

1. omekšavanje površine zglobne hrskavice;
2. smanjivanje njene ukupne debljine sa potpunim gubitkom na pojedinim mestima;
3. progresivna degradacija i gubitak PG, HK i kolagenih vlakana;
4. gubitak hondrocita;
5. inicijalno povećanje sadržaja vode;
6. promene u orijentaciji kolagenih vlakana;
7. inicijalno povećanje proliferativne i sintetske aktivnosti hondrocita i
8. povećanje aktivnosti kataboličkih enzima.

Prvi znaci koji ukazuju na degeneraciju hrskavice su gubitak PG i povećanje koncentracije vode u matriksu. Smanjenje debljine hrskavice nastaje usled progresije degenerativnih procesa i intenziviranja kataboličkih procesa (*Martin i Buckwalter., 2000*). Degenerativne promene na hrskavici nisu uvek praćene njenim omekšavanjem. Kod ljudi je uočeno da kod nekih jedinki sa potpunim gubitkom zglobne hrskavice postoji potencijal ka spontanoj samoobnovi njene površine (*Martin i Buckwalter., 2000 i 2001*). Nije utvrđeno koliko često se to događa i pod kojim okolnostima, ali pojava ovog fenomena je interesantna i zahteva dalja ispitivanja.

Najizraženija strukturna promena koja se javlja na hrskavici usled degeneracije je pojava fibrilacije (*Martin i Buckwalter., 2000*). Najveći broj ljudi kod kojih je izražena ova promena nema poremećaj funkcije zgloba niti oseća bol. Fibrilacija ne mora da vodi ka progresivnoj degeneraciji koja je odgovorna za pojavu OA. Promene u ECM vezane za progresivnu degradaciju i gubitak PG, HK i kolagenih vlakana vode ka promenama u molekularnoj strukturi i mehanici matriksa hrskavice. Strukturne, molekularne i celularne promene i promene nastale uticajem mehaničkih faktora čine hrskavicu podložnijom za nastanak degenerativnog OA (*Martin i sar., 1997, Martin i Buckwalter., 2000*).

3.3.5. Patofiziologija osteoartritisa

Prva hipoteza patofiziološkog procesa OA odnosila se na uticaj mehaničkih faktora na razvoj degenerativnih promena tokom starenja. Danas se zna da je OA multifaktorijalno oboljenje čije promene zahvataju sve zglobne strukture: hrskavicu, subhondralnu kost, SM, meniskuse i ST i koje se podjednako javlja i kod mladih i kod starih jedinki. Osteoartritis se nesmatra isključivom posledicom starenja već se sa starenjem samo povećava verovatnoća njegovog nastanka zbog smanjenja količine anaboličkih faktora kao što su IGF, TGF, BMP i FGF (*rev. Clouet i sar., 2009*).

U histopatološkom pogledu kod OA se na hrskavici javljaju sledeće promene:

1. Površina hrskavice postaje hrapava;
2. Hondrociti postaju aktivni, dele se i raspoređuju u takozvane klastere, izogene grupe kružnog oblika;
3. Ponovo dolazi do ekspresije kolagena tipa IIA, forme kolagena koja je prisutna samo u fetalnoj hrskavici tokom embrionalne hondrogeneze. Ova pojava potkrepljuje hipotezu da kada dođe do razvoja OA, hrskavica teži da se regeneriše oponašanjem mehanizama koji su bili prisutni tokom embrionalne hondrogeneze;
4. Nastupa intenziviranje sinteze PG i kolagena u početnoj fazi razvoja OA, jer hondrociti pokušavaju da suprimiraju razvoj kataboličkih procesa;
5. Nakon završetka ovih ranih kompenzatornih mehanizama hrskavice, dolazi do povećanja aktivnosti kaspaze i razvoja apoptoze hondrocita. Ovaj mehanizam ostaje aktivan tokom celog procesa bolesti. Kaspaza učestvuje u nizu kaskadnih reakcija u procesu apoptoze, pa stoga inhibicija signalnih puteva posredstvom inhibicije kaspaze verovatno predstavlja obećavajuće sredstvo u menadžmentu OA;
6. Povećava se aktivnost kataboličkih procesa usled povećanja aktivnosti IL 1 i TNF α koji stimulišu sintezu MMP 2, 7, 8, 9, 13 i 14, i ADAMTS 1, 2, 4 i 5;
7. Dolazi do povećanja koncentracije adipokina: leptina, adiponektina i resistina usled razvoja inflamatornog procesa na masnom jastučetu;
8. S obzirom na to da je osteoartritis oboljenje multifaktorijalne etiologije potreban je multidisciplinarni pristup za uspešno praćenje i terapiju ove bolesti. Nova istraživanja u oblasti proteomike će omogućiti pronalaženje specifičnih i senzitivnih markera koji mogu biti od velike koristi u ranoj dijagnostici OA.

3.4. Zglobna kapsula

Zglobna kapsula obavija zglobove u tipu diartroza i od vitalnog je značaja za njihovu funkciju. Zajedno sa ligamentima zatvara zglobnu šupljinu i stabilizuje zglob ograničavajući pokrete fleksije, ekstenzije i rotacije. Sastoji se iz tri sloja: spoljašnjeg, koga čine gusto raspoređena fibrozna vlakna koja daju stabilnost i fleksibilnost zglobu i unutrašnjeg dela koga čini sinovijalna membrana.

3.5. Struktura sinovijalne membrane

Sinovijalna membrana je tkivo koje oblaže unutrašnjost zglobne kapsule izuzev zglobne hrskavice i meniskusa. Razlikuje se od drugih mezotelnih membrana po tome što nema pravi epitel, već se sastoji iz subintime i intime. Intima je glatka, vlažna i sjajna, sa malim naborima na površini, koju čine 1 do 2 sloja ćelija nazvanih sinoviociti. Prema strukturnim razlikama uočenim elektronskom mikroskopijom, ove ćelije su podeljene na sinoviocite tipa A i B. Sinoviociti tipa A su makrofagama slične ćelije koje imaju fagocitnu ulogu, a sinoviociti tipa B su fibroblastima slične ćelije koje stvaraju HK od koje potiče viskoznost ST. Ove ćelije onemogućavaju da u ST prođu molekuli velike molekulske mase, kao što su proteini plazme. Subintimu SM čine kolagen tipa III, IV, V i VI, mala količina kolagena tipa I, laminin, fibronektin, hondroitin sulfat, nervna vlakna, kao i krvni i limfni sudovi. Na osnovu strukture subintime razlikuju se tri tipa sinovijalne membrane: aleoralni, adipozni i fibrozni tip.

Aleoralni tip sinovijalne membrane je najspecijalizovaniji tip SM koji ima nabore koji se mogu ispraviti kada dođe do njene distenzije. Sastoji se od 2-3 sloja ćelija ispod kojih se nalaze splet kapilara fenestriranog tipa, kao i pleksusi malih arteriola i venula, mastociti i nervna vlakna. Limfni sudovi su zastupljeni u svim tipovima SM, ali se retko mogu uočiti u SM fibroznog tipa (*Smith., 2011*). **Adipozni tip sinovijalne membrane** se nalazi oko masnih jastučića i u predelu prstolikih nabora. Intima ovog tipa membrane direktno naleže na masno tkivo, ali je najčešće odvojena slojem kolagenih vlakana dok je subintima pretežno sastavljena od adipocita. Na mestima formiranja nabora mogu se uočiti krvni sudovi, ali ona može biti i avaskularna. Količina masnog tkiva u naborima varira i verovatno opada sa starenjem na račun povećanja fibroznog tkiva (*Smith., 2011*). **Fibrozni tip sinovijalne membrane** je često teško

razlikovati od fibrozne hrskavice. Ovaj tip membrane se sastoji od fibroznog tkiva tetiva i ligamenata i čini je nekontinuirani sloj ćelija.

Promene povezane sa starenjem dešavaju se u svim strukturama zgloba, uključujući i SM. Najčešće opisivane strukturne promene koje se razvijaju kod ljudi na SM kao posledica starenja jesu: povećanje broja nabora i gubitak sinoviocita tipa B na račun povećanja sinoviocita tipa A (*Conn., 2006; Ghadially i Roy., 1966*). Ove promene mogu biti preduslov za razvoj različitih vidova OA jer se sa smanjenjem broja sinoviocita tipa B menjaju nutritivna i lubrikantna svojstva ST (*Conn., 2006*). Nažalost, do sada postoje vrlo oskudni opisi histološke građe sinovijalne membrane pasa a takođe nedostaju podaci ispitivanja o strukturnim promene koje se razvijaju tokom starenja.

4. ČELIJSKA TERAPIJA I TKIVNI INŽENJERING U TERAPIJI ARTROPATIJA

Artropatije predstavljaju oboljenja zglobova koja su veoma zastupljena u ukupnoj kliničkoj patologiji pasa. Pojam *arthritis* se odnosi na inflamatorne promene u zglobu, ali je takođe termin koji se koristi da bi se opisale degenerativne, neinflamatorne promene, što terminološki nije ispravno jer se sufiks – *itis* odnosi na inflamaciju.

Artroze predstavljaju neinflamatorne degenerativne promene koje zahvataju zglobnu hrskavicu. Ukoliko se proces sa hrskavice proširi na subhondralnu kost dolazi do razvoja **osteoartroze**, dok u slučaju razvoja inflamatornog procesa nastaje **degenerativni osteoartritis**. Pod **osteoartritisom** se u histopatološkom smislu podrazumeva progresivni gubitak zglobne hrskavice, koji je praćen prisustvom osteofita, zadebljanjem subhondralne kosti i formiranjem subhondralnih cisti.

Artroza može biti primarna (idiopatska) i ovaj oblik se razvija izuzetno retko. Sekundarna artroza je neuporedivo češća i ona nastaje kao posledica delovanja različitih predisponirajućih faktora. Uzrok artroze još nije poznat, ali su za njen nastanak odgovorni mehanički, genetski, metabolički i endokrini faktori, različiti faktori sredine, infekcija i tumori (*Ge i sar., 2006, Felson., 2010*). Rizik od nastanka artroze se povećava sa starenjem. Artrozom može biti zahvaćen bilo koji zglob, a najčešće su to koleno, lakat, kuk, kao i intervertebralni zglobovi vratnog i slabinskog dela kičmenog stuba. Artrozu karakteriše smanjenje debljine zglobne hrskavice i promene u ST u smislu povećanja njene količine i smanjenja viskoznosti. Sa napredovanjem procesa dolazi do skleroze subhondralne kosti i pojave osteofita, što rezultira razvojem inflamatornog procesa (*Mobasheri i sar., 2008*). Artrozu treba posmatrati kao izuzetno kompleksno patološko stanje koje se razvija na zglobu u celini, zahvatajući istovremeno zglobnu hrskavicu, sinovijalnu membranu i subhondralnu kost.

Zglobna hrskavica se kod degenerativnih OA smatra ključnim tkivom na kome se dešavaju promene, dok se kod inflamatornih OA, SM smatra glavnim mestom razvoja patoloških procesa (*Bennet i sar., 2002*). Degenerativna oboljenja zglobova predstavljaju najčešći tip OA kod ljudi i životinja.

Traumatska oštećenja akutnog i hroničnog toka predstavljaju najčešći uzrok artroza i OA. Češće se javljaju kod mladih i fizički aktivnih jedinki, a naročito kod jedinki izloženih jakim ili ponavljajućim opterećenjima, kao što su sportisti i službeni psi i konji. Histološkim pregledom traumatizacijom nastalih lezija uočeno je smanjenje

količine PG praćeno kidanjem mreže kolagenih vlakana koja se ne mođe odupreti njihovom bubrenju, pa dolazi do pojava naprslina na hrskavici usled hiper hidriranosti. Zbog nakupljanja velike kolićine vode hrskavica više nije u stanju da obezbedi optimalno raspoređivanje opterećenja. Traumatske povrede zgloba su obićno udružene sa mnogo složenijim oštećenjima koja pogađaju i druge anatomske strukture kao što su meniskus, subhondralna kost, ligamenti ili sinovijalna membrana (*rev. Ge i sar., 2006*). U slućaju dubljih oštećenja koja zahvataju subhondralnu kost, dolazi do krvarenja sa posledićnim formiranjem krvnog ugruška bogatog MĆ koje popunjavaju nastali defekt. Ovaj krvni ugrušk potom prolazi kroz etapu remodeliranja tokom koje krvni sudovi preplavljeni fibrinskom mrežom stimulišu fibroblaste na sintezu kolagenih vlakana. Od ovako formirane kolagenske mase formiraće se fibrozno hrskavićno ožiljno tkivo. Novoformirano tkivo ima PG/GAG, kolagen tipa II i druge komponente ECM drugaćije od hijaline hrskavice, a razlikuje se od nje i po biomehanićkim osobinama. Ono takođe, nije stabilno niti dovoljno ćvrstvo, pa se ćesto javljaju znaci oštećenja (fibrilacija, fisure, fragmentacija) koji vode ka degeneraciji i pojavi osteoartritićnih lezija praćenih upornim i jakim bolom (*rev. Ge i sar., 2006*).

Dijagnostićki postupak kod pacijenata sa OA zapoćinje opštīm klinićkim i ortopedskim pregledom. Međutim, za postavljanje diagnoze ovog oboljenja veliki znaćaj ima radiološka dijagnostika koja predstavlja zlatni standard. Promene koje nastaju u poćetku razvoja bolesti ne mogu se verifikovati konvencionalnom rendgenografijom, pa je potrebna primena više razlićitih i sofisticiranih dijagnostićkih metoda da bi se postavila dijagnoza. Artroskopskim pregledom mogu se uoćiti makroskopske promene unutar zgloba, a pregledom isećaka uzetih biopsijom zglobne hrskavice i SM, histološke promene. Zbog toga što hrskavica nije inervisana, oštećenja nije moguće otkriti u njihovom najranijem stadijumu, a odsustvo cirkulacije i limfne drenaže doprinosi vrlo ogranićenoj sposobnosti za spontano obnavljanje. Danas, oboljenja zglobne hrskavice predstavljaju vaćan problem u humanoj i veterinarskoj medicini. U tom kontekstu naućna zajednica traći naćine kako da se poboljša njena regeneracija. Mnoge hirurške tehnike razvijene su u cilju saniranja povreda zglobne hrskavice, a jedna od njih je abrazivna hondroplastika, kojom se podstiće njena reparacija. Uporedo sa razvojem ovog metoda vršeni su pokućaji transplantacije tkiva sa hondrogenim svojstvima kao što su pokosnica i perihondrijum, a razvijena je i tehnika osteohondralnog grafta koja podrazumeva kalemljenje hrskavice na samu koćtanu osnovu. Ogranićavajući faktori kao što su okoćtavanje, nestabilnost i smanjena funkcija

kalema, koji neminovno prate svaku od pomenutih hirurških tehnika, doveli su do razvoja tkivnog inženjerstva. Ono pruža alternativu dosadašnjim klasičnim hirurškim tehnikama koja se sastoji u udruživanju ćelija sa biomaterijalima i aktivnim biološkim materijama. Ova oblast se nalazi na raskršću terapije ćelijama, nauke o materijalima i inženjerskog procesa.

Nemački naučnik i hirurg Brittberg je pre gotovo petnaest godina, zajedno sa svojim saradnicima (*Brittberg i sar., 1994*) razvio principe inženjeringa zglobne hrskavice paralelno sa tehnikom transplatacije autologne hrskavice. On je iz uzoraka hrskavice uzetim metodom biopsije izolovao hondrocite koji su potom umnoženi *in vitro* i presađeni na mesto oštećenja. Ovom tehnikom je omogućeno obnavljanje tkiva koje je dovelo do poboljšanja kliničkih znakova bolesti kod obolelih jedinki, ali je novoformirano tkivo po svojoj strukturi odgovaralo fibroznoj a ne hijalinoj hrskavici. Pored toga, nedostaci pomenute tehnike ogledaju se u razvoju patoloških procesa na mestu uzorkovanja zglobne hrskavice, kao i činjenici da se na ovaj način mogu dobiti ograničene količine hondrocita. Takođe, umnožavanje hondrocita u jednom sloju dovodi do njihove diferencijacije prema fenotipu fibroblasta.

Potreba da se prevaziđu ove poteškoće usmerila je tkivni inženjering u dva pravca. Prvi se odnosi na iznalaženje alternativnih izvora ćelija sa hondrogenim potencijalom kako bi se izbeglo uzorkovanje hrskavice. Pojedini autori predložili su korišćenje nazalnih hondrocita (*rev. Ge i sar., 2006*). Iako se činilo logičnim da su nazalni hondrociti adekvatan izvor ćelija, zbog malog broja hondrocita koji se može izolovati onemogućeno je dobijanje adekvatne količine ćelija za takvu aplikaciju. Drugi pravac se odnosi na razvijanje biomaterijala i poboljšavanja njihove kompatibilnosti sa ćelijama. Cilj tkivnog inženjeringa je da se hondrociti uzgajani u trodimenzionalnim sistemima (kultura visećih kapi, ćelijske pelete) diferenciraju ka hondrogenezi i da se aplikuju zajedno sa biomaterijalima uz pomoć nisko invanzivnih hirurških tehnika, kako bi se omogućila regeneracija oštećene hrskavice.

Sagledavanjem rezultata dosadašnjih ispitivanja u oblasti regenerativne medicine hrskavice i pasa kao pacijenta, ali i modela za proučavanje OA ljudi, može se jasno uočiti da postoji velika potreba za preciznijim definisanjem spontanih promena na zglobnoj hrskavici pasa nastalih delovanjem različitih faktora kao što su starenje, fizička aktivnost i traumatska oštećenja. To bi moglo da omogući lakše razumevanje patofizioloških procesa OA i unapredi terapiju. Takođe je potrebno ispitati hondrogeni

potencijal ćelija poreklom iz sinovijalne tečnosti, kako bi se u terapiji OA koristile one kod kojih je ova osobina najviše izražena.

5. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Najveći problem savremene medicine predstavlja regeneracija hrskavice i promena vezanih za starenje koje se javljaju na koštano-zglobnom sistemu. Kako se promene ovog sistema tokom starenja sve češće javljaju i kod pasa i kod ljudi, a pas je model velike životinje sa koje je translacija rezultata na ljude poželjna, u ovom radu su postavljena dva cilja:

Prvi cilj je bio da se okarakterišu i uporede ćelije izolovane iz sinovijalne tečnosti mladih i starih pasa, odnosno da se utvrdi da li te ćelije, umnožene *in vitro*, imaju osobine MMĆ, potom da se *in vitro* ispita njihov fenotip i potencijal ka adipogenezi, osteogenezi i hondrogenezi, a da se posebno, *in vivo*, ispita njihov potencijal ka hondrogenezi.

Drugi cilj je bio da se okarakterišu i uporede zglobne strukture kolenog zgloba pasa različite starosti i različitog tipa fizičke aktivnosti i to sa kliničkog, radiološkog i histološkog aspekta kako bi se definisale promene vezane za starenje i utvrdilo prisustvo ili odsustvo inflamacije u zglobu.

Da bi se ostvarili opisani ciljevi postavljeni su **zadaci** da se:

1. Kod pasa u ovom ispitivanju izvrši opšti klinički, ortopedski i neurološki pregled;
2. Kod svih jedinki izvrši rendgenski pregled oba kolena zgloba, levog i desnog zgloba kuka i lumbosakralnog dela kičme metodom rendgenografije;
3. Od svih jedinki prikupi sinovijalna tečnost i izvrši njen pregled u cilju dijagnostike eventualnih subkliničkih inflamatornih promena;
4. Iz uzorkovane sinovijalne tečnosti izoluju i u kulturi umnože prisutne adherentne ćelije i metodom protočne citometrije odredi ekspresija površinskih markera na osnovu kojih se izolovane ćelije mogu svrstati u nehematopoetske ćelije mezenhimalnog porekla (CD90+, CD34-);
5. Odredi *in vitro* broj ćelija koje mogu da stvaraju kolonije fibroblasta i vreme za koje se mogu udvojiti u kulturi kao i da se ispita prisustvo SA- β -galaktozidaze, markera starenja;
6. *In vitro* ispita potencijal umnoženih ćelija da se diferencijuju ka adipocitima, osteoblastima i hondrocitima;
7. *In vivo*, na modelu ksenotransplantata imunodeficientnim miševima, ispita hondrogeni potencijal umnoženih ćelija;

8. Izvrši makroskopski pregled zglobnih struktura i histološka i imunohistohemijska analiza hrskavice i sinovijalne membrane

6. MATERIJAL I METODE

U ovom radu korišćene su ćelije sinovijalne tečnosti izolovane iz kolenog zgloba zdravih pasa različite starosti kao i zglobna hrskavica i sinovijalna membrana. Ćelije i tkiva su dobijeni od pasa koji su eutanazirani na zahtev vlasnika iz opravdanih medicinskih razloga koji nisu uključivali bolesti vezane za muskulo-skeletni sistem. Uzorkovanje materijala sa kadavera odobreno je od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (FVMUB), na kome su i vršena ispitivanja.

6.1. Životinje

Ispitivanja su obavljena na 28 pasa rase nemački ovčar, muškog pola. Telesna kondicija ispitivanih životinja ocenjena je prema Valtam skali centra za ishranu kućnih ljubimaca (*Waltham Centre for Pet Nutrition*) ocenom 3 (na skali od 1-5), dok su prema kinološkim kriterijumima za procenu eksterijera ispitivani psi dobili ocenu 4. Kriterijumi prema kojima su psi bili uključeni u ispitivanje bili su sledeći: istorija bolesti bez znakova hromosti, negativan radiološki nalaz kolenog zgloba, zgloba kuka i lumbosakralnog dela kičme na prisustvo osteoartritičnih promena, negativan nalaz ST na prisustvo markera inflamacije procenjen na osnovu fizičko-hemijskog ispitivanja i prisustva serum amiloida A (SAA nedetektabilan).

Uzorci sinovijalne tečnosti, sinovijalne membrane i hrskavice sa subhondralnom kosti uzeti su iz kolenog zgloba pasa koji su svrstani u 4 grupe prema uzrastu i fizičkoj aktivnosti.

Grupa 1 mladi radni, policijski psi ($n = 4$), uzrasta 3-5 godina (3.8 ± 0.9), telesne mase 30-35 kg (32.5 ± 2.9 kg).

Grupa 2: mladi, neradni vlasnički psi ($n = 5$) uzrasta 3-5 godina (3.8 ± 0.8), telesne mase 30-35 kg (32.3 ± 2.5 kg).

Grupa 3: stari, radni policijski psi ($n = 13$) uzrasta 10-12 godina (10.5 ± 0.7), telesne mase 30-50 kg (33.6 ± 1.8 kg).

Grupa 4: ($n = 6$): stari neradni, vlasnički psi uzrasta 10-13 godina (11 ± 1.5), telesne mase 30-35 kg (34 ± 1.9 kg).

Svi policijski radni psi bili su korišćeni kao operativni psi 5-10 godina. Tokom svog radnog veka imali su konstantan dnevni program vežbi u vidu 3 časa aktivnog

fizičkog rada koji je obuhvatao oko 3 km pešačenja, kasa i galopa, sa različitim tipovima skokova i preskakanjem prepona. Boravili su u policijskim odgajivačnicama i hranjeni su komercijalnom suvom granuliranom hranom. Vlasnički neradni psi su imali svakodnevne šetnje sa njihovim vlasnicima, bili su smešteni u kućama svojih vlasnika i hranjeni su komercijalnom hranom različitih proizvođača.

6.2. Opšti klinički, ortopedski i neurološki pregled pasa

Da bi se isključilo prisustvo kliničkih vidljivih promena na muskulo-skeletnom sistemu izvršen je opšti, ortopedski i neurološki pregled.

6.3. Radiološko ispitivanje

Radi isključivanja prisustva patoloških promena obavljen je rendgenski pregled oba kolena zglobova metodom rendgenografije. Snimanja su izvršena pomoću rendgenskog uređaja marke "Selenos" 4 EI Niš, pri fokus-film rastojanju od 80 cm. Rendgenografija kolenih zglobova je obavljena u rasterećenju, snimanja su izvršena u dve standardne projekcije: antero-posteriornoj (AP) i medio-lateralnoj (ML), a upotrebljene kondicije su iznosile 48 kV i 10-16 mAs. Da bi se isključilo istovremeno prisustvo displazije kukova i sindrom *cauda equina*, obavljeno je rendgensko snimanje karlice i lumbo-sakralnog dela kičme svih ispitivanih pasa u ventro-dorzalnoj (VD) i latero-lateralnoj (LL) projekciji pri čemu su kondicije za snimanje iznosile 50-55 kV i 16 mAs.

6.4. Uzorkovanje i analiza sinovijalne tečnosti

Pre artrotomije, ST je aseptično uzorkovana iz oba kolena zglobova metodom artrocenteze. Laboratorijski pregled uzetog uzorka obuhvatao je: analizu fizičkih karakteristika, određivanje koncentracije proteina i ukupnog broja ćelija, citološki pregled, određivanje koncentracije SAA i izolaciju mezenhimskih matičnih ćelija.

Fizički pregled ST je podrazumevao procenu: količine, boje, zamućenosti i viskoznosti, a ukupni i diferencijalni broj ćelija u ST određen je sa razmaza obojenih May Grunwald Giemsa metodom. Koncentracija proteina merena je refraktometrom.

Koncentracija SAA određena je imunoenzimskim testom, korišćenjem komercijalnog serum amiloid A ELISA test kita (Lot: 21KT061, Tridelta, Irska) prema uputstvu proizvođača. Uzorci ST razblaženi su u odnosu 1:10 i 1:50 u diluentnom puferu iz kita. Apsorbanca je čitana na 450nm (Absorbance microplate reader ELX800, Biotek).

6.5. Izolacija mezenhimskih matičnih ćelija iz sinovijalne tečnosti

Uzorak ST određen za kultivaciju *in vitro* je direktno iz šprica prenet u fosfatni pufer obogaćen antibioticima i antimikotikom (Antibiotic-Antimycotic solution, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA). U fosfatnom puferu (PBS, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) bio je zastupljen penicilin u koncentraciji od 100 U/ml, streptomycin u koncentraciji od 100 µg/ml i amfotericin B (AA rastvor) u koncentraciji od 0.25 µg/ml. Nakon postupka pranja (centrifugovanje uzorka na 1700 obrtaja/10 minuta), ukupan broj živih ćelija u uzorku ST određen je njihovim brojanjem u komorici (hemocitometru) nakon bojenja tripan plavim (0.4% Tripan blue stain, Gibco, Invitrogen) pri razređenju 1:10. Tripan plavo je boja koja prodire samo u ćelije kod kojih je oštećena ćelijska membrana (mrtve ćelije), dok žive ćelije ne apsorbuju boju. Brojanje je vršeno u poljima za brojanje leukocita, a ukupan broj ćelija određivan je na sledeći način:

$$\text{Br. ćelija} \times 10^6/\text{ml} = \frac{N}{4} \times R \times 10 \times 1000$$

N/4- broj izbrojanih ćelija u 4 kvadrata dimenzija 1 x 1mm², R-razblaženje, 10-dubina komorice. Množenje sa 1000 vrši se da bi se dobila vrednost izražena u na 10⁶ ćelija u mililitru.

Ćelije su zasejane u T-25 flaskove (BD Falcon primaria plastic[®], Biosciences) u DMEM (*Dulbecco Modified Eagles Medium* - Invitrogen) medijumu sa 10% FBS (MSC-Qualified FBS, Gibco), 1% L-glutamina i AA rastvorom (u nastavku teksta kompletan, kontrolni medijum). Ćelije su inkubirane na 37C⁰ u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO₂ i 95% vazduha (Binder CB53, Germany), a medijum je promenjen 24 sata posle zasejavanja da bi se uklonile neadherirarne ćelije. Nakon toga, medijum je menjan na svaka 2-3 dana. Ćelije su gajene u ovim uslovima 10-14 dana (nulta pasaža - P0) dok nisu postigle 80-90% konfluente, nakon čega su tripsinizovane (TrypLE™

Express 1X, Gibco). Čelije su zasejavane u gustini od 5000 ćelija/cm² u T-25 flaskovima i subkultivisane su do šeste pasaže (P6).

6.6. Vreme udvajanja broja ćelija u kulturi

Matične ćelije ST iz P3-P6 su zasejane u petri šolje (10cm²) (BD Biosciences, San Jose, CA 9513, USA) u gustini od 1x10⁴ ćelija/cm². Vreme udvajanja ćelija u kulturi (engl. *Population doubling time -PDT*) je određen na osnovu broja zasađenih ćelija i broja ćelija koje su dobijene po tripsinizaciji kultura, kada su ćelije dostigle konfluncu oko 80%. Broj živih ćelija određen je u hemocitometru, bojenjem ćelija sa tripan plavim. Čelije su zasejavane u triplikatu. PDT je dobijen primenom formule:

$$PDT = \frac{\ln(N_f / N_0) / \ln(2)}{t}$$

N_f - broj ćelija dobijen nakon tripsinizacije, N_0 - zasađen broj ćelija, t - dužina kultivacije ćelija u danima ili satima.

6.7. Određivanje CFU-F

Matične ćelije ST iz pasaže 1 (P1) su zasejane u petrijeve šolje (10cm²) u gustini od 500 i 1000 ćelija/cm² u kontrolnom medijumu. Medijum je menjan na svaka 2-3 dana. Nakon 7 dana kultivacije, ćelije su oprane u 1x PBS/AA, fiksirane metanolom tokom 10 minuta i obojene vodenim rastvorom *Giemsa* (1kap/1ml destilovane vode) u trajanju od 20 minuta. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi i sušenja, ćelijski agregati sa ≥ 50 ćelija su brojani kao kolonije pod invertnim mikroskopom (Olimpus CKX41/CKX31). Rezultati su izraženi kao procenat ćelija sposoban da formira kolonije u odnosu na broj zasađenim ćelija.

6.8. Određivanje fenotipa ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti

Imunofenotipizacija MĆ sinovijalne tečnosti iz treće do šeste pasaže (P3-P6) izvršena je protočnom citometrijom (engl. *flow cytometry*) za CD34 i CD90 marker korišćenjem sledećih antitela: mouse anti-human CD90 FITC (BD Pharmingen,

Biosciences, San Jose, CA, USA) i mouse anti-dog CD34 PE (BD Pharmingen, Biosciences, San Jose, CA, USA).

Nakon tripsinizacije adherentnih ćelija i pranja u hladnom rastvoru PBS/1%FCS 3 puta (1000rpm/4⁰C 5 minuta), ćelije su alikvotirane u koncentraciji od 1x10⁶ i inkubirane sa antitelima 45 minuta na 4⁰C. Ćelije su potom isprane u rastvorima PBS/1%FCS 1x (1000rpm/4⁰C 5 minuta) i PBS/1%FCS/5% Na-azid 1x (1000rpm/4⁰C 5 minuta), nakon čega su fiksirane u 1% paraformaldehidu i analizirane na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Germany). Rezultati su izraženi kao procenat pozitivnih ćelija u poređenju sa negativnim izotipskim kontrolama na histogramima.

6.9. Diferencijacija ćelija in vitro

Potencijal za diferencijaciju MMĆ izolovanih iz ST (P3) ispitan je kultivacijom ćelija u adipogenom, hondrogenom i osteogenom komercijalnom medijumu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA: Stem PRO Adipogenesis medium, Stem PRO Osteogenesis medijum i Stem PRO Hondrogenesis medijum). U svim navedenim medijumima prisutni su suplementi koji obezbeđuju stimulaciju diferencijacije, ali njihov sastav nije naznačen. Osim primene komercijalnog medijuma za hondrogenezu, ćelije su paralelno uzgajane u medijumu bez seruma sa dodatim suplementima za hondrogenezu: 1% L-glutamin, 6.25 ug/mL insulin, 6,25 ug/mL transferin, 6.25 ng/mL natrijum selenit (ITS), 50 nM natrijum L-askorbat, 10⁻⁸ M deksametazon i 10ng/mL TGF-β1 (u nastavku teksta hondrogeni medijum sa suplementima). Ćelije su uzgajane na 37C⁰ u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂ i 95% vazduha (Binder CB53, Germany).

6.9.1. Adipogena diferencijacija i Oil Red O bojenje

Za **adipogenu diferencijaciju** ćelije sinovijalne tečnosti su zasejane u triplikatu u gustini od 5x10³ ćelija/cm² u pločama sa 8 polja (BD Falcon Culture Slides) u kompletnom medijumu. Nakon 48 časova uzgajanja, kompletan medijum je zamenjen adipogenim i ćelije su paralelno uzgajane u adipogenom i kontrolnom medijumu tokom 14 dana. Medijum je menjan na svaka 2 dana. Adipogeni potencijal je pokazan bojenjem ćelija sa Oil Red O (Sigma-Aldrich) kojim se dokazuje prisustvo masnih kapi u ćelijama.

Oil Red O bojenje: Nakon 14 dana kultivacije u adipogenom i kontrolnom medijumu, ćelije su isprane u 1x PBS-u, fiksirane u 10% neutralnom formaldehidu (30 minuta), a zatim isprane destilovanom vodom dva puta. Nakon dodavanja 60% izopropanola (5 minuta), ćelije su bojene radnim rastvorom Oil Red O boje: 3% Oil red O u 60% izopropanolu (tri dela) i destilovanoj vodi (dva dela), 5 minuta. Nakon ispiranja tekućom vodom, ćelije su slikane invertnim mikroskopom (LEICA DMIL LED, Wetzlar, Germany). Kvantifikacija adipogene diferencijacije nije izvršena zbog vrlo slabe adipogene diferencijacije.

6.9.2. Osteogena diferencijacija

Nakon uzgajanja ćelija sinovijalne tečnosti tokom 48 časova u gustini od 1×10^4 ćelija/cm² u pločama sa 8 polja u kompletnom medijumu, ćelije su kultivisane u osteogenom i kontrolnom medijumu. Ćelije su zasejane u triplikatu, a medijum je menjan dva puta nedeljno tokom osteogene diferencijacije u trajanju od 21 dan. Pojedine kulture su prekidane 5. i 10. dana da bi se odredila sposobnost osteogene diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze (AP) kolorimetrijskom i IHH metodom.

6.9.2.1. Određivanje aktivnosti enzima alkalne fosfataze u ćelijskom lizatu

Aktivnost AP je neophodna za hidrolizu β -glicerofosfata čime *in vitro* započinje proces mineralizacije. Kolorimetrijskom metodom određena je njena aktivnost gde je p-nitrofenil-fosfat (pNPP), (Sigma-Aldrich) korišćen kao hromogeni substrat.

Nakon prekidanja osteogene diferencijacije 5. i 10. dana kultivacije, ćelije su tri puta isprane u 1x PBS-u i lizirane 1% igepalom, pH 7.5. Posle inkubiranja 12 časova na 4°C, ćelijski lizat je centrifugovan na 4°C 10 minuta na 10000 o/min. Supernatant je prenet u ploču sa 96 polja na koji je dodat pufer za lizu ćelija i pNPP u puferu za substrat (5 mM p-nitrofenil-fosfat u 50 mM glicinu, 1 mM MgCl₂, pH 10,5). Pod dejstvom AP, pNPP prelazi u p-nitrofenol, rastvorljiv žuto obojeni proizvod čiji je intenzitet boje proporcionalan aktivnosti enzima. Nakon inkubiranja na 37° C tokom 15 minuta reakcija je prekinuta 1M NaOH a optička gustina je čitana na 405 nm u Absorbance microplate reader ELX800, Biotek. Rezultati su izraženi kao nanomoli neorganskog fosfata po miligramu proteina po minutu (ng p-nitrofenola/mg proteina/minutu).

6.9.2.2. Imunocitohemijsko određivanje prisustva alkalne fosfataze

Da bi se utvrdila lokalizacija i rasprostranjenost aktivnosti alkalne fosfataze na nivou ćelija u kulturi, osim kolorimetrijske metode izvršeno je i citohemijsko bojenje korišćenjem kita za detekciju alkalne fosfataze Alkaline Phosphatase Detection Kit (Sigma-Aldrich Lot: SLBC4713) prema uputstvu proizvođača. Petog i desetog dana kultivacije u osteogenom i kontrolnom medijumu ćelije su fiksirane u 4% paraformaldehidu i obojene Naphthol/Fast Violet bojom iz kita. Pojava ljubičaste boje ukazivala je na prisutnu aktivnost enzima alkalne fosfataze.

6.9.2.3. Bojenje alizarin S crvenim

Da bi se pokazali depoziti kalcijuma formirani tokom osteogene diferencijacije nakon tri nedelje uzgajanja, ćelije su isprane u 1x PBS, fiksirane u 10% neutralnom formaldehidu (30 minuta), isprane destilovanom vodom dva puta i bojene 2% rastvorom alizarin crvenog (Alizarin Red S, pH 4,2, Sigma Aldrich) tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon intenzivnog ispiranja u destilovanoj vodi, da bi se uklonila

nespecifična bojenja, prisustvo crvene boje u ECM ukazivalo je na deponovane soli kalcijuma. Nakon 3 nedelje uzgajanja u kontrolnom i osteogenom medijumu, imunocitohemijski je određena ekspresija markera **osteokalcina** korišćenjem anti-osteokalcin antitela (Santa Cruz Biotech).

6.9.3. Hondrogena diferencijacija

Za *in vitro* **hondrogeneru diferencijaciju**, ćelije sinovijalne tečnosti zasejavane su u triplikatu i nakon uzgajanja u kompletnom medijumu u trajanju od 48 časova, kultivisane su u polipropilenskim epruvetama u hondrogenom i kontrolnom medijumu na dva načina: u klasičnoj adherentnoj kuluri (2D - dve dimenzije) i u takozvanoj peleti koja imitira tkivo sa tri dimenzije (3D - tri dimenzije).

6.9.3.1. Uzgajanje ćelija u trodimenzionalnim (3D) uslovima

U polipropilenske epruvete zapremine 15mL, ispunjene sa po 1mL kontrolnog medijuma, preneto je 5×10^5 ćelija/cm². Ćelije su centrifugovane na 1500 o/minuti tokom 5 minuta da bi se dobio ćelijski talog koji se posle 24 sata inkubacije, aktivnom međusobnom adhezijom ćelija pretvorio u takozvane pelete. Tako formirane strukture uzgajane su u kontrolnom medijumu i hondrogenom medijumu. Medijum je menjan tri puta nedeljno. *In vitro* hondrogeni potencijal ispitan je na osnovu sposobnosti ćelija da stvaraju sulfatisane glikozaminoglikane (sGAG) bojenjem sa alcijan plavim i IHH bojenjem na prisustvo kolagena tipa II. *In situ* hibridizacijom (ISH) je ispitana ekspresija kolagena tipa I.

6.9.3.2. Histološka i imunohistohemijska analiza peleta

Nakon fiksacije u 10% neutralnom formalinu 24 časa, pelete su dehidrirane kroz 50%, 70%, 96% etanol i izopropanol, ksilol i uklapane u parafin sa tačkom topljenja od 42⁰C. Parafinski isecci debljine 5µm su deparafinisani u ksilolu, rehidrirani kroz serije alkohola i isprani u destilovanoj vodi. Tkivni isecci bojeni su alcijan plavim da bi se dokazalo prisustvo sGAG. Imunohistohemijski, određeno je prisustvo kolagena tipa II, prema prethodno opisanom protokolu o IHH bojenju.

6.9.3.3. Uzgajanje ćelija u adherentnoj kulturi u dvodimenzionalnim uslovima (2D)

U T75 flaskove je zasejano 1×10^4 ćelija/cm² u hondrogenom medijumu i hondrogenom medijumu sa suplementima. Tokom 14 dana kultivacije u komercijalnom hondrogenom medijumu, medijum je menjan na svaka 2-3 dana, nakon čega su ćelije lizirane da bi se odredila koncentracija proteina i količina sGAG i DNK.

Da bi se dokazao *in vivo* hondrogeni potencijal, MĆ sinovijalne tečnosti su uzgajane 21 dan u hondrogenom medijumu sa suplementima. Medijum je menjan svaki drugi dan. Nakon 3 nedelje uzgajanja, ćelije su tripsinizovane, a s obzirom na to da su tokom tronedeljne kultivacije spontano u monosloju formirale jake međućelijske veze, tretirane su i kolagenazom (Gibco) u koncentraciji od 0.25mg/mL u 1x PBS 10 minuta na 37⁰C da bi se efikasno napravila jednoćelijska suspenzija. Aktivnost kolagenaze prekinuta je dodavanjem jednake količine kontrolnog medijuma. Ćelije su potom centrifugovane na 1500 o/minuti 5 minuta. 5×10^5 ćelija je sjedinjeno sa 250 µL viskoznog biomaterijala, celuloznim hidrogelom - Si-HPMC (engl. *silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel*), radi subkutane implantacije golim, atimusnim miševima (*Swiss nude mice, Charles River, L'Arbresle, France*).

6.9.4. In vivo hondrogeni potencijal

Da bi se ispitalo da li MĆ ST kombinovane sa Si-HPMC hidrogelom mogu formirati hrskavično tkivo *in vivo*, subkutana implantacija je izvedena kod 24 ženki miševa starosti 6 nedelja. Ispitana su tri različita uslova i za svaki uslov je izvedena implantacija kod 6 miševa. Miševima je aplikovan 1) sam hidrogel; 2) hidrogel sa MĆ ST gajenim u kontrolnom medijumu 3) hidrogel sa ćelijama gajenim u hondrogenom medijumu. Životinje su bile smeštene u štalici za eksperimentalne životinje Katedre za histologiju i embriologiju FVMUB, u skladu sa zakonom o dobrobiti životinja i evropskim propisima za obavljanje eksperimenata nad životinjama i uz dozvolu Etičkog komiteta FVMUB.

6.9.5. Određivanje koncentracije sGAG

Koncentracija glikozaminoglikana određena je kvantitativnom kolorimetrijskom metodom za analizu sulfatisanih proteoglikana i glikozaminoglikana korišćenjem Blyscan kita (Biocolor, UK, B1000) prema uputstvu proizvođača.

Nakon odstranjivanja medijuma i ispiranja ćelija u 1xPBS, izvršena je tročasovna digestija papainom na 65⁰C. Digestirani uzorak (100 µl) je inkubiran pola sata sa 1.9-dimetil-metilen plavom bojom i nakon centrifugiranja na 15000 o/min 10 minuta, uzorci su preneti u ploču sa 96 polja i resuspendovani u reagensu za disocijaciju. Apsorbanca je čitana na 650 nm u Absorbance microplate reader ELX800, Biotek. Rezultati su izraženi kao µg GAG/ µg DNK.

6.9.6. Kvantifikacija DNK

Nakon određivanja koncentracije sGAG, ukupna DNK u peletama je kvantifikovana fluorimetrijskim testom (FluoReporter[®] Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit, Invitrogen, Molecular Probes).

Po tripsinizaciji, 1x10⁶ ćelija je resuspendovano u kontrolnom medijumu i napravljena je serija razblaženja od 1000 do 100 000 ćelija u zapremini od 100 µL. Ćelije su potom digestirane papainom, nakon čega je dodato 100 µL rastvora DNK-specifične bisbenzimidazol boje, Hoechst 33258, u TNE (10 mM Tris, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) puferu (finalna koncentracija Hoechst 33258 0.35 µg/mL). Fluorimetrijsko merenje DNK standarda i uzoraka urađeno je u triplikatu. Standardi i uzorci su ekscitirani na 355 nm na spektrofluorimetru (1420-040 VICTOR3V multilabel counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Singapore), dok je emisija merena na 460 nm. Na osnovu standardne krive izračunata je DNK koncentracija izražena kao µg DNK/ml papainske suspenzije.

6.9.7. Koncentracija proteina u ćelijskom lizatu

Koncentracija proteina u citosolnoj frakciji liziranih ćelija određena je upotrebom komercijalnog kolorimetrijskog BCA testa (SERVA BCA Protein Assay Macro Kit, Heidelberg, Germany, 39228). Proba se zasniva na sposobnosti proteina da uz prisustvo BCA (engl. *Bicinchoinic Acid*) redukuje dvovalentne jone bakra stvarajući

proizvod ljubičaste boje (*Smith i sar., 1985*). U ploči sa 96 polja pomešano je 200 μ l radnog rastvora BCA reagensa sa 10 μ l ćelijskog lizata. Nakon 30 sekundi intenzivnog mešanja, rastvor je inkubiran 30 minuta na 37°C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, optička gustina je čitana na 540 nm (Absorbance microplate reader ELX800, Biotek). Koncentracija proteina je određena na osnovu standardne krive za goveđi serum albumin (BSA). Senzitivnost ovog testa omogućuje detekciju proteina u opsegu koncentracija od 25-1000 μ g proteina/mL.

6.10. Ispitivanje prisustva β -galaktozidaze

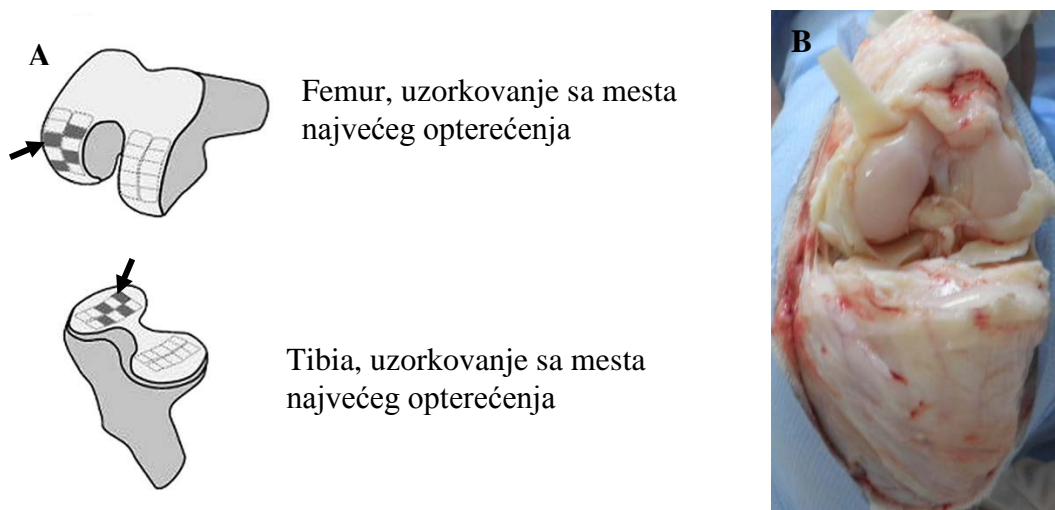
Prisustvo β -galaktozidaze (engl. *Senescence-associated β -galactosidase - SA- β -Gal*) koja se nalazi u ćelijama koje ispoljavaju znake starenja (prestanak deoba, gubitak mogućnosti za diferencijaciju) određeno je citohemijski korišćenjem komercijalnog kita *Senescence Cells Histochemical Staining kit* (Sigma-Aldrich) prema uputstvu proizvođača.

Ukupno 4.3×10^3 ćelija/cm² je zasejano u BD Falcon Culture Slides sa osam polja površine 0.7cm² (ukupno 3000 ćelija/polju). Nakon 72h kultivacije u kontrolnom medijumu, ćelije su isprane u 1x PBS, fiksirane komercijalnim fiksativom 5 minuta na sobnoj temperaturi i inkubirane na 37°C preko noći u rastvoru za bojenje pH 6.0 koji sadrži X-Gal (5-brom-4-hlor-3-indolil P3-D-galaktozid). Tokom inkubacije ćelija β -galaktozidaza razlaže dodati supstrat X-gal u nerastvorljivi plavo-zeleni precipitat koji se uočava u citoplazmi ćelija. Nakon inkubacije i ispiranja u 1x PBS ćelije su kontrastirane bojom Neutral Red (Merck). Procenat obojenih ćelija je određen semikvantitativno prema nivou aktivnosti β -galaktozidaze u citoplazmi kao slabo (+), umereno (++) ili visoko pozitivne (+++) na 100 izbrojanih ćelija.

6.11. Makroskopski pregled zglobnih struktura i način uzorkovanja hrskavice i sinovijalne membrane

Neposredno po artrotomiji izvršen je makroskopski pregled hrskavice, SM, meniskusa, ligamenata i tetiva na oba kolena zgloba. Prisustvo makroskopskih promena ocenjivano je na osnovu Outerbridge makroskopskog sistema ocenjivanja (*Outerbridge, 1961*) na sledeći način: glatka površina bez prisustva lezija (ocena 0), blaga udubljenja na površini hrskavice (ocena 1), fibrilacija površine hrskavice sa fokalnim lezijama

(ocena 2), duboke lezije sa okolnim oštećenjem (ocena 3) i prisustvo lezija koje zahvataju veliku površinu hrskavice (ocena 4). Uzorci hrskavice sa subhondralnom kosti uzeti su biopserom dimenzije 3 mm sa mesta najvećeg opterećenja na lateralnom kondilusu femura i tibije oba kolena zgloba (šema 6). Uzorci SM aleoralnog, adipoznog i fibroznog tipa uzeti su sa oba kolena zgloba.



Šema 6. A. Način uzorkovanja hrskavice sa subhondralnom kosti femura i tibije. Šema preuzeta iz Cook JL, Kuroki K, Visco D, Pelletier JP, Schulz L, Lafeber FP. *The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. Osteoarthritis and Cartilage, 2010; 18: S66-S79.* **B.** Makroskopski izgled struktura zgloba nakon otvaranja zglobne kapsule i presecanja pripadajućih ligamenata i tetiva.

6.12. Histološka analiza hrskavice i sinovijalne membrane

Nakon fiksacije u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48 do 72 časa i dekalifikacije u 10% EDTA tokom 3-4 nedelje, tkiva su dehidrirana kroz serije etanola (50%, 70%, 96% i 100%) i ksilol i uklapani u parafin. Isečci debljine 5 μ m bojeni su za histološku analizu hematoksilin eozinom, šafranin O fast zelenim (0.1% rastvor šafranina i 0.001% rastvor fast zelenog) i 1% vodenim rastvorom toluidin plavog. Kolagena vlakna bojena su Trihromnim bojenjem po Masonu.

Ukupna debljina hrskavice (debljina površinske, srednje, duboke i kalcifikovane zone), ukupan broj ćelija na vertikalnom preseku (na širini od 1000 μ m), broj ćelija na mm² (gustina ćelija) i površina hondrocita (μ m²) u zonama hrskavice određena je histomorfometrijskom analizom u Image J programu (*National Institutes of Health, USA*).

Na tkivnim isečcima hrskavice, svetlosnom mikroskopijom analizirani su sledeći parametri: 1. izgled površine hrskavice koja je opisivana kao: a) glatka, b) sa udubljenjima c) sa pukotinama; 2. oblik hondrocita koji je definisan kao: a) spljošten (duža osa ćelija je paralelna sa površinom), b) kružan, c) elipsoidan (duža osa ćelija je uspravna u odnosu na površinu); 3. morfologija izogenih grupa koja je podrazumevala

a) broj ćelija koje formiraju izogene grupe, b) distribuciju ćelija unutar izogenih grupa koja može biti kolumnarna (ćelije raspoređene u kolonama uppravno na površinu) ili kružna (ćelija raspoređene u krugu); 4. zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice je opisivana kao: a) netaknuta bez prekida kontinuiteta b) sa duplikacijama; 5. subhondralna kost je opisivana na sledeći način: a) bez promena, b) prisustvo skleroze, c) pojava pseudocisti ili d) pojava fibroze kostne srži; 6. zastupljenost PG/GAG u zonama hrskavice. Prisustvo jedne morfološke karakteristike nije isključivalo prisustvo drugih iz iste kategorije. Na primer, u jednoj zoni hrskavice mogle su se uočiti pojedinačne ćelije i u isto vreme izogene grupe od 2-4 ćelije. Takođe, ćelije u izogenim grupama mogle su biti raspoređene u koloni i kružnim klasterima. Svaki tkivni isečak je bio pregledan od strane tri nezavisna ispitivača i izračunata je srednja vrednost između numeričkih varijabli. Prisustvo ili odsustvo različitih morfoloških parametara je procenjen od strane sva tri ispitivača i istovetan rezultat dobijen u dva od tri pregleda korišćen je kao istinit.

Svetlosnom mikroskopijom su takođe analizirane promene na SM. Procenjivan je broj slojeva ćelija, prisustvo kratkih i prstolikih nabora i ćelijske infiltracije u njenoj subintimi.

Promene na zgloboj hrskavici i SM su takođe opisivane i na osnovu sistema za procenu histopatoloških promena kod pasa preporučenog od strane internacionalnog društva za proučavanje osteoartritisa, *OARSI*, (*Cook i sar., 2010*). Na osnovu ovog sistema procenjuje se prisustvo ili odsustvo osteoartritičnih promena na površini hrskavice (udubljenja, fibrilacije, fisure koje zahvataju površinsku, srednju ili duboku zonu hrskavice i potpun gubitak debljine hrskavice). Na hondrocitima (klasterizacija, gubitak ćelija), zoni koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane zone (gubitak, duplikacija), subhondralnoj kosti (gubitak debljine, pseudociste, fibroza kostne srži), PG/GAG i kolagenima (gubitak u pojedinim zonama hrskavice ili u celoj nekalcifikovanoj hrskavici).

6.13. Imunohistohemijska analiza hrskavice i sinovijalne membrane

Uzorci hrskavičnog tkiva, bojeni su imunohistohemijski na prisustvo kolagena tipa I, II i X, a na uzorcima SM određivana je ekspresija molekula CD44.

Za IHH analizu korišćena su sledeća antitela: mouse anti-collagen type I monoclonal antibody (Abcam, ab292), anti-collagen type II monoclonal antibody (MP Biomedicals: IC631711), monoclonal anti-collagen type X antibody (Sigma: C7974) i CD44 (Abcam, ab41478) sa Dako vizuelizacionim sistemom (Dako LSAB + System-HRP, K0679).

Nakon deparafinizacije tkivnih isečaka u ksilolu i hidracije kroz 100% i 96% etanol i destilovanu vodu, demaskiranje antigena je izvršeno proteinazom K 20 μ g/ml (Sigma: 39450-01-6) za kolagen tipa I i II, hialuronidazom (Sigma: 37326-33-3) za kolagen tipa X i tripsinom (Abcam, ab970) za CD44 molekul, tokom 30 minuta na 37⁰C. Nakon ispiranja u 1x PBS, peroksidaza je inaktivirana tokom 15 do 20 minuta dodavanjem 3% H₂O₂. Nakon ovoga reakcija je blokirana dodavanjem 10% goveđeg seruma u trajanju od 30 minuta za kolagen tipa II i X i 1.5 čas za kolagen tipa I i CD44. Primarna antitela za kolagen tipa I (razređenje 1:250), II i X (rezređenje 1:100) i CD44 (razređenje 1:150) ostavljena su preko noći na temperaturi od 4⁰C. Nakon ispiranja u 1x PBS, inkubiranja sa sekundarnim antitelima i tretiranja sa HRP streptavidin kompleksom obojena reakcija je dobijena upotrebom DAB-a (3,3-diaminobenzidine). Kao pozitivna kontrola za kolagen tipa X korišćena je ploča rasta mišijih embriona, kao negativna kontrola za kolagen tipa II kost psa, dok je za kolagen tipa I korišćena hrskavica psa.

6.14. In situ hibridizacija

U cilju određivanja precizne lokalizacije gena za sintetizu kolagena tipa I u parafinskim isečcima hondrogenih peleta, primenjena je molekularna metoda *in situ* hibridizacija (ISH). Na isečcima debljine 5 μ m sprovedena je sintetisana riboprobe (RNK proba) označena digoksigeninom (DIG) za kolagen tipa I. Prilikom izvođenja tehnike ISH za pozitivnu kontrolu, korišćeno je koštano tkivo mišijih embriona za kolagen tip I.

6.14.1. Postupak sinteze RNK proba

Iz mišijeg embriona izvršena je ekstrakcija i purifikacija ukupne RNK (*AffinityScript QPCR cDNA synthesis kit*; Ref: 600559; Agilent®), nakon čega je primenom RT-PCR (reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze), RNK lanac obrnuto transkriptovan u svoj komplementarni DNK lanac (cDNK). Stvorena cDNK je umnožena PCR-om (TaqDNA Polymerase; Invitrogen). Nakon purifikacije, RNK proba je dobijena *in vitro* transkripcijom uz pomoć DIG-11-UTP vezanih nukleotida iz cDNK lanca pomoću RNK polimeraza T3 i T7 (DIG RNA Labeling Mix; Ref: 11 277 073 910, Roche). Prilikom sinteze RNK proba dodat je digoksigenin (DIG) sa označenim nukleotidom dUTP radi vizuelizacije mesta eksprimiranja traženih gena.

6.14.2. Tehnika izvođenja ISH

Nakon deparafinizacije isečaka u ksilolu, hidracije kroz 100%, 80% i 70% etanol i PBS, postupkom permeabilizacije sa proteinazom K odstranjene su peptidne veze stvorene fiksacijom tkiva u formalinu. Nakon postfiksacije u 4% paraformaldehidu i acetilacije sa anhidridom sirćetne kiseline, izvršena je prehibridizacija isečaka sa hibridizacionim puferom koji ne sadrži RNK probu. Hibridizacija sa sintetisanim RNK probama vršena je preko noći na 60°C u vlažnoj sredini. Nakon inkubacionog perioda i ostranjivanja nevezanih molekula i slabo vezanih sekvenci u 1x PBS, reakcija je blokirana 10% BSA u 1% blokirajućem puferu u PBS-*Tween*-u. Da bi vizuelizovali DIG-om označene oligonukleotide, dodato je anti-DIG antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom u blokirajućem puferu a reakcija se odvijala preko noći na 4°C. Nakon inkubacije dodat je supstrat za alkalnu fosfatazu, NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium/1,5-bromo-4 hlora-3-fosfat-indolil) koji je formirao tamno plavi do braon u vodi nerastvorljiv talog na mestima gde postoji aktivnost AP nakon inkubiranja na 37°C.

6.15. Statistička analiza

Da bi se uporedila srednja vrednost numeričkih varijacija između poređenih grupa, korišćena je One-way ANOVA sa Tukey post hoc testom. Rezultati površine hondrocita su grupisani prema uzrastu životinja (mladi psi naspram starih pasa), a da bi

se uporedila srednja vrednost površine hondrocita između grupa korišćen je Studentov t test. *Chi-square* test sa *Fisher`s exact post hoc* testom su korišćeni da bi se poredile kategoričke varijable pri čemu je $P < 0.05$ je smatrana značajnom u svim poređenjima. Statističke analize su izvedene korišćenjem statističkog paketa R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria version 2.2.1. Rezultati deskriptivne statistike su prikazani grafički u vidu takozvanih *box-and-whiskers plots*. Kategorički podaci su predstavljeni kao broj pozitivnih nalaza u odnosu na ukupan broj izraženo u procentima. Rezultati deskriptivne statistike su takođe prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($M \pm SD$) i dati su u vidu priloga u ovoj disertaciji.

7. REZULTATI

7.1. Opšti klinički, ortopedski i neurološki pregled

Na osnovu opšteg kliničkog, ortopedskog i neurološkog pregleda zaključeno je da psi nisu ispoljavali kliničke znake vezane za oboljenja muskulo-skeletnog sistema.

7.2. Radiološko ispitivanje

Radiološkim ispitivanjem zgloba kolena, kuka i lumbosakralnog dela kičme mladih i starih pasa nije uočeno prisustvo radiološki vidljivih promena na koštano-zglobnim strukturama koje odgovaraju OA promenama (slika 1).



Slika 1. Nativni rendgenogram kolenog zgloba psa. **A.** Latero-lateralna projekcija (LL). **B.** Antero-posteriorna projekcija (AP). Ne uočava se prisustvo patoloških promena na koštano zglobnim strukturama.

7.3. Analiza sinovijalne tečnosti

Kod svih ispitivanih pasa, ST je bila bledo žute boje, bistra i viskozna. Koncentracija proteina i ukupan broj ćelija je bio u okviru referentnih vrednosti za pse (tabela 1). Ni kod jedne ispitivane grupe nije detektovano povećanje koncentracije SAA. Količina ST je bila povećana kod radnih pasa u odnosu na neradne pse (tabela 2).

Tabela 2. Analiza pregleda sinovijalne tečnosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i kao minimalne i maksimalne vrednosti (min - max).

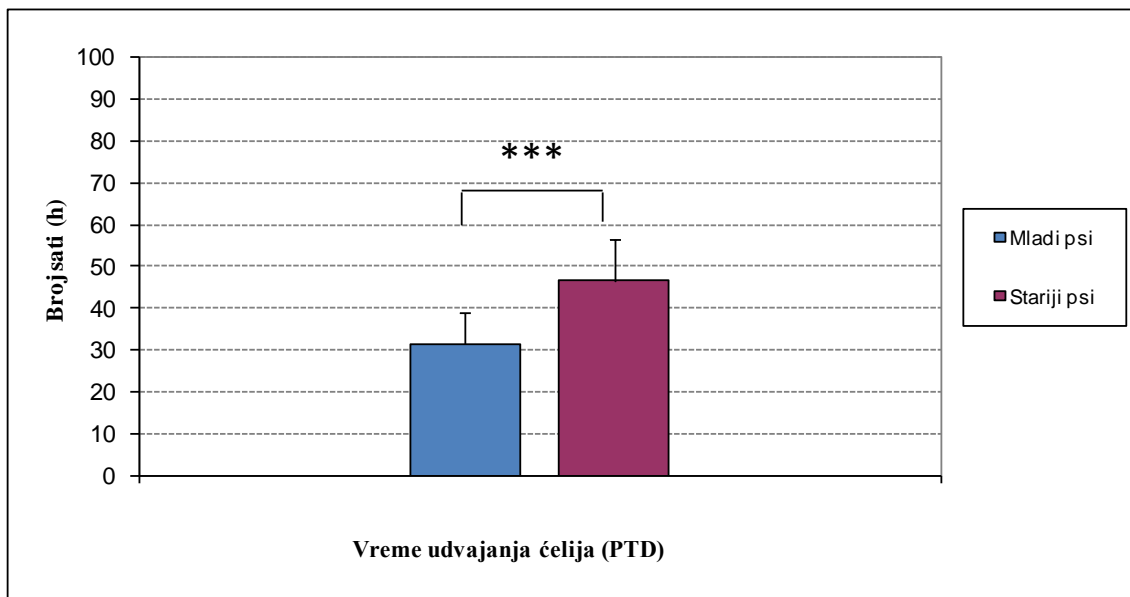
Grupa	G1	G2	G3	G4	ANOVA
Količina sinovijalne tečnosti (mL)	1.40 \pm 0.32 ^{b†,c*,d‡} (1.0 - 2.0)	0.59 \pm 0.15 ^{a†,c‡} (0.4 - 0.9)	1.89 \pm 0.59 ^{a*,b†,d‡} (1.0 - 4.0)	0.51 \pm 0.33 ^{b†,d‡} (0.2 - 1.1)	<0.001
Koncentracija proteina (g/L)	21.00 \pm 9.66 (10 - 30)	21.10 \pm 12.43 (5 - 35)	16.12 \pm 8.30 (5 - 30)	15.00 \pm 8.50 (10 - 30)	0.264
Ukupan broj ćelija ($\mu\text{L} \times 10^{-1}$)	2500.00 \pm 514.2 (1400 - 3000)	2530.00 \pm 496.77 (1700 - 3000)	2246.15 \pm 590.59 (880 - 3000)	2160.00 \pm 577.73 (1500 - 3000)	0.308

Napomena: a - vs grupa 1; b - vs grupa 2; c - vs grupa 3; d - vs grupa 4; * $-P < 0.05$; † $-P < 0.01$; ‡ $-P < 0.001$.

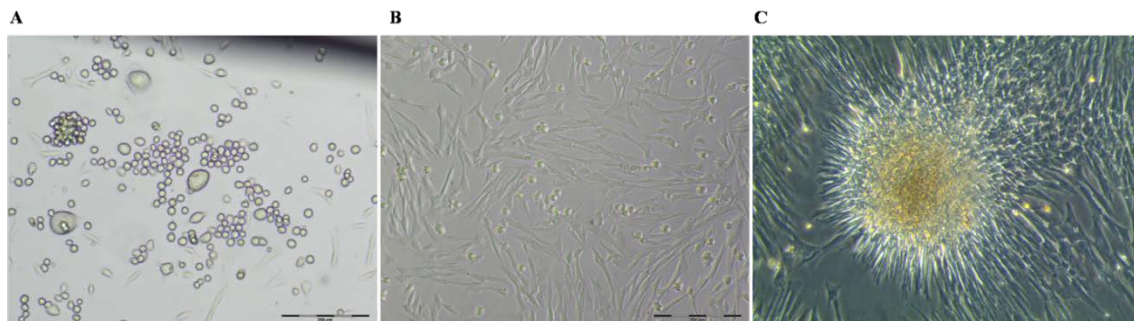
7.4. Proliferacija ćelija

Prvi cilj ovog ispitivanja je bio da se okarakteriše sposobnost ćelija izolovanih iz ST pasa da proliferišu tokom kultivacije. Nakon zasejavanja početne populacije ćelija iz ST, za 24h sve adherentne ćelije su se zalepile (slika 2A) i za 10 do 14 dana su dostigle konfluencu od 80% (slika 2B). To vreme je označeno kao nulta pasaža (P0). Sposobnost MĆ ST da se umnožavaju u kulturi, kao i broj ćelija sposobnih da formiraju kolonije, procenjena je na pasažama od P1 do P3 (slika 2C). Vreme kultivacije nakon prve tripsinizacije označeno je kao pasaža 1 (P1). Svaka naredna kultivacija i tripsinizacija označenene su kao P2, P3 itd. Utvrđeno je da MĆ sinovijalne tečnosti imaju fibroblastoidnu morfologiju (slika 2B) i da su bile u stanju da se umnožavaju sa prosečnim vremenom dupliranja (PDT) od 31.29 \pm 9.69 sati kod mladih pasa i 46.48 \pm 7.76 sati kod starih pasa. Pokazano je da se sa starenjem produžava vreme dupliranja ćelija u kulturi (grafikon 1. $P < 0.001$). CFU-F test je pokazao sposobnost da 0.49 \pm

0.17% ćelija mogu da formiraju kolonije. Nije uočeno da mladi psi (0.55 ± 0.05 %) imaju značajno različit broj CFU-F u odnosu na stare pse (0.43 ± 0.23 %).



Grafikon 1. Vreme udvajanja ćelija u kulturi (PTD). Sa starenjem se uočava produžavanje vremena dupliranja ćelija u kulturi. *** $P < 0.001$.

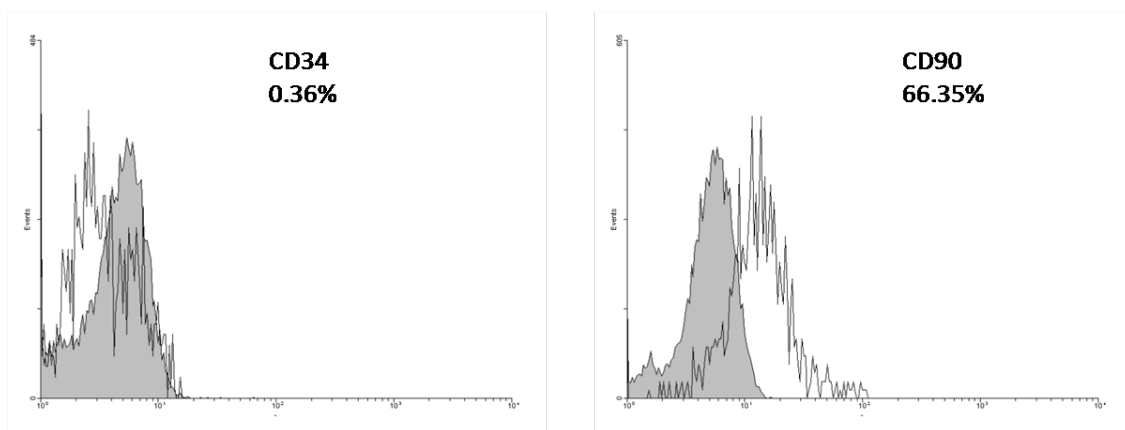


Slika 2. **A.** Reprezentativni prikaz adherentnih ćelija nakon 24 časa od zasejavanja početne populacije. Nediferentovane, adherentne ćelije su kružnog izgleda i počinju da menjaju svoj oblik ka fibroblastnim ćelijama. Invertni mikroskop. Bar $200\mu\text{m}$. **B.** Izgled početne ćelijske populacije nakon 10 dana kultivacije. Konfluenta ćelija fibroblastnog oblika iznosi oko 80%. Invertni mikroskop. Bar $200\mu\text{m}$. **C.** Formiranje kolonija sastavljenih od fibroblasta, odnosno ćelija koje liče na fibroblaste (Colony forming unit – fibroblast) iz P1. 3. dan kultivacije. Invertni mikroskop. Bar $200\mu\text{m}$.

7.5. Ekspresija površinskih markera

U literaturi je opisano da MMC eksprimiraju antigene karakteristične za ćelije mezenhinskog porekla, a da ne eksprimiraju markere hematopoetske loze ćelija (CD34). Zbog toga je fenotip adultnih MĆ izolovanih iz ST ispitan od P3-P6 metodom protočne citometrije za ekspresiju markera CD90 i CD34.

MĆ sinovijalne tečnosti nisu eksprimirale markere hematopoeze - CD34 negativne (slika 3A) ali su bile CD90 pozitivne (slika 3B). Kod starih pasa fenotipizacija nije urađena jer je broj ćelija u kulturi bio previše nizak za ovaj tip analize.



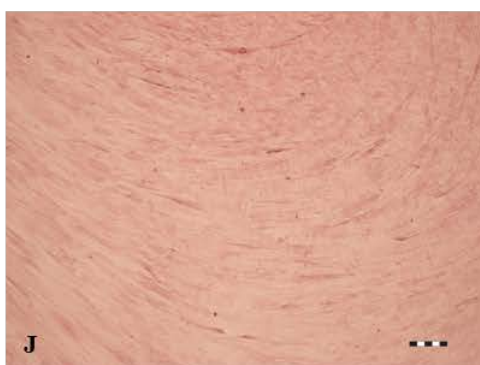
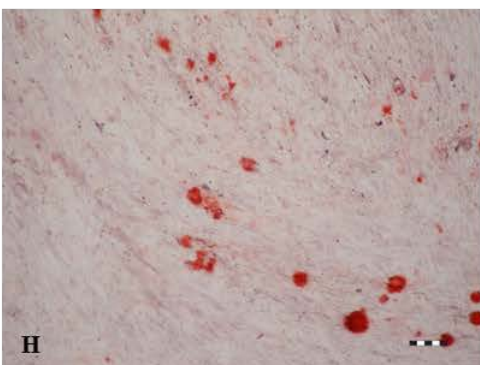
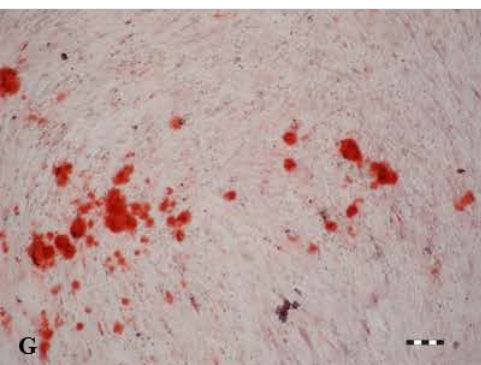
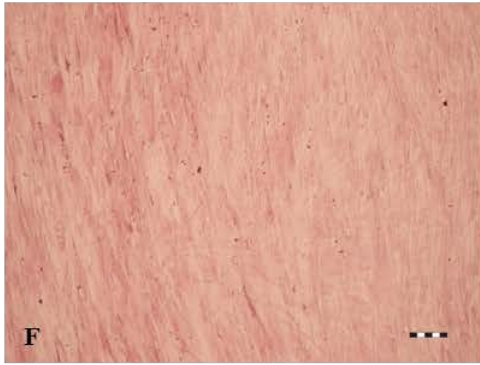
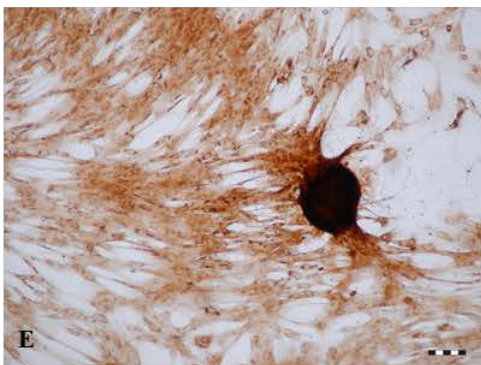
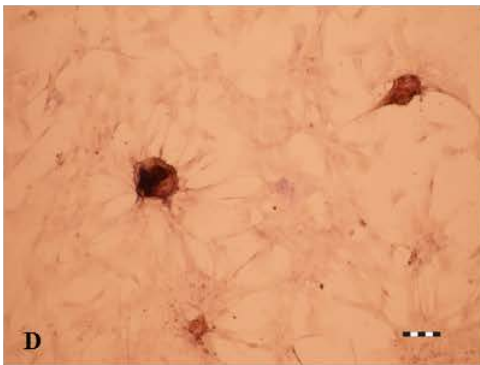
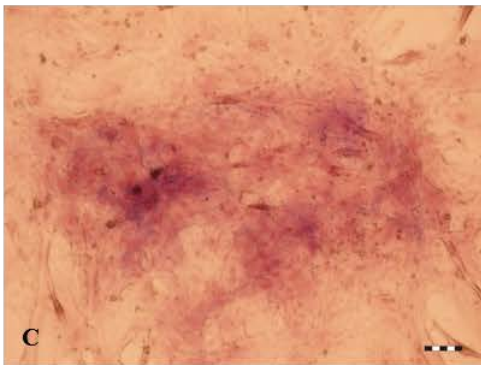
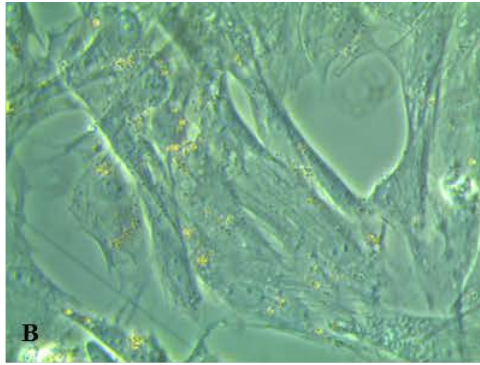
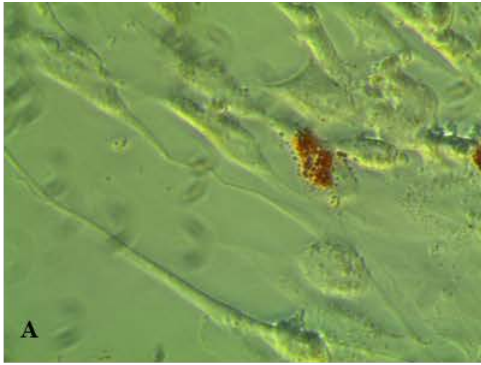
Slika 3. Imunofenotipski profil ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti. Reprezentativni prikaz histograma sa ekspresijom ćelijskih markera CD34 (A) i CD 90 (B) u odnosu na izotipske kontrole (zasenčene sivim).

7.6. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija

Druga značajna karakteristika adultnih MMC je njihova sposobnost da se diferenciraju u pravcu više različitih ćelijskih linija. Adipogeneza, osteogeneza i hondrogenaza su tri najčešće opisane puta diferencijacije MMC. Da bi se ispitaio njihov potencijal za adipogenezu, osteogenezu i hondrogenezu, ćelije su gajene paralelno u kontrolnom medijumu i medijumima za diferencijaciju.

7.6.1. Adipogena diferencijacija

Nakon 14 dana kultivacije, MČ sinovijalne tečnosti gajene u kontrolnom medijumu nisu formirale krupne lipidne kapi u svojoj citoplazmi (slika 4B), već su kod njih bile uočljive samo sitne lipidne kapi koje se fiziološki nalaze u citoplazmi ćelija. Tokom uzgajanja u adipogenom medijumu, kod pojedinačnih retko raspoređenih ćelija, nakon bojenja sa Oil Red O, uočeno je prisustvo krupnih masnih kapljica koje su se bojile crveno (slika 4A). Potencijal ka adipogenezi nije opadao tokom posmatranih pasaža niti je uočena razlika u adipogenom potencijalu između mladih i starih pasa. Zbog slabog adipogenog potencijala nije izvršena kvantifikacija adipogene diferencijacije.



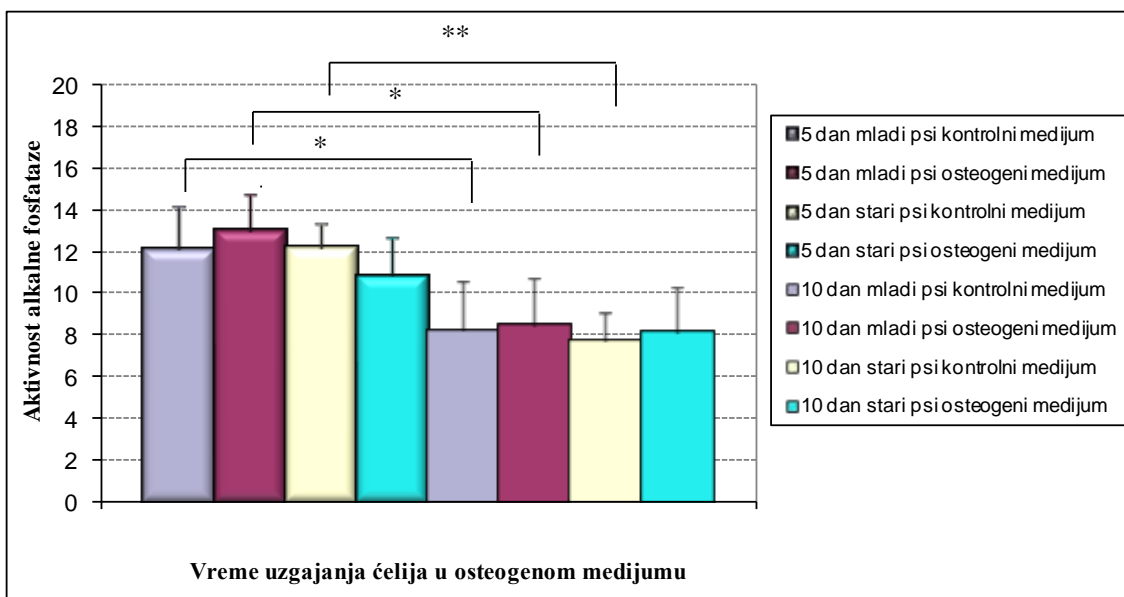
Slika 4. Adipogena diferencijacija ćelija izolovanih iz ST. Oil red O bojenje. Invertni mikroskop. **A.** Adipogeni medijum. Akumulacija krupnih lipidnih kapi u citoplazmi diferenciranih ćelija preadipocitne morfologije. **B.** Kontrolni medijum. Prisustvo sitnih lipidnih kapi u citoplazmi nediferenciranih ćelija fibroblastnog oblika. Imunocitohemijsko bojenje: **C.** Aktivnost alkalne fosfataze petog dana kultivacije u osteogenom medijumu kod mladih i starih pasa. Bar 100 μ m **D.** Ćelije uzgajane u kontrolnom medijumu neispoljavaju aktivnost AP. Bar 100 μ m. **E.** Nakon dve nedelje uzgajanja u osteogenom medijumu MĆ ST eksprimiraju osteokalcin. Bar 100 μ m. **F** U kontrolnom medijumu izostaje prisustvo osteokalcina. Bar 100 μ m. Konfluentne MĆ ST posle tri nedelje kultivacije. Bojenje Alizarin crvenim: **G. i H.** Osteogeni medijum. Depoziti kalcijum fosfata u ECM obojeni intenzivno crveno. Manji broj depozita kalcijum fosfata uočava se u ECM mladih pasa (**H**) u odnosu na stare pse (**G i I**). Bar 100 μ m. **I.** Intenzivno bojenje depozita kalcijuma alizarin crvenim kod starih pasa. Bar 100 μ m. **J.** Kontrolni medijum. Neobojen ECM. Bar 100 μ m.

7.6.2. Osteogena diferencijacija

Kultivacijom MĆ sinovijalne tečnosti u osteogenom medijumu tokom tri nedelje, dokazano je da se one u P3-P6 diferenciraju u pravcu osteoblasta. Petog dana osteogene diferencijacije kod ćelija uzgajanih u kontrolnom i osteogenom medijumu, došlo je do porasta aktivnosti AP i kod starih i kod mladih pasa koja je opadala desetog dana osteogene diferencijacije (grafikon 2). Nije uočena razlika u aktivnosti AP između ćelija gajenih u kontrolnom i osteogenom medijumu. Imunocitohemijskom analizom je pokazana aktivnost AP 5. i 10. dana kultivacije kod retkih pojedinih grupacija ćelija (slika 4C) koja nije uočena kod ćelija uzgajanih u kontrolnom medijumu (slika 4D).

Nakon dve nedelje kultivacije u osteogenom medijumu, osim povećane aktivnosti AP, postojala je i pojačana sinteza osteokalcina (slika 4E).

Nakon tri nedelje kultivacije ćelija u osteogenom medijumu, bojenjem Alizarin crvenim su potvrđeni agregati kalcijum-fosfata u ECM koji su se bojili crvenom bojom (slika 4G, 4H). Ćelije starih pasa formirale su veći broj depozita kalcijum-fosfata (slika 4G) od ćelija mladih pasa (slika 4H). Kod ćelija gajenih u kontrolnom medijumu, bojenjem Alizarin crvenim nije uočeno formiranje agregata kalcijum-fosfata (slika 4J).



Grafikon 2. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima alkalne fosfataze 5. i 10. dana kultivacije u osteogenom i kontrolnom medijumu. Petog dana uzgajanja ćelije mladih i starih pasa u osteogenom i kontrolnom medijumu ispoljile su aktivnost enzima AP koja se nije razlikovala između ćelija gajenih u kontrolnom i osteogenom medijumu, niti je postojala razlika između mladih i starih pasa. Desetog dana kultivacije aktivnost enzima je značajno opala u poređenju sa petim danom kultivacije. Iako su ćelije starih pasa uzgajane u osteogenom medijumu imale veću aktivnost enzima AP petog dana uzgajanja, u odnosu na deseti dan nije postojala statistički značajna razlika. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$.

7.6.3. Hondrogena diferencijacija

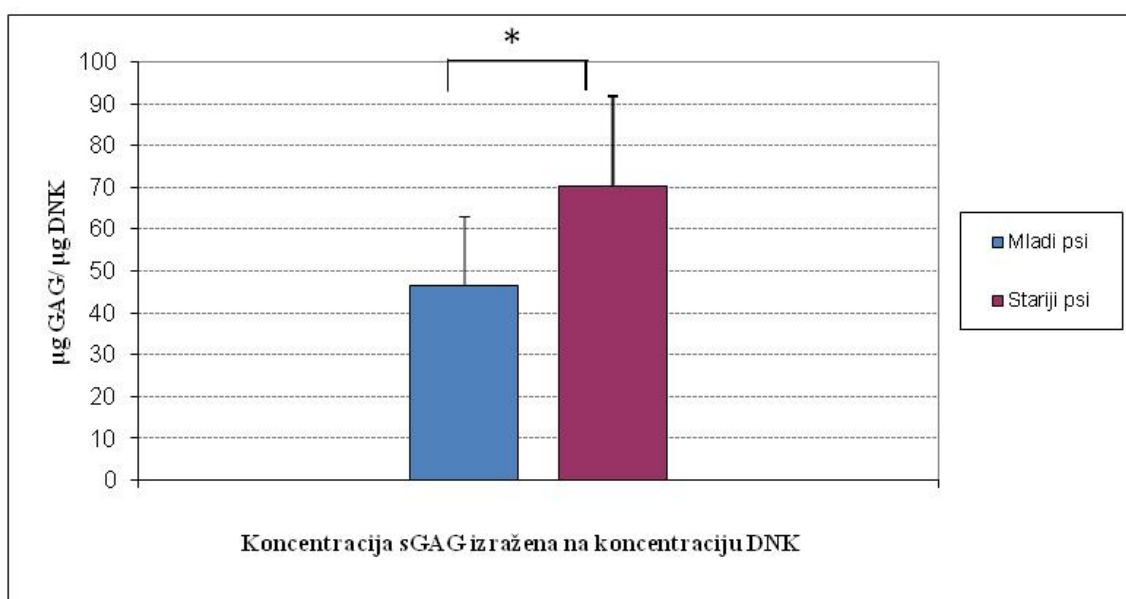
Nakon liziranja ćelija sinovijalne tečnosti gajenih u adherentnim kulturama 14 dana, određena je količina sGAG. Pokazano je da ne postoji značajna razlika u sintezi sGAG kod ćelija gajenih u hondrogenom u odnosu na ćelije gajene u kontrolnom medijumu. Uočeno je takođe da se sa starenjem povećava količina sGAG kod ćelija gajenih u hondrogenom medijumu (grafikon 3). Koncentracija GAG izražena je na koncentraciju DNK.

Da bi se pokazao hondrogeni potencijal, ćelije su takođe uzgajane u trodimenzionalnim uslovima u komercijalnom hondrogenom i kontrolnom medijumu 21 dan. Sintaza sGAG pokazana je histološki bojenjem peleta alcijan plavim.

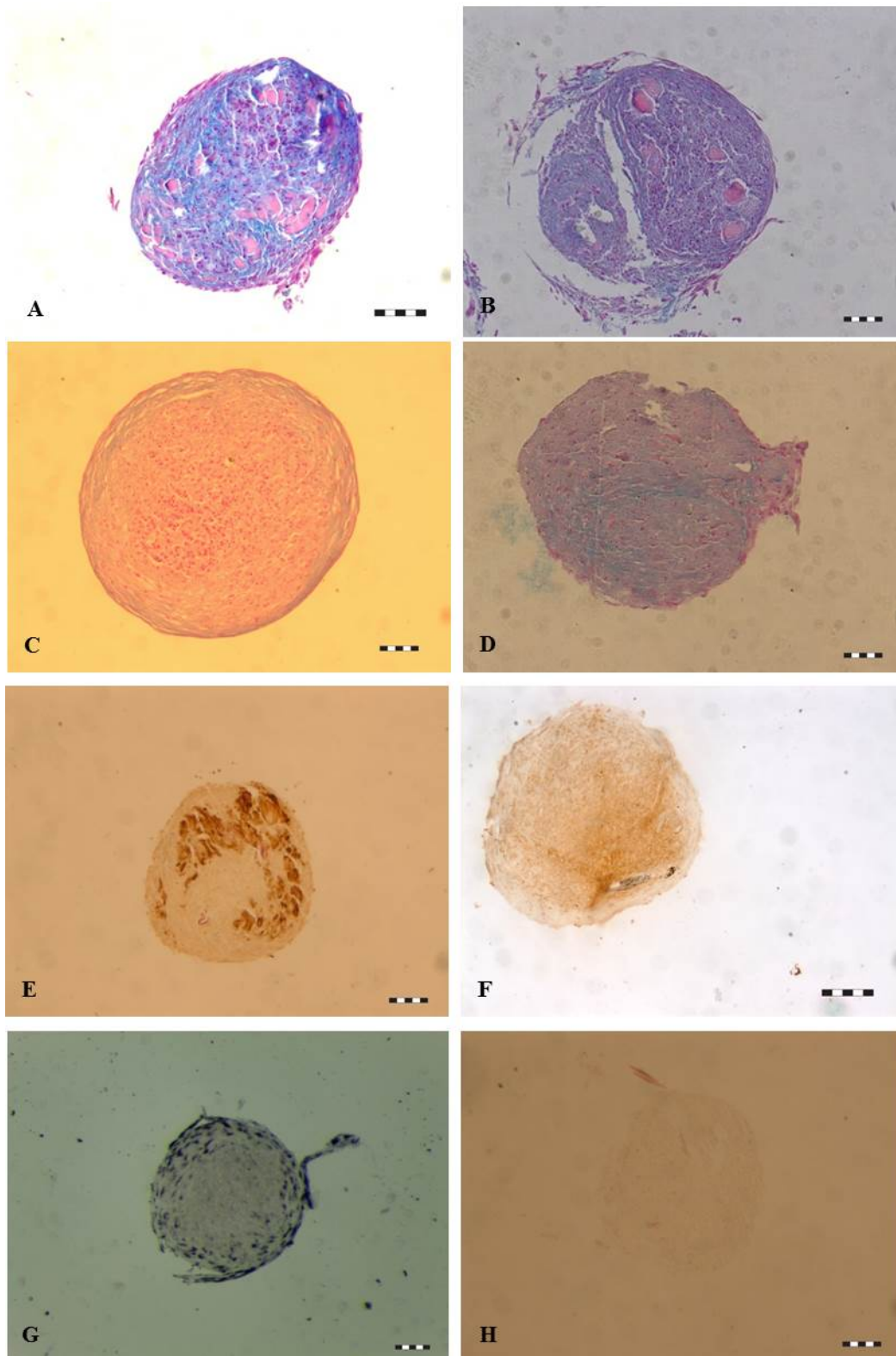
Ćelije gajene u hondrogenom (slika 5A i 9B) i kontrolnom medijumu (slika 5B, 9D) sintetisale su sGAG u ECM koji se intenzivno obojio plavim. Kod ćelija sinovijalne tečnosti mladih pasa uzgajanih u kontrolnom i u hondrogenom medijumu uočeno je prisustvo homogenih ostrvaca u ECM (slika 5A i 9B). Takva pojava nije uočena kod starijih pasa (slika 5C i 5D).

Ćelije uzgajane u hondrogenom i u kontrolnom medijumu bile su pozitivne na prisustvo kolagena tipa II, koji je karakterističan za ECM hijaline hrskavice (slika 5E i 5F). Homogena ostrvca ECM u peletama mladih pasa pokazala su pozitivno bojenje na kolagen tipa II (slika 5E). U površinskom sloju hondrogenih peleta ISH je pokazana ekspresija gena za kolagen tipa I (slika 5G).

In vivo potencijal izolovanih ćelija sinovijalne tečnosti ka hondrogenezi pokazan je na imunodeficijentnim miševima, subkutanom ubrizgavanjem ćelija sa hidrogelom. Nakom 6 nedelja uzgajanja, životinje su žrtvovane, a formirane tkivne strukture analizirane su histološki na prisustvo sGAG i kolagena tipa II (slika 6 A, 10B)



Grafikon 3. Koncentracija sGAG u ćelijama gajenim 14 dana u hondrogenom medijumu u monosloju. Sa starenjem se uočava porast koncentracije sGAG . * $P < 0.1$.

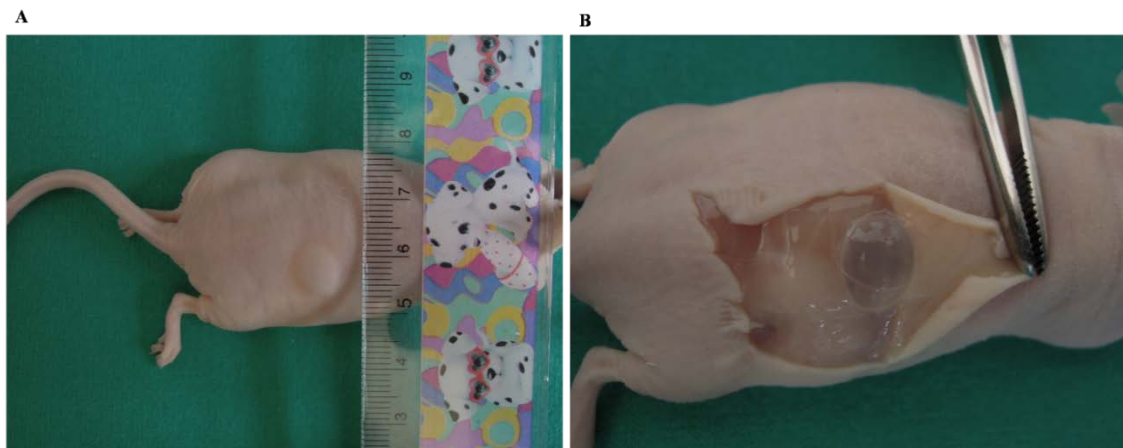


Slika 5. Čelije uzgajane 3 nedelje u 3D uslovima. Bojenje alcijan plavim. **A.** Hondrogeni medijum. Mladi psi. Intenzivno bojenje plavim sGAG u ECM. Jedra ćelija su obojena intenzivno crvenom bojom. Prisustna su homogena ostrvaca u ECM. Bar 50 μ m. **B.** Kontrolni medijum. Mladi psi. Bojenje sGAG plavim i ćelijskih jedara crvenim. Prisustna su takođe i homogena ostrvaca u ECM. Bar 50 μ m. **C.** Hondrogeni medijum. Stari psi. Intenzivno bojenje plavim sGAG u ECM. Jedra ćelija su obojena intenzivno crvenom bojom. Bar 50 μ m. **D.** Kontrolni medijum. Stari psi sGAG se boje plavo, a jedra ćelija

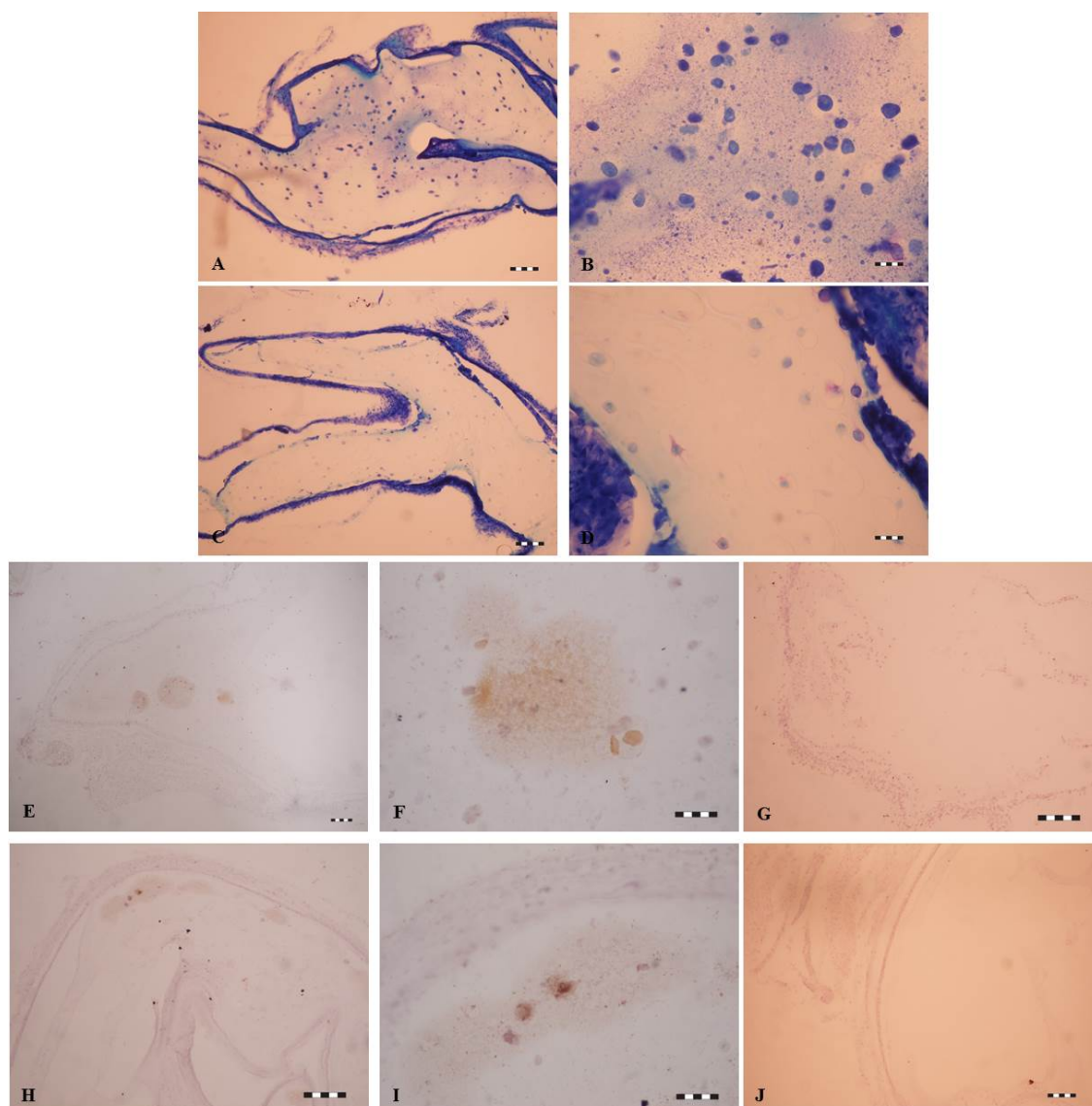
crveno. Bar 50 μ m. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa II: **E.** Hondrogeni medijum. Mladi psi. Homogena distribucija kolagena tipa II u ECM i bojenje depozita u ECM pozitivno na kolagen tipa II. Bar 50 μ m. **F.** Hondrogeni medijum. Stari psi. Homogena distribucija kolagena tipa II u ECM. Bar 50 μ m. **G.** In situ hibridizacija za klagen tipa **I.** Prisustvo RNK molekula za kolagen tipa I na ćelijama površinskog sloja peleta. Bar 50 μ m. **H.** Negativna reakcija za imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa II. U ECM se ne uočava prisustvo kolagena tipa II. Bar 50 μ m.

7.6.4. *In vivo* hondrogeni potencijal ćelija

Ćelije uzgajane u dvodimenzionalnim uslovima implantirane sa celuloznim hidrogelom (Si-HPMC) 2 meseca starim *nude* miševima, nakon 6 nedelja formirale su tkivne strukture veličine 1cm (slika 6A i 6B). Bojenjem sa alcijan plavim i IHH bojenjem na prisustvo kolagena tipa II pokazano je prisustvo komponenti ECM karakterističnih za hrskavični matriks: sGAG i kolagen tipa II (slika 7 A-J).



Slika 6. *Nude* miševi. **A** Subkutana formacija ćelija i hidrogela veličine 1 cm. **B.** Makroskopski prikaz subkutane tvorevine formirane nakon 6 nedelja uzgajanja *in vivo*.

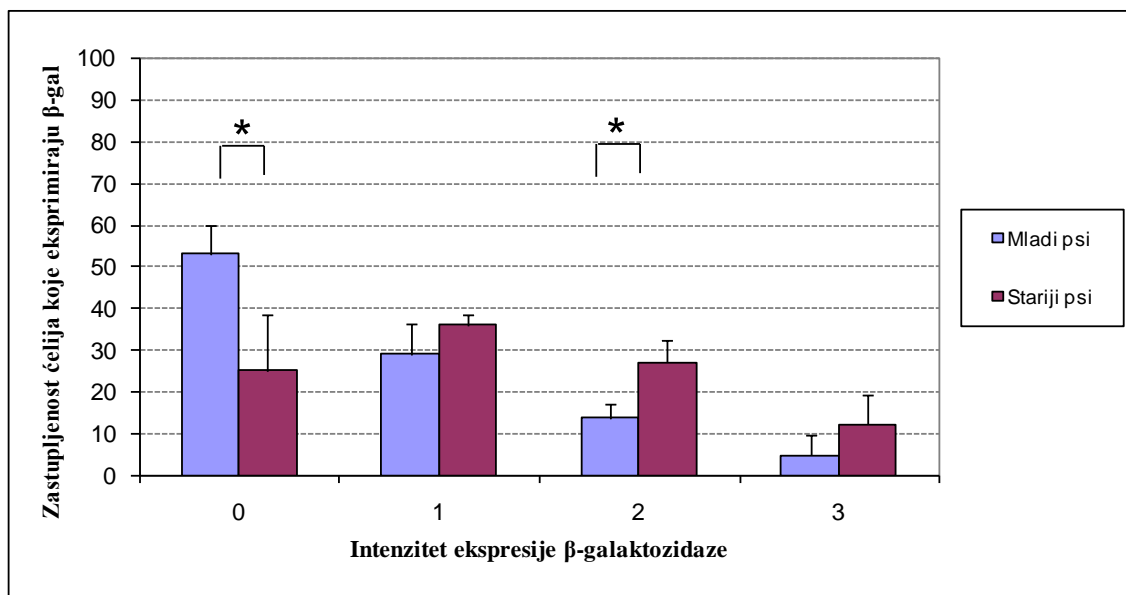


Slika 7. Histološki prikaz subkutanih tvorevina. Bojenje alcijan plavim (A-D). Imunohistohemjsko bojenje kolagena tipa II (E-J). **A-B.** Čelije uzgajane u hondrogenom medijumu formirale su ekstracelularni matriks bogat glikozaminoglikanima. **C-D.** Čelije uzgajane u kontrolnom medijumu takođe su formirale ekstracelularni matriks bogat glikozaminoglikanima. Bar 100 μ m. IHH bojenjem za kolagen tipa II pokazano je da čelije uzgajane i u hondrogenom (**E-F**) i kontrolnom medijumu (**H-I**) stvaraju kolagen tipa II. **G** i **J** negativne reakcije za IHH bojenje u kojima se ne uočava ECM obojen kolagenom tipa II. E i J bar 100 μ m. F, G, H, I bar 50 μ m.

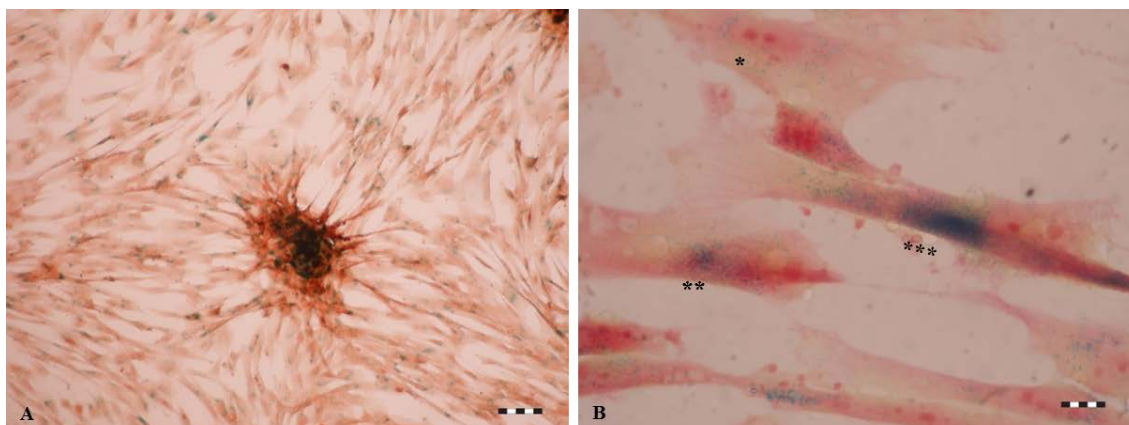
7.7. Određivanje aktivnosti β -galaktozidaze tokom kultivacije ćelija

Matične ćelije sinovijalne tečnosti u P3 pokazivale su aktivnost SA- β -galaktozidaze u ECM (slika 8A, 8B). Kod najvećeg procenta ćelija izolovanih iz ST mladih pasa nije uočeno prisustvo aktivnosti ovog enzima (grafikon 4), što predstavlja

statistički značajnu pojavu u poređenju sa MČ sinovijalne tečnosti starih pasa. Uočava se da stariji psi imaju veći procenat ćelija koje ekspimiraju SA- β -galaktozidazu, bez obzira da li se radi o slaboj, srednjoj ili visokoj ekspresiji, dok je statistički bila značajna razlika samo kod srednje jake ekspresije ovog enzima (grafikon 4).



Grafikon 4. Procenat ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti pasa koje imaju slabu, umerenu i visoku aktivnost SA- β -galaktozidaze u trećoj pasaži. * $P < 0.1$.



Slika 8. Reprezentativni prikaz bojenja SA- β -galaktozidaze MČ sinovijalne tečnosti u P3. **A.** Konfluentne ćelije posle kultivacije u trajanju od 72 časa. U citoplazmi ćelija uočava se prisustvo zeleno obojene SA- β -galaktozidaze. Bar 100 μ m. **B.** Prikaz semikvantitativnog određivanja aktivnosti SA- β -galaktozidaze. Ćelije sa najnižom *, srednjom **, i visokom***, aktivnošću enzima β -galaktozidaze. Bar 100 μ m.

7.8. Makroskopski pregled zglobnih struktura

Površina zglobne hrskavice femura i tibije kod svih mladih pasa bila je glatka i sjajna. Na jednoj trećini površine hrskavice femura i tibije, 3 od 13 starih radnih pasa (23%) i 4 od 6 starih neradnih psa (66.6%) imali su blago hrapavu žuto pigmentiranu površinu. Primenom Outerbridge makroskopskog sistema bodovanja promene su ocenjene ocenom 1 (od maksimum 4). Na sinovijalnoj membrani, meniskusima, tetivama i ligamentima nije uočeno prisustvo makroskopski vidljivih promena.

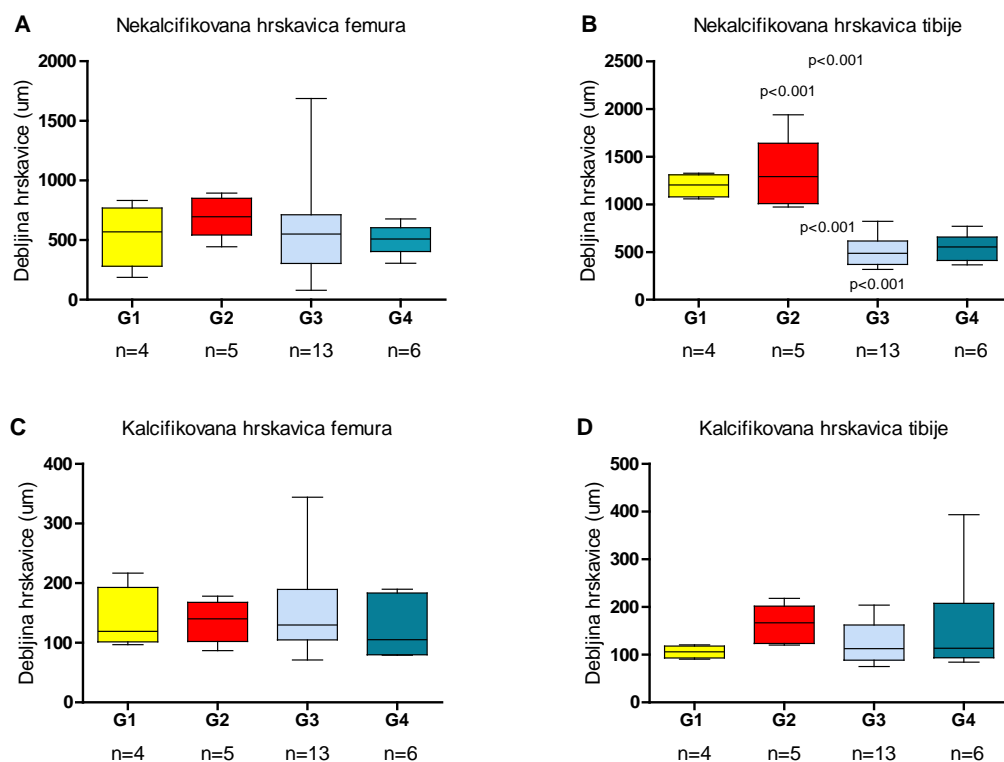
7.9. Histološka i histomorfometrijska analiza zglobne hrskavice

Svi mladi psi (G1 i G2) imali su glatku površinu hrskavice femura i tibije, dok je kod 4 od 13 (30.8 %) starih radnih pasa i 4 od 6 (66.6 %) starih neradnih psa uočeno prisustvo blagih udubljenja na površini hrskavice (slike 2B, 2D). Histološke promene odgovarale su makroskopski uočenim promenama.

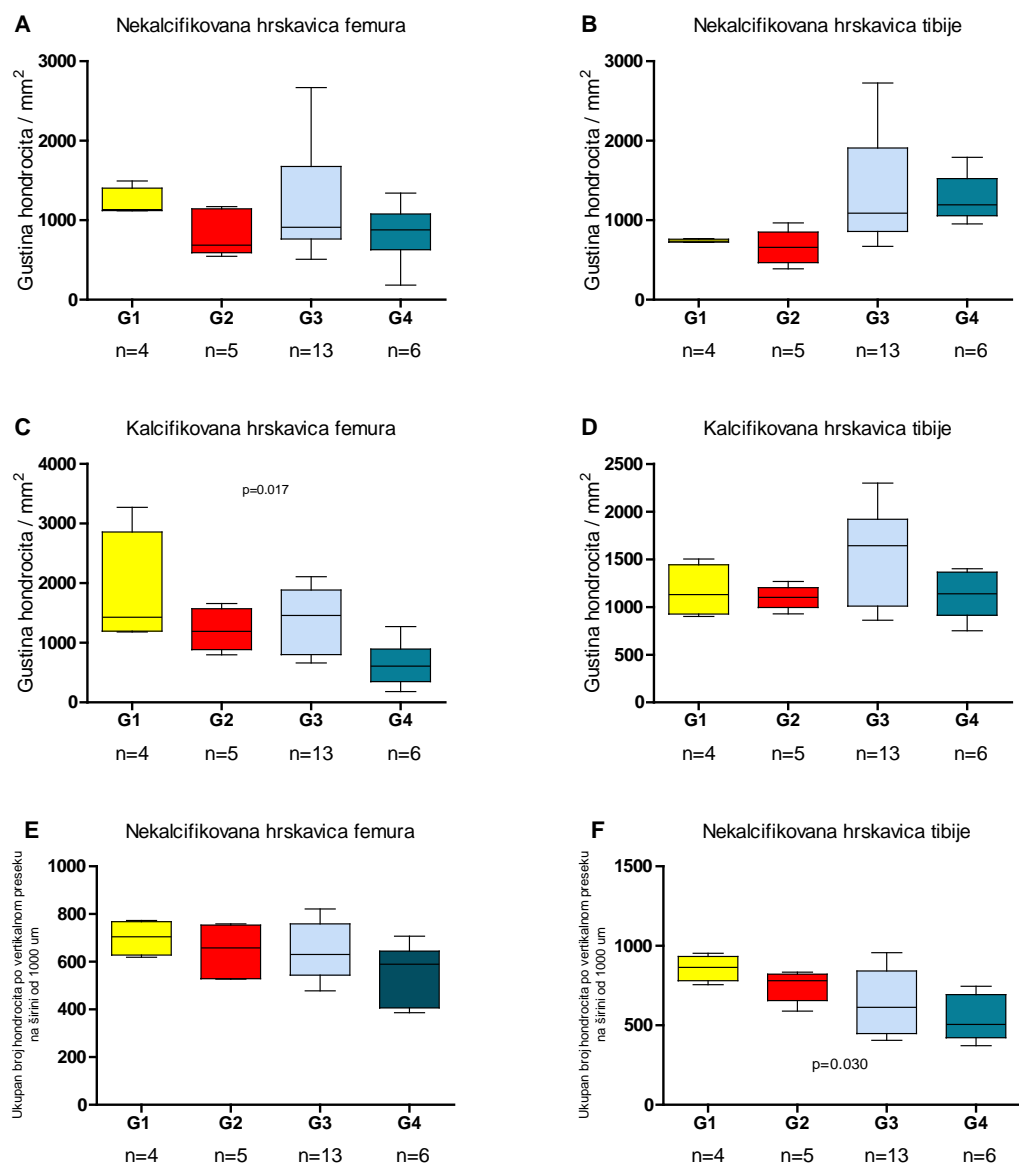
Ukupna debljina hrskavice femura bila je slična kod sve 4 ispitivane grupe (grafikon 5 A-D). Prosečna debljina hrskavice tibije mladih pasa (G1 i G2), je bila dva puta veća od prosečne debljine tibije starih pasa (G3 i G4) (slike 2A, 2B, grafikon 5B i D).

Radni psi (G1 i G3) imali su veću gustinu ćelija u nekalcifikovanoj hrskavici femura u odnosu na neradne pse (G2 i G4), ali ova razlika nije bila značajna (grafikon 6A).

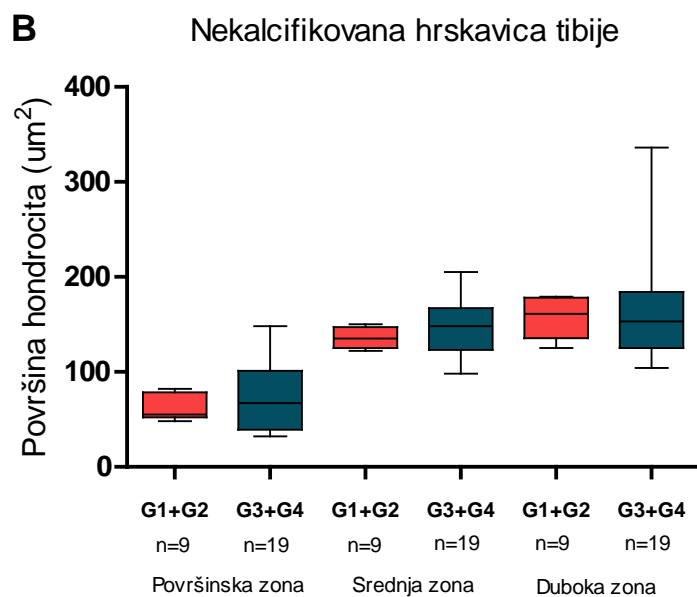
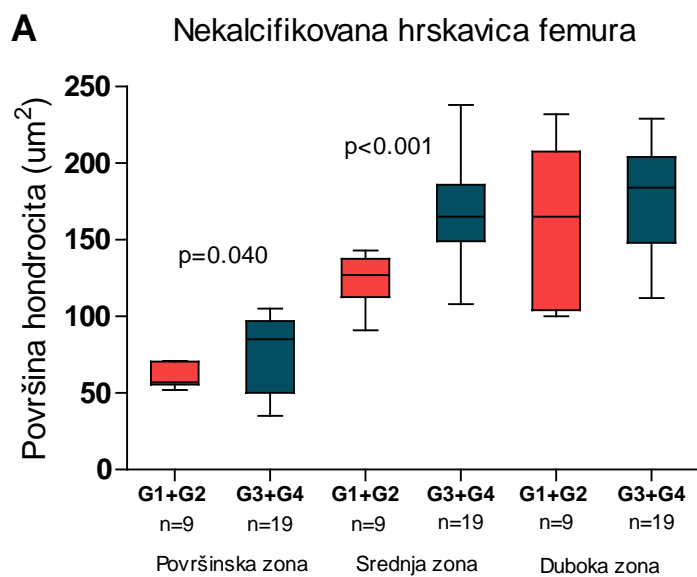
Gustina ćelija kalcifikovane zone femura starih neradnih pasa bila je znatno niža u odnosu na mlade radne pse (grafikon 6C). Značajno povećanje gustine ćelija u nekalcifikovanoj hrskavici tibije uočeno je kod starih radnih pasa u odnosu na mlade i stare neradne pse (grafikon 6B). Gustina ćelija u kalcifikovanoj zoni tibije bila je slična između grupa (grafikon 6D). Ukupan broj ćelija po vertikalnom preseku nekalcifikovane hrskavice femura imao je tendencu da opada sa starenjem, ali ta promena nije bila značajna (grafikon 6E). U nekalcifikovanoj hrskavici tibije broj ćelija opadao je sa starenjem. Značajnost je uočena samo između starih neradnih i mladih radnih pasa (grafikon 6F).



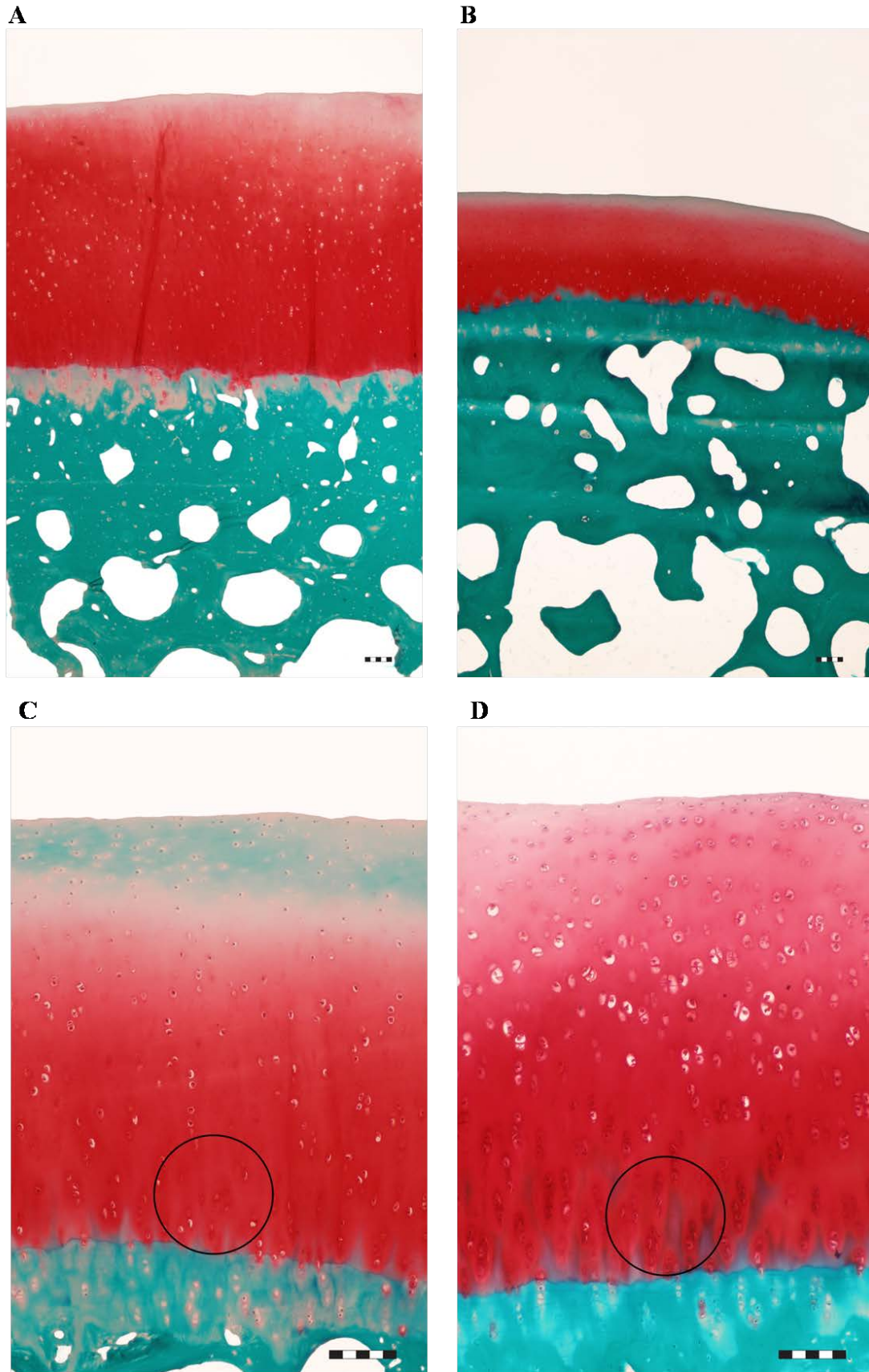
Grafikon 5. Debljina nekalcifikovane i kalcifikovane hrskavice femura i tibije mladih radnih (G1), mladih neradnih (G2), starih radnih (G3) i starih neradnih (G4) pasa predstavljene su u formi boksa, a minimalne i maksimalne vrednosti u formi vertikalnih zalistaka. Samo su statistički značajne razlike uočene između grupa predstavljene na grafikonu.



Grafikon 6. Gustina hondrocita i ukupan broj hondrocita po vertikalnom preseku nekalcifikovane i kalcifikovane hrskavice femura i tibije mladih radnih (G1), mladih neradnih (G2), starih radnih (G3) i starih neradnih (G4) pasa predstavljani su u formi boksa. Minimalne i maksimalne vrednosti prikazane su u formi vertikalnih zalistaka. Samo su statistički značajne razlike uočene između grupa predstavljene na grafikonu.



Grafikon 7. Površina hondrocita nekalcifikovane hrskavice femura i tibije mladih radnih (G1), mladih neradnih (G2), starih radnih (G3) i starih neradnih (G4) pasa predstavljene su u formi boksa, a minimalne i maksimalne vrednosti u formi vertikalnih zalistaka. Samo su statistički značajne razlike uočene između grupa predstavljene na grafikonu.



Slika 9. A. Hrkavica tibije, 5 godina star nemački ovčar, mladi radni pas. Intaktna struktura hrskavice. Ukupna debljina 1259 μ m. Crveno je obojena površinska, srednja i duboka zona hrskavice. Šafranin O fast

zeleno. Bar 100 μ m. **B.** Hrskavica tibije, 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Intaktna struktura hrskavice. Ukupna debljina 486.7 μ m. Svetlo zeleno obojena površinska zona i crveno srednja i duboka zona. Šafranin O fast zeleno. Bar 100 μ m. **C.** Hrskavica femura, 3 godine star nemački ovčar, mladi neradni pas. Intaktna struktura hrskavice. Ukupna debljina 780 μ m. U površinskoj zoni prisutni su spljošteni hondrociti. Izogene grupe duboke zone čine 2-4 hondrocita raspoređeni kolumnarno (obeleženo krugom). Svetlo zeleno obojena površinska zona i crveno srednja i duboka zona. Šafranin O fast zeleno. Bar 100 μ m. **D.** Hrskavica femura, 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Intaktna struktura hrskavice. Ukupna debljina 831.6 μ m. U površinskoj zoni prisutni su spljošteni hondrociti. Hipertrofični hondrociti (povećanje površine) prisutni su u srednjoj zoni. Izogene grupe duboke zone čine 4-6 hondrocita raspoređeni kolumnarno (obeleženo krugom). Crveno je obojena površinska, srednja i duboka zona. Šafranin O fast zeleno. Bar 100 μ m.

U površinskoj zoni femura mladih radnih pasa bili su prisutni samo spljošteni hondrociti (tabela 3, tabela 4), a kod starih neradnih pasa samo okrugli hondrociti (tabela 3, slika 10A). Mladi neradni i stari radni psi imali su u površinskoj zoni femura i spljoštene i okrugle hondrocite, koji su bili prisutni i u površinskoj zoni hrskavice tibije kod svih ispitivanih grupa (tabela 3, tabela 4, slika 9 C i 9D). Kalcifikovanu zonu tibije mladih neradnih pasa činili su samo okrugli hondrociti (slika 9F, tabela 4). Kod svih starih pasa (G3 i G4) uočavalo se povećanje površine hondrocita u svim zonama u odnosu na mlade pse (G1 i G2) ali je ova promena bila statistički značajna samo u odnosu na srednju zonu (grafikon 7A i B, slika 9C i 9D).

Srednja zona hrskavice femura kod svih ispitivanih pasa sadržala je neravnomerno raspoređene pojedinačne hondrocite (slika 9C, 9D, 3A i 3B) dok je kod starih radnih pasa bilo uočeno i prisustvo izogenih grupa sa po 2 hondrocita (slika 10A, 10B, tabela 3). U dubokoj zoni, kod najvećeg broja mladih pasa (G1 i G2) kao i kod starih neradnih pasa dominiraju izogene grupe sa 2-4 hondrocita, a kod starih radnih pasa sa 4-6 hondrocita (slika 9C, 9D, tabela 3). Između hrskavice femura mladih i starih pasa uočena je jedna kvalitativna razlika koja nije bila statistički značajna, a to je prisustvo kružnih izogenih grupa u srednjoj i dubokoj zoni. Jedan od 13 (7.7%) starih radnih pasa i 2 od 6 (33.3%) starih neradnih pasa u srednjoj zoni imali su kružne izogene grupe sastavljene od 4-6 ćelija (slika 10A, tabela 3). U dubokoj zoni ova pojava je uočena kod 4 od 13 (30.8%) starih radnih pasa i kod 2 od 6 (33.3%) starih neradnih pasa (tabela 3). Kalcifikovanu zonu femura i tibije mladih i starih neradnih pasa sačinjavali su pretežno pojedinačni hondrociti (slika 10D, 10F, tabela 3 i tabela 4) u poređenju sa mladim i starim radnim psima (slika 10C, 10E, tabela 3 i tabela 4).

Izogene grupe u nekalcifikovanoj hrskavici tibije imaju istu morfologiju i raspored kao u hrskavici femura (tabela 4).

Zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice u femuru i tibiji kod sve četiri ispitivane grupe je homogene strukture bez prekida u kontinuitetu, dok je duplikacija uočena samo kod starih radnih pasa (slika 10C, tabela 3 i tabela 4).

Subhondralna kost femura i tibije kod svih ispitivanih pasa je bila bez prisustva skleroze, pseudocisti ili fibroze kostne srži. Debljina subhondralne kosti femura kod svih ispitivanih pasa bila je između 45-104 μ m a tibije 38-95 μ m (slika 9A-D).

Tabela 3. Ispitivanje morfoloških karakteristika hondrocita u hrskavici femura i zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice.

Grupa	G1 P/U (%) ^a	G2 P/U (%) ^a	G3 P/U (%) ^a	G4 P/U (%) ^a	S ^b
Površinska zona					
Morfolologija hondrocita					
Spljošteni	4/4 (100) ^{D†}	3/5 (60)	6/13 (46)	0/6 (0) ^{A†}	0.017
Okrugli	0/4 (0) ^{B*,C*,D†}	4/5 (80) ^{A*}	10/13 (77) ^{A*}	6/6 (100) ^{A†}	0.005
Srednja zona					
Morfolologija hondrocita					
Elipsoidni	0/4 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	0/6 (0)	0.999
Okrugli	4/4 (100)	5/5 (100)	13/13 (100)	6/6 (100)	0.999
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	4/4 (100)	5/5 (100)	10/13 (77)	6/6 (100)	0.275
2 ćelije	0/4 (0)	1/5 (20)	7/13 (54) ^{D*}	0/6 (0) ^{C*}	0.041
2-4 ćelije	0/4 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	2/6 (33)	0.058
4-6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754.
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	0/6 (0)	0.999
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	0/4 (0)	0/5 (0)	4/13 (31)	0/6 (0)	0.146
Cirkularna	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	2/6 (33)	0.220
Duboka zona					
Morfolologija hondrocita					
Elipsoidna	0/4 (0)	3/5 (60)	8/13 (61)	1/6 (17)	0.068
Okrugla	4/4 (100)	5/5 (100)	11/13 (85)	6/6 (100)	0.478
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	2/4 (50)	4/5 (80) ^{C*}	2/13 (15) ^{B*,D†}	6/6 (100) ^{C†}	0.003
2 ćelije	4/4 (100)	2/5 (40) ^{C*}	13/13 (100) ^{B*}	6/6 (100)	0.001
2-4 ćelije	1/4 (25)	1/5 (20)	7/13 (54)	3/6 (50)	0.502
4-6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	0/6 (0)	0.478
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	1/4 (25) ^{C*}	1/5 (20) ^{C†}	12/13 (92) ^{A*,B†,D*}	2/6 (33.3) ^{C*}	0.006
Cirkularna	0/4 (0)	0/5 (0)	4/13 (30.8)	2/6 (33.3)	0.304
Zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane zone					
Intaktna	4/4 (100)	5/5 (100)	13/13 (100)	6/6 (100)	0.999
Duplikacije	1/4 (25)	0/5 (0)	11/13 (85) ^{D*}	1/6 (17) ^{C*}	0.002
Kalcifikovana zona					
Morfolologija hondrocita					

Elipsoidna	0/4 (0)	0/5 (0)	6/13 (46)	0/6 (0)	0.032
Okrugla	4/4 (100)	5/5 (100)	9/13 (69)	6/6 (100)	0.146
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	2/4 (50)	4/5 (80) ^{C*}	3/13 (23) ^{B*,D†}	6/6 (100) ^{C†}	0.009
2 ćelije	4/4 (100)	5/5 (100)	11/13 (85)	4/6 (67)	0.349
2-4 ćelije	2/4 (50)	2/5 (40)	7/13 (54)	2/6 (33)	0.848
4-6 ćelija	1/4 (25)	0/5 (0)	4/13 (31)	0/6 (0)	0.260
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	0/6 (0)	0.478
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	2/4 (50)	2/5 (40)	7/13 (54)	4/6 (67)	0.848
Ćirkularna	0/4 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	1/6 (17)	0.660

Kruskal-Wallis ne parametrijska ANOVA i Fisher`s exact post hoc test su korišćeni da bi se poredila proporcija između grupa.

^aP/U(%)-Positivno/od ukupnog broja pasa koji imaju naznačenu promenu, izraženo u (%)

^bS-Statistika.

^AU odnosu na mlade radne pse (G1), ^BU odnosu na mlade neradne pse (G2), ^CU odnosu na stare radne pse (G3), ^DU odnosu na stare neradne pse (G4).

*- $P < 0.05$; †- $P < 0.01$.

Tabela 4. Ispitivanje morfoloških karakteristika hondrocita u hrskavici tibije i zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice.

Grupa	G1 P/U (%) ^a	G2 P/U (%) ^a	G3 P/U (%) ^a	G4 P/U (%) ^a	S ^b
Površinska zona					
Morfolologija hondrocita					
Spljošteni	4/4 (100)	4/5 (80)	8/13 (61)	2/6 (33)	0.151
Okrugli	4/4 (100) ^{B*}	1/5 (20) ^{A*,C*}	10/13 (77) ^{B*}	5/6 (83)	0.034
Srednja zona					
Morfolologija hondrocita					
Elipsoidni	0/4 (0)	2/5 (40)	0/13 (0)	0/6 (0)	0.019
Okrugli	4/4 (100)	5/5 (100)	13/13 (100)	6/6 (100)	0.999
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	4/4 (100)	5/5 (100)	10/13 (77)	5/6 (83)	0.503
2 ćelije	4/4 (100)	3/5 (60)	7/13 (54)	6/6 (100)	0.098
2-4 ćelije	0/4 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	1/6 (17)	0.660
4-6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
Cirkularna	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
Duboka zona					
Morfolologija hondrocita					
Elipsoidan	1/4 (25)	3/5 (60)	8/13 (61)	1/6 (17)	0.218
Okrugao	4/4 (100)	5/5 (100)	8/13 (61)	5/6 (83)	0.189
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	3/4 (75)	5/5 (100)	9/13 (69)	5/6 (83)	0.542
2 ćelije	2/4 (50)	1/5 (20) ^{C†}	12/13 (92) ^{B†}	4/6 (67)	0.024
2-4 ćelije	3/4 (75) ^{B*}	0/5 (0) ^{A*,C*}	9/13 (69) ^{B*}	3/6 (50)	0.050
4-6 ćelija	3/4 (75)	2/5 (40)	3/13 (23)	1/6 (17)	0.198
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	0/6 (0)	0.478
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	4/4 (100)	3/5 (60)	7/13 (54)	4/6 (67)	0.408
Cirkularna	1/4 (25)	0/5 (0)	4/13 (31)	2/6 (33)	0.548
Zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane zone					
Intaktna	4/4 (100)	5/5 (100)	13/13 (100)	6/6 (100)	0.999
Duplikacije	0/4 (0)	0/5 (0)	4/13 (31)	4/6 (67)	0.048
Kalcifikovana zona					
Morfolologija hondrocita					
Elipsoidni	3/4 (75)	1/5 (20) ^{C*}	10/13 (77) ^{B*}	3/6 (50)	0.136

Okrugli	0/4 (0) ^{B†}	5/5 (100) ^{A†}	6/13 (46)	4/6 (67)	0.022
Broj ćelija koje formiraju izogene grupe					
Pojedinačne ćelije	1/4(25)	3/5 (60) ^{C*}	0/13 (0) ^{B*,D†}	4/6 (67) ^{C†}	0.008
2 ćelije	1/4 (25)	1/5 (20)	7/13 (53)	3/6 (50)	0.502
2-4 ćelije	3/4 (75)	1/5 (20) ^{C*}	10/13 (77) ^{B*}	2/6 (33)	0.078
4-6 ćelija	3/4 (75) ^{B*}	0/5 (0) ^{A*}	2/13 (15)	1/6 (17)	0.036
> 6 ćelija	0/4 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.754
Distribucija ćelija koje formiraju izogene grupe					
Kolumnarna	4/4 (100) ^{B*}	1/5 (20) ^{A*,C*}	11/13 (85) ^{B*}	3/6 (50)	0.021
Cirkularana	0/4 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	2/6 (33)	0.048

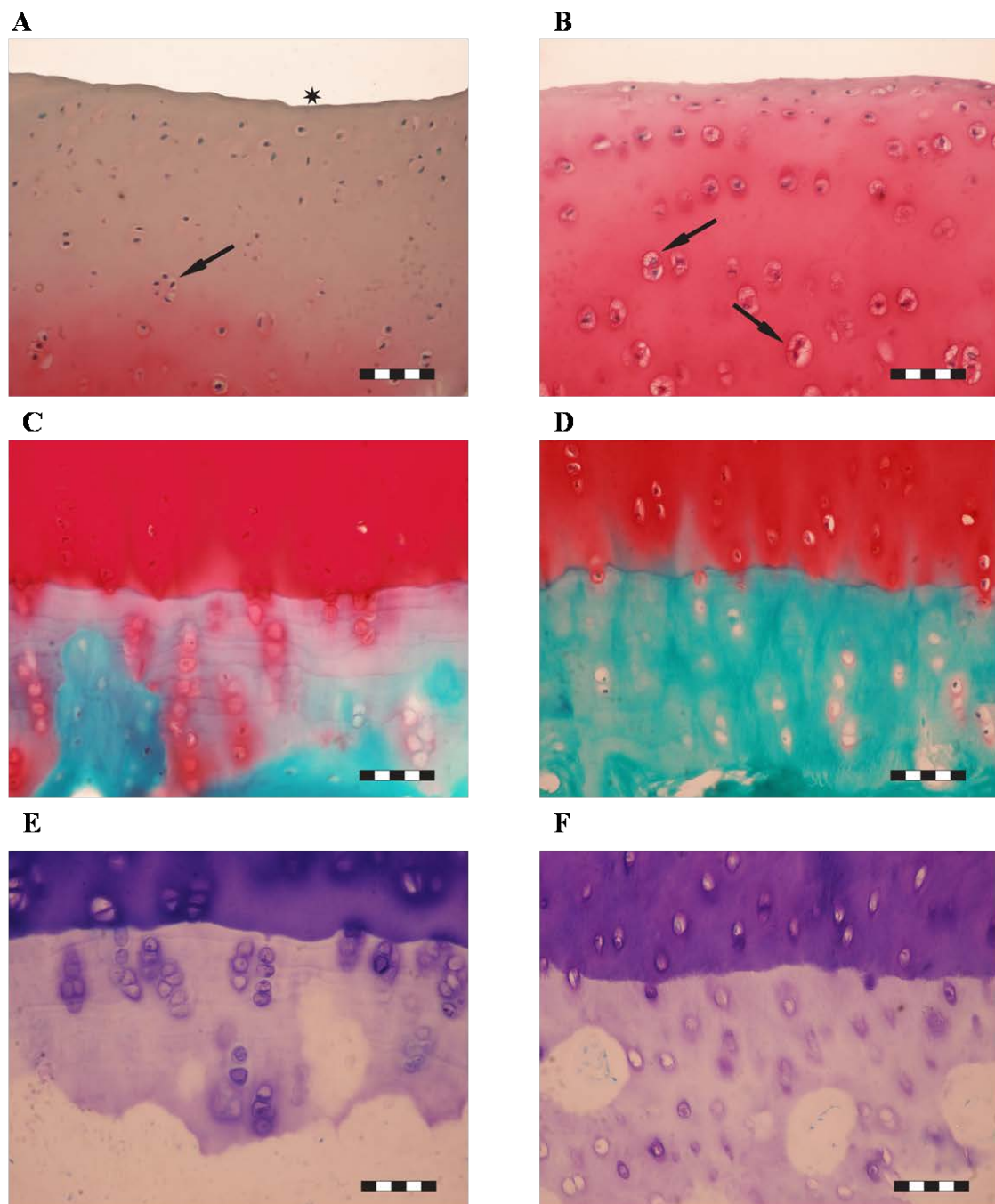
Kruskal-Wallis ne parametrijska ANOVA i Fisher's exact post hoc test su korišćeni da bi se poredila proporcija između grupa.

^aP/U(%)-Positivno/od ukupnog broja pasa koji imaju naznačenu promenu, izraženo u (%)

^bS-Statistika.

^AU odnosu na mlade radne pse (G1), ^BU odnosu na mlade neradne pse (G2), ^CU odnosu na stare radne pse (G3), ^DU odnosu na stare neradne pse (G4).

*- $P < 0.05$; †- $P < 0.01$.



Slika 10. **A.** Hrskavica femura. 11 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Na površini hrskavice prisutna su blaga udubljenja (zvezdica). Hondrociti okruglog oblika čine površinsku zonu. U srednjoj zoni (strelica) prisutne su cirkularne izogene grupe koje čine 4-6 ćelija. Svetlo zeleno bojenje površinske zone i crveno srednje i duboke zone. Šafranin O fast zeleno. Bar 50 μ m. **B.** Hrskavica femura. 11 godina star nemački ovčar, stari neradni pas. Spljoštjeni hondrociti u površinskoj zoni i ćelijski klasteri u srednjoj zoni (strelica). Svetlo crveno bojenje površinske i srednje zone. Šafranin O fast zeleno. Bar 50 μ m. **C.** Hrskavica femura. 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Homogena zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice sa duplikacijama. Radijalan raspored izogenih grupa sa 4-6 ćelija u kalcifikovanoj hrskavici. Šafranin O fast zeleno. Bar 50 μ m. **D.** Hrskavica femura. 12 godina star nemački

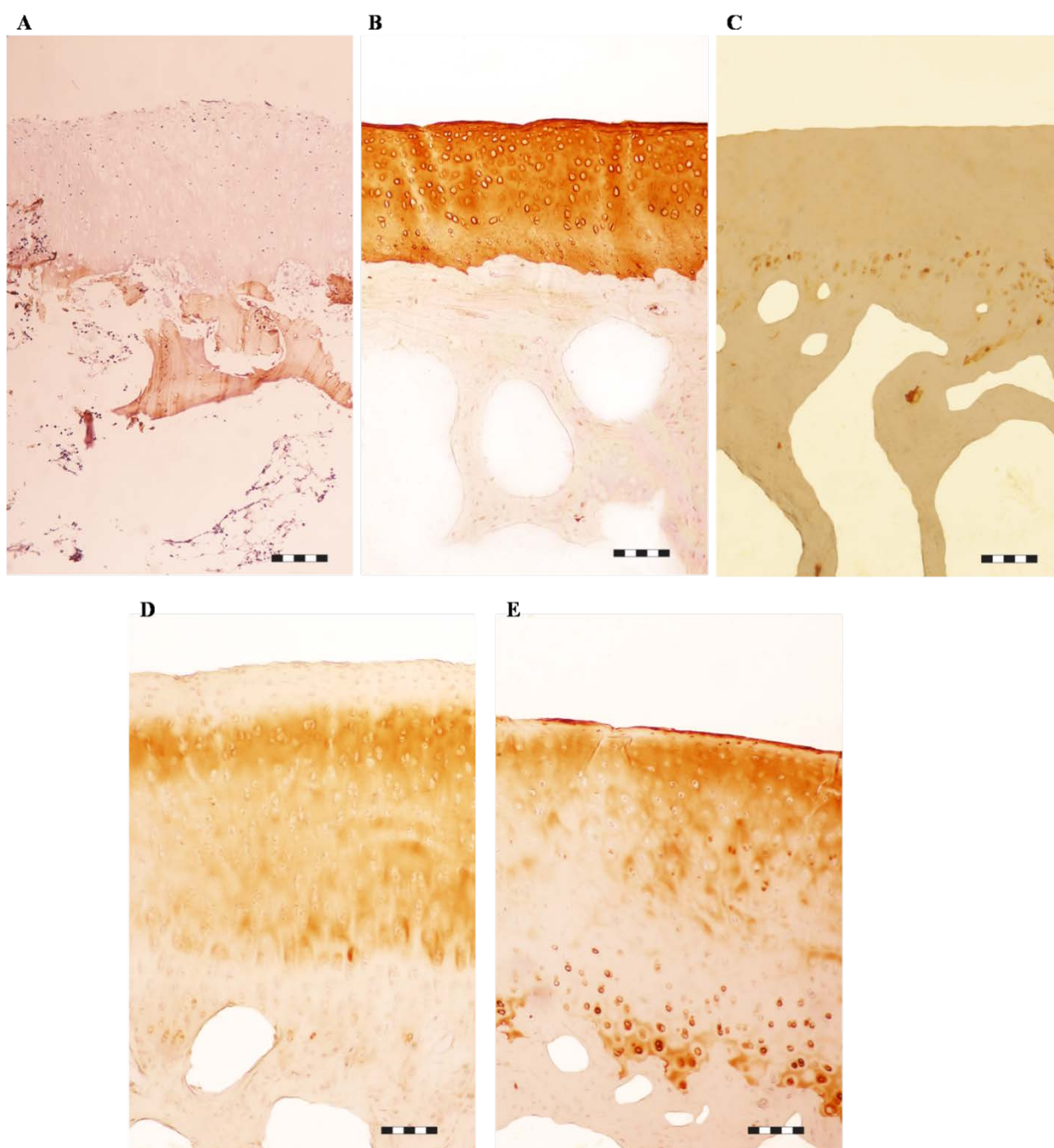
ovčar, stari neradni pas. Homogena zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice bez duplikacija. Radijalan raspored izogenih grupa sa 2-4 ćelije u kalcifikovanoj hrskavici. Šafranin O fast zeleno. Bar 50 μ m. **E.** Hrkavica tibije. 5 godina star nemački ovčar, mladi radni pas. Homogena zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice. Radijalan raspored izogenih grupa sa 4-6 ćelija u kalcifikovanoj hrskavici. Toluidin plavo. Bar 50 μ m. **F.** Hrkavica tibije. 5 godina star nemački ovčar, mladi neradni pas. Homogena zona koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice. Pojedinačni hondrociti u kalcifikovanoj hrskavici. Toluidin plavo. Bar 50 μ m.

7.10. Bojenje proteoglikana i glikozaminoglikana u zglobnoj hrskavici

Nakon bojenja tkivnih isečaka hrskavice šafranin O fast zelenim, kod svih ispitivanih grupa srednja i duboka zona su se bojile crvenim (slika 9A-D) dok se površinska zona bojila crveno (slika 3A, 3B, 9A, 9D) ili zeleno (slika 2C, 9B). Šafranin O fast zelenim se PG/GAG boje crveno dok se kolagen tipa I i nekolagenski proteini (COMP) boje zelenim.

7.11. Imunohistohemijska analiza kolagena u zglobnoj hrskavici

Između mladih i starih pasa kao i radnih i neradnih nije postojala razlika u ekspresiji kolagena tipa I i II. Kolagen tipa I je bio prisutan samo u koštanom tkivu (slika 11A), dok u nekalcifikovanoj hrskavici postoji homogena distribucija kolagena tipa II (slika 11B). Kolagen tipa X je kod svih ispitivanih grupa eksprimiran oko hondrocita u kalcifikovanoj zoni (teritorijalni matriks) (slika 11C-E). Kod starih radnih i neradnih pasa, osim u kalcifikovanoj hrskavici, kolagen tipa X je distribuiran i u nekalcifikovanoj hrskavici. Kod starih radnih pasa, kolagen tipa X je bio prisutan u interteritorijalnom matriksu od srednje do duboke zone (slika 11D), dok je kod starih neradnih pasa distribuiran od površinske do duboke zone (slika 11E). Kolagen tipa X je u većoj meri eksprimiran u nekalcifikovanoj hrskavici starih neradnih pasa nego u odnosu na stare radne pse.



Slika 11. A. Hrskavica tibije. 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa I. Ekspimiran je samo u koštanom tkivu. Kontrastirano hematoksilinom. Bar 100 μ m. **B.** Hrskavica tibije. 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa II. Homogeno je ekspimiran u nekalcifikovanoj hrskavici. Bar 100 μ m. **C.** Hrskavica femura. 5 godina star nemački ovčar, mladi neadni pas. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa X. Distribuiran je samo u kalcifikovanoj zoni oko hipertrofičnih hondrocita. Bar 100 μ m. **D.** Hrskavica femura. 12 godina star nemački ovčar, stari radni pas. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa X. U interteritorijalnom matriksu od srednje do duboke zone nekalcifikovane hrskavice uočava se homogena distribucija kolagena tipa X. Ekspresija je prisutna i u kalcifikovanoj hrskavici oko hipertrofičnih hondrocita. Bar 100 μ m. **E.**

Hrskavica femura. 12 godina star nemački ovčar, stari neradni pas. Imunohistohemijsko bojenje kolagena tipa X. U nekalcifikovanoj zoni hrskavice prisutna je homogena distribucija kolagena tipa X u interteritorijalnom matriksu kao i u kalcifikovanoj hrskavici oko hipertrofičnih hondrocita. Bar 100µm.

7.12. Procena histoloških promena na zglobnoj hrskavici prema OARSI sistemu

Opisivanjem struktura zglobne hrskavice prema OARSI (*Cook i sar., 2010*) preporučenom sistemu za procenu histoloških promena kod OA na zglobnoj hrskavici pasa, dobijeni se sledeći rezultati: a) kod mladih pasa (G1 i G2) nisu postojale promene u strukturi zglobne hrskavice; b) kod starih pasa uočeno je prisustvo lokalnih udubljenja na površini zglobne hrskavice, što je kod starih radnih pasa ocenjeno ocenom 1/12, a kod starih neradnih pasa sa 2/12. Što se tiče promena vezanih za morfologiju hondrocita, multi-fokalni mali ćelijski klasteri (2-4 ćelije) dominirali su u dubokoj i kalcifikovanoj zoni hrskavice, što je kod starih radnih pasa ocenjeno ocenom 4/12, a kod starih neradnih pasa ocenom 2/12. Globalna duplikacija zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane zone kod starih radnih pasa ocenjena je ocenom 3/6, a kod starih neradnih pasa 2/6.

7.13. Procena histoloških promena na sinovijalnoj membrani prema OARSI sistemu

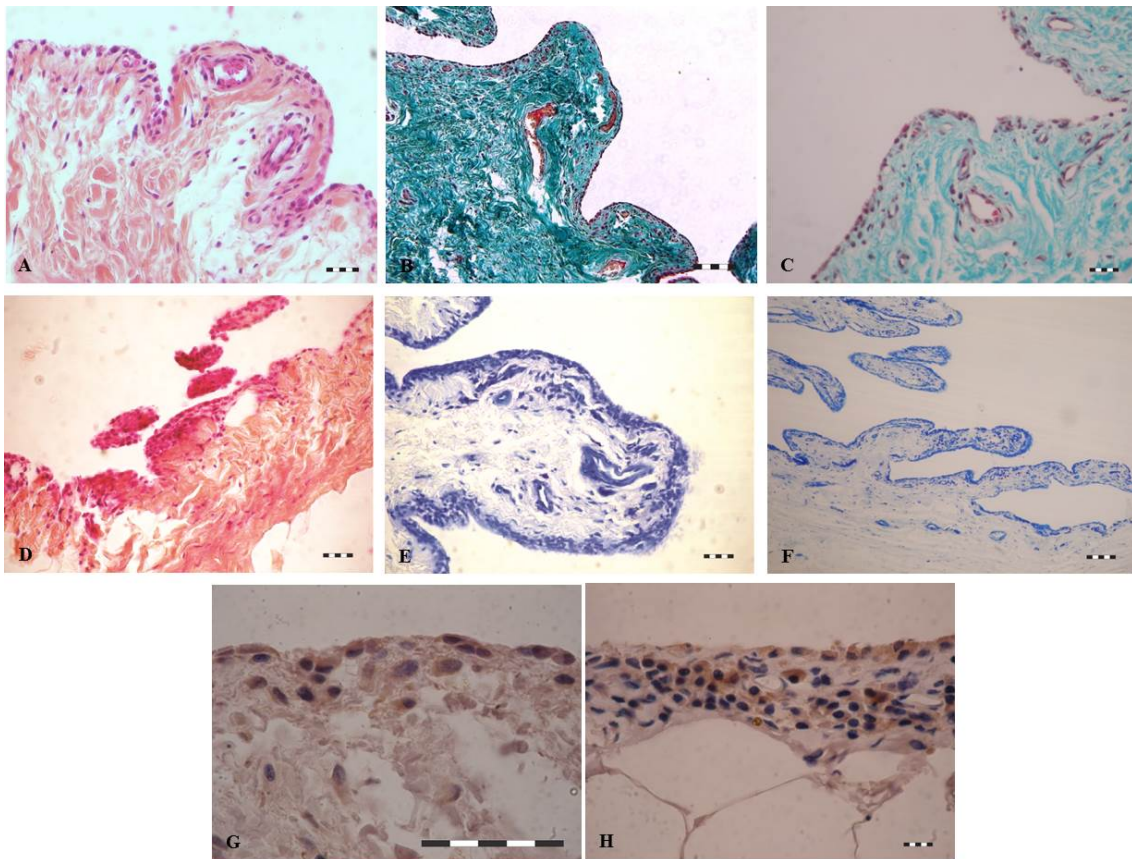
Intimu SM svih mladih (G1 i G2) i starih pasa (G3 i G4) činili su 1-2 sloja sinoviocita, što odgovara fiziološkoj građi ovog sloja (slika 12 A-J). Promene koje se karakterišu povećanim brojem slojeva sinoviocita uočene su samo lokalno kod starih pasa (slika 12 B-F, 12H i 12J). Površinu SM svih mladih i starih pasa činili su kratki nabori (slika 12A-J), dok su dugi prstoliki nabori uočeni samo kod radnih pasa (G1 i G2) (slika 12F) koji su bili raspoređeni lokalno, naročito u predelima gde je SM aleolarnog tipa. U vezivnom tkivu subintime starih pasa, u blizini krvnih sudova, uočeni su retki mastociti (slika 12F). Nije uočeno prisustvo limfocitne infiltracije niti formiranje limfnih meškova ni kod jedne ispitivane grupe. U subintimi nije bila prisutna akumulacija kolagenih vlakana, a raspored i broj krvnih sudova odgovarao je fiziološkom nalazu nepromenjenog tkiva SM (tabela 5).

Tabela 5. Ispitivanje morfoloških karakteristika sinovijalne membrane fibroznog, aleolarnog i adipoznog tipa prema OARSI preporučenom sistemu za procenjivanje promena na sinovijalnoj membrani pasa.

Parametar	G1 P/T (%) ^a	G2 P/T (%) ^a	G3 P/T (%) ^a	G4 P/T (%) ^a	S ^b
Tip					
Fibrozni	5/5 (100) ^{D†}	5/5 (100) ^{D†}	6/13 (46)	1/6 (17) ^{A†,B†}	0.007
Aleolarni	0/5 (0) ^{D*}	0/5 (0) ^{D*}	4/13 (31)	4/6 (67) ^{A*,B*}	0.037
Adipozni	0/5 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	1/6 (17)	0.460
Broj slojeva ćelija					
1-2	5/5 (100)	5/5 (100)	9/13 (69)	5/6 (83)	0.290
3-6	0/5 (0)	0/5 (0)	4/13 (31)	2/6 (33)	0.262
> 6	0/5 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	1/6 (17)	0.649
Oblik ćelija					
Ovalan	5/5 (100)	5/5 (100)	10/13 (77)	6/6 (100)	0.249
Elipsoidan	5/5 (100)	5/5 (100)	9/13 (69)	5/6 (83)	0.290
Nabori					
Kratki	5/5 (100)	5/5 (100)	11/13 (85)	6/6 (100)	0.450
Prstoliki	5/5 (100) ^{B†}	0/5 (0) ^{A†}	6/13 (46)	3/6 (50)	0.018
Bez nabora	0/5 (0)	0/5 (0)	2/13 (15)	0/6 (0)	0.450
Broj slojeva ćelija na naborima					
1-2	0/5 (0)	0/5 (0)	3/13 (23)	1/6 (17)	0.460
3-6	5/5 (100)	5/5 (100)	8/13 (62)	5/6 (83)	0.160
> 6	0/5 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	0/6 (0)	0.735
Raspored kratkih nabora					
Lokalno	5/5 (100) ^{B†,C†}	0/5 (0) ^{A†}	3/13 (23) ^{A†}	2/6 (33)	0.005
Dve trećine	0/5 (0) ^{B†}	5/5 (100) ^{A†,C†}	2/13 (15) ^{B†}	3/6 (50)	0.002
Preko dve trećine	0/5 (0)	0/5 (0)	6/13 (46)	1/6 (17)	0.078
Raspored prstolikih nabora					
Lokalno	5/5 (100) ^{B†}	0/5 (0) ^{A†}	5/13 (39)	2/6 (33)	0.013
Dve trećine	0/5 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	1/6 (17)	0.649
Preko dve trećine	0/5 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	0/6 (0)	0.999
Ćelijska infiltracija					
	0/5 (0)	0/5 (0)	0/13 (0)	0/6 (0)	0.999
Vaskularizacija subintime					
	5/5 (100)	5/5 (100)	7/13 (54)	6/6 (100)	0.025
Prisustvo mastocita					
	0/5 (0)	0/5 (0)	4/13 (31)	2/6 (33)	0.262

Chi-square test i *Fisher's exact post hoc test* su korišćeni da bi se poredila proporcija između grupa. ^aP/U(%)-Pozitivno/od ukupnog broja pasa koji imaju naznačenu promenu, izraženo u (%); ^bS-

Statistika; ^AU odnosu na mlade radne pse (G1), ^BU odnosu na mlade neradne pse (G2), ^CU odnosu na stare radne pse (G3), ^DU odnosu na stare neradne pse (G4). * $P < 0.05$; † $P < 0.01$



Slika 12. **A.** Sinovijalna membrana fibroznog tipa. 5 godina star nemački ovčar. H/E bojenje. Bar 100µm. **B.** Sinovijalna membrana fibroznog tipa. 12 godina star nemački ovčar. Trihromno bojenje po Masonu. Bar 100µm. **C.** Sinovijalna membrana fibroznog tipa. 12 godina star nemački ovčar. Bojenje po Masson-Goldneru. Intimu sinovijalne membrane čine kratki nabori sa jednim do dva sloja ćelija. Bar 50µm. **D.** Sinovijalna membrana fibroznog tipa. 12 godina star nemački ovčar. H/E bojenje. Intimu sinovijalne membrane čine 4-5 slojeva sinoviocita. Bar 100µm. **E.** Sinovijalna membrana aleoralnog tipa. 12 godina star nemački ovčar. Bojenje toluidin plavim. Kratke nabore sinovijalne membrane čine 4-5 slojeva sinoviocita. U subintimi se uočava prisustvo krvnih sudova Bar 100µm. **F.** Sinovijalna membrana aleoralnog tipa. 12 godina star nemački ovčar. Bojenje toluidin plavim. Na prstolikim naborima sinovijalne membrane se nalazi 1-2 sloja ćelija. Prisustvo mastocita uočava se u subintimi oko krvnih sudova. Bar 100µm. Imunohistoemijsko bojenje CD44 molekula: **G.** Sinovijalna membrana fibroznog tipa. 5 godina star nemački ovčar Bar 50µm. **H.** Sinovijalna membrana adipoznog tipa. 12 godina star nemački ovčar. Kontrastirano sa hematoksilinom. Ekspresija CD44 molekula uočava se u citoplazmi sinoviocita intime sinovijalne membrane. Imunohistoemijsko bojenje CD44 molekula. Bar 50µm

7.14. *Imunohistochemijska analiza sinovijalne membrane*

Između mladih (G1 i G2) i starih pasa (G3 i G4) nije postojala razlika u ekspresiji CD44 molekula u SM. U intimi SM, on je ravnomerno eksprimiran u citoplazmi sinoviocita (slika 12G-H). Takođe, nije uočena razlika u distribuciji CD44 molekula između SM fibroznog (slika 12G) i adipoznog tipa (slika 12H).

8. DISKUSIJA

Najznačajni rezultati ove teze su vezani za 1) hondrogeni potencijal ćelija sinovijalne tečnosti dobijen *in vitro* i *in vivo*, 2) definisanje *in vitro* razlika vezanih za ćelije ST kod mladih i starih pasa i 3) definisanje razlika u morfologiji hrskavice kod ispitivanih grupa pasa. U odnosu na hondrogeni potencijal, u ovoj tezi je po prvi put opisan nalaz ostrvaca nalik hijalinoj hrskavici formiranih *in vitro* od umnoženih ćelija sinovijalne tečnosti kolenog zgloba pasa. Pokazano je da su te ćelije kod mladih pasa dovoljno potentne da se mogu primeniti u protokolima za reparaciju / regeneraciju hrskavice *in vivo* na modelu ksenotransplantacije imunodeficientnim miševima, dok se kod starih pasa isti tip ćelije ne može koristiti za tu namenu s obzirom na jasno ispoljene ćelijske znake starenja i jači osteogeni potencijal. U ovoj tezi su takođe definisane promene na zglobnoj hrskavici kod nehondrodistrofičnih pasa tokom starenja i dobijen je nalaz koji upućuje da umerena fizička aktivnost kod pasa utiče na očuvanje strukture hijaline hrskavice tokom starenja. Dobijeni rezultati ukazuju da se u budućim studijama može ispitivati efekat kombinacije ćelija izolovanih iz sinovijalne tečnosti i biomaterijala u cilju sanacije defekata hrskavice pasa.

8.1. Sinovijalna tečnost sadrži ćelije koje imaju karakteristike mezenhimalnih progenitorskih ćelija

Najznačajniji rezultat dobijen u vezi ispitivanja ST, je da ona sadrži ćelije koje više imaju karakteristike progenitorskih nego matičnih ćelija. Naime, ove ćelije su imale dobar hondrogeni potencijal, ali ne i adipogeni potencijal. Poređenjem sa drugim analizama koje su prethodno urađene u istoj laboratoriji, a koje ukazuju da ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba dece imaju dosta kraće vreme udvajanja u kulturi, došlo se do zaključka da ćelije izolovane iz sinovijalne tečnosti najverovatnije predstavljaju kombinaciju bipotentnih osteogenih i hondrogenih progenitora i unipotentnih hondrogenih progenitorskih ćelija.

Više od jedne petine pasa i dve trećine starih ljudi imaju neki oblik OA, koji se karakteriše u histološkom smislu oštećenjem hrskavice, gubitkom hondrocita i degradacijom komponenti ECM, pretežno kolagena tip II i PG/GAG. Hijalina hrskavica ima ograničen potencijal samoobnove i kada dođe do pojave OA mogućnosti lečenja su vrlo oskudne i uključuju primenu hirurških tehnika kojima se obezbeđuje stabilnost

zgloba, ukoliko je ona narušena, i primenu antiinflamatornih lekova i analgetika (*Brittberg i sar., 1994*). Nijedan od ovih tretmana ne dovodi do regeneracije hrskavice niti trajnog poboljšanja stanja pacijenta. Pas je model za istraživanje patogeneze OA, ali je on takođe i čest pacijent za terapiju OA. Jedan od predloženih savremenih terapijskih modaliteta za lečenje OA je intra-artikularna primena nediferenciranih MĆ ili MĆ već usmerenih ka hondrogenezi (*Portron i sar., 2013*).

Zanimljivo je da ST zdravih jedinki sadrži preko 90% mononuklearnih ćelija u koje spadaju limfocit, monocit i ćelije okruglastog oblika sa ekscentrično postavljenim jedrom slične makrofagama i ćelije nalik fibroblastima. Za dve poslednje populacije se smatra da predstavljaju sinoviocite koji se pod fiziološkim uslovima odlupljuju od SM, ali tačan mehanizam mobilizacije sinoviocita u ST još uvek nije jasno definisan. Koja je funkcija sinoviocita u ST tek počinje da se razjašnjava i nedavno objavljeni eksperimentalni podaci na svinjama, pacovima i kunićima ukazuju da se ćelije ST mogu direktno diferencirati u hondrocite i ćelije meniskusa kada se izazove oštećenje hrskavice ili meniskusa (*Smith., 2011, Hunziker i sar., 1996, Hunziker i sar., 1998; Hatsushika i sar., 2014, Horie i sar., 2009 i 2012*). Ovakvo istraživanje do sada nije urađeno na ćelijama ST pasa. Podaci o proliferativnom potencijalu i potencijalu za diferencijaciju ćelija ST pasa su vrlo oskudni i do danas je samo jedan rad objavljen o hondrogenom potencijalu ovih ćelija kod dva psa (*Krawetz i sar., 2012*).

S obzirom da se promene na zglobnoj hrskavici češće javljaju kod starijih pasa, jer se sa starošću povećava stepen rizika za nastanak OA, sa tog aspekta je interesantno utvrditi da li ćelije ST imaju ista svojstva kod mladih i starih jedinki. Iz tih razloga jedan od ciljeva ovog doktorata je bio da se *in vitro* okarakteriše potencijal za proliferaciju i diferencijaciju kao i fenotip ćelija izolovanih iz ST pasa i da se utvrdi da li postoje razlike i navedenim karakteristikama između pasa različitih starosnih kategorija.

8.1.1. Ćelije sinovijalne tečnosti mladih pasa brže proliferišu od ćelija starih pasa

In vitro ispitivanjem pokazano je da ćelije izolovane iz ST pasa imaju sposobnost da proliferišu tokom kultivacije. Jedna manja populacija ovih ćelija imala je sposobnost formiranja velikih kolonija (CFU-F) koje se sastoje od više hiljada ćelija, čime je direktno pokazano da pojedine ćelije imaju visok proliferativni potencijal. CFU-F test je jedini pravi način da se *in vitro* dokaže koji broj ćelija iz izolovane populacije

ima visok proliferativni potencijal. Dokazano je da jedna kolonija nastaje od jedne nediferencirane ćelije (*Friedenstein i sar., 1970*) i da je veličina kolonija u korelaciji sa stepenom primitivnosti ćelije od koje kolonija nastaje (*Ivanović i sar., 1999*).

Mnogobrojna istraživanja usmerena su na ispitivanje MMC, a ređe na ispitivanje progenitorskih ćelija. Vrlo je važno imati na umu da prave MC imaju sposobnost samoobnove koja bi mogla biti potvrđena tek posle serijske transplantacije željene ćelijske populacije (rev. *Kovačević Filipović, 2014*). Ova vrsta eksperimenta se u principu retko izvodi. Prilikom izrade ove doktorske disertacije nije testirana sposobnost samoobnove na ovakav način. Imajući to na umu, kao i prethodno objašnjenu činjenicu da je kod ispitivanih ćelija adipogeni potencijal bio veoma slab, ne možemo tvrditi da ispitivana populacija ćelija ispunjava sve uslove da bi bila okarakterisana kao populacija MMC, ali se može sa dosta sigurnosti tvrditi da je bogata unipotentnim hondrogenim progenitorskim ćelijama. Zapravo, može se prepostaviti da je svaka CFU-F ćelija jedan hondrogeni progenitor, odnosno da CFU-F populacija ST predstavlja unipotentne hondrogene progenitore.

Ukupna populacija ćelija dobijena kultivacijom svih adherentnih ćelija, mogla je da se umnožava jednakom brzinom (PDT) sve do šeste pasaže, posle čega su kulture prekidane jer se umnožavanje ćelija kod većine uzoraka zaustavljalo. Sposobnost formiranja kolonija nije opadala kod starijih pasa, ali je vreme udvajanja ćelija u kulturi kod mladih pasa bilo kraće u odnosu na stare pse, što ukazuje da sa starenjem opada sposobnost proliferacije ćelija iako se sam broj prisutnih progenitora nije promenio.

Vreme udvajanja ćelija kod mladih pasa iznosilo je u proseku 31.29 sati a kod starih pasa 46.48 sati što je značajno manje u poređenju sa našim predhodnim rezultatima dobijenim na ćelijama izolovanim iz zubne pulpe mlečnih zuba dece gde je prosečno vreme udvajanja ćelija u kulturi iznosilo 23.23 sata (*Debeljak Martačić i sar., 2013*). Takođe, CFU-F test je pokazao da prosečno 0.5 % ćelija izolovanih iz ST mladih i starih pasa mogu da formiraju kolonije, dok smo u prethodnom ispitivanju na ćelijama zubne pulpe dobili veću vrednost koja je iznosila 4% (*Debeljak Martačić i sar., 2013*). Ovi rezultati su u korelaciji sa pretpostavkom da ćelije u ST predstavljaju deskvamisane ćelije, odnosno ćelije odlupljene od intime SM bez visokog proliferativnog potencijala i sporim ćelijskim ciklusom. S obzirom da je naš sistem uzgajanja ćelija u kulturi bio poliklonalan, dobijeno vreme udvajanja ćelija u kulturi odražava prosek udvajanja svih ćelija u kulturi. Tvrdnja da smo u ovoj heterogenoj populaciji ćelija imali prave progenitore je zasnovana na činjenici da je u proseku 1 na 200 ćelija imala sposobnost

stvaranja kolonija i da je jedan broj ćelija imao sposobnost formiranja takozvanih velikih kolonija. U prilog svemu ovome stoji i činjenica da je veličina kolonija u pozitivnoj korelaciji sa primitivnom prirodom formiranih kolonija ćelija (*Ivanović i sar., 1999*). Sposobnost formiranja velikih kolonija i činjenica da je ekspanzija rasta iznosila 370 deoba za 9 dana podržavaju činjenicu da ST sadrži progenitorske ćelije sposobne za visok nivo proliferacije što je čini atraktivnim za dalja ispitivanja.

Zanimljivo je da ST goveda i ljudi takođe sadrži ćelije koje su okarakterisane kao progenitorske (*Matsukura i sar., 2013, Harvanova i sar., 2011, Jones i sar., 2008, Jones i sar., 2004*). Progenitorske ćelija sinovijalne tečnosti goveda (*Jones i sar., 2008*), imaju slično vreme udvajanja ćelija u kulturi kao i psi u ovoj studiji, ali je procenat ćelija sposoban da formira kolonije nešto manji (0.3%) u odnosu na pse u ovoj studiji. ST ljudi sadrži sličan procenat ćelija sposobnih da formiraju kolonije (oko 0.5%) kao i psi, međutim kod OA je uočeno da se ovaj procenat znatno povećava (*Matsukura i sar., 2013*). Sličan nalaz kod svih ispitivanih vrsta ukazuje na evolutivnu očuvanost i fiziološki značaj ovih ćelija u sinovijalnoj tečnosti.

8.1.2. Više od polovine ćelija sinovijalne tečnosti eksprimira CD90

Minimalni kriterijumi za karakterizaciju mezenimalnih matičnih ćelija, definisani pre osam godina, omogućavaju razlikovanje ćelija poreklom iz vezivnog tkiva od ćelija hematopoeze (*Dominici i sar., 2006*). Ovi kriterijumi pored adherentnosti za plastiku (hematopoetske ćelije nisu adherentne i rastu u suspenziji) i sposobnosti da se *in vitro* diferenciraju u najmanje tri različite linije (ka adipocitima, osteoblastima i hondrocitima) uključuju i ekspresiju površinskih markera: CD105, CD73 i CD90 i odsustvo ekspresije markera hematopoetskih ćelija (CD34) i leukocita (CD45).

U literaturi su podaci koji se odnose na površinske antigene MMĆ ST vrlo oskudni, a nedostaju i podaci o specifičnim ćelijskim markerima MMĆ pasa (tabela 6). Upravo iz ovog razloga, u ovom radu su analizirani i markeri koji se najčeće primenjuju prilikom ispitivanja ćelija poreklom iz sinovijalne tečnosti, a to su CD90 i CD34.

Tabela 6. Najčešće korišćeni markeri za karakterizaciju mezenhimalnih matičnih ćelija pasa

Tkivo	Marker	Reference
Sinovijalna tešnost	CD90	<i>Krawetz i sar., 2012</i>
Masno tkivo	CD90 CD90, CD44 CD90, CD44, CD73, CD105	<i>Reich i sar., 2012</i> <i>Martinello i sar., 2011</i> <i>Vieira i sar., 2010</i>
Kostna srž	CD90 CD90, CD105	<i>Reich i sar., 2012</i> <i>Csaki i sar., 2007</i>

Kako su izolovane ćelije bile CD34 negativne, jasno je da u kulturi nisu bili prisutne ni hematopoetske ni endotelne ćelije, koje mogu da eksprimiraju ovaj molekul. CD90 je jedan od najčešće korišćenih površinskih markera za karakterizaciju MMC ali je takođe ekprimiran i od strane drugih ćelija kao što su: neuroni, endotelne ćelije, T ćelije i mnoge druge. On interaguje sa integrinima, tirozin kinazom, faktorima rasta i citokinima regulišući na taj način adheziju, apoptozu, proliferaciju i migraciju ćelija (*Barker i sar., 2009*). Ipak, tačna uloga CD90 molekula na površini MMC i dalje nije potpuno ispitana. Šezdeset šest posto ćelija eksprimiralo je CD90 molekul dok 34 % nije. Razlog za ovu heterogenosti potiče od toga što su naše kulture bile poliklonske. Verovatno se tokom uzgajanja jedan procenat ćelija održao kroz deobu prekusorskih / progenitorskih ćelija sinoviocita tipa A ili B ili čak samih zrelih sinoviocita. Iako nije potvrđeno, smatra se da sinoviociti tipa A vode poreklo od monocita krvi, dok se za sinoviocite tipa B smatra da verovatno predstavljaju prave ćelije mezenhinskog porekla (*Smith, 2011*). Kao što je prethodno opisano, monociti krvi mogu poticati iz različitih matičnih/progenitorskih ćelija kostne srži i diferencirati se u makrofage ili čak fibroblaste (rev. *Kovačević Filipović., 2014*). Mi smo mogli samo da pretpostavimo da CD90 (-) ćelije potiču od sinoviocita tipa A a da CD90 (+) ćelije potiču od sinoviocita tipa B. Slično našim nalazima, kultura ćelija izolovanih iz ST ljudi sa reumatoidnim artritismom sadržala je dva tipa ćelija: fibroblastoidne CD90 (+) i makrofagama slične CD90 (-) i CD68 (+) (*Neidhart i sar., 2003*). Takođe je opisano da potencijal ka hondrogenezi zavisi od ekspresije CD90 markera i da CD90 (+) ćelije imaju spontani hondrogeni potencijal *in vitro*. To znači da ako populacija P/MĆ ima manji stepen

ekspresije CD90 markera imaće i smanjen potencijal ka hondrogenezi (*Krawetz i sar., 2012*). Iz nekog razloga, kod spontano nastalih OA promena, P/MĆ ST su sprečene da se spontano diferenciraju ka hondrocitima, što ukazuje da postoji inhibicija njihovog prirodnog mehanizma da se agregiraju i da ostvare međućelijsku komunikaciju. Sve navedeno ukazuje na to da iako obe vrste ćelija imaju mogućnost umnožavanja u kulturi, od velikog je interesa da se u samom startu odvoje CD90 (+) od CD90 (-) ćelija i da se ispituju njihove osobine ponaosob.

8.1.3. Ćelije sinovijalne tečnosti imaju visok hondrogeni potencijal

U ovoj studiji je pokazano da su pojedine ćelije sinovijalne tečnosti uzgajane u adipogenom medijumu bile sposobne da ispolje fenotip karakterističan za ćelije masnog tkiva, odnosno da deponuju masne kapi u svojoj citoplazmi, iako su ove kapi bile veoma sitne. U osteogenom medijumu, pojedine grupe ćelija su razvile osteoblastni fenotip akumuliranjem depozita kalcijuma, povećavanjem aktivnosti AP i ekspresijom osteogenih markera, odnosno, bile su osteokalcin pozitivne.

Generalno posmatrano, u našem sistemu uzgajanja ćelija u kulturi, adipogeneza je bila slabo indukovana, jer je samo mali broj ćelija ispoljavao fenotip karakterističan za masno tkivo. Slab adipogeni potencijal je takođe uočen kod MMĆ pasa izolovanih iz masnog tkiva verovatno zbog vrste medijuma koji je korišćen za adipogenezu (*Martinello i sar., 2011*).

Primenom različitih protokola za diferencijaciju, MMĆ se indukuju najčešće u pravcu osteogene, adipogene ili hondrogene diferencijacije. Iz tih razloga sastav medijuma za diferencijaciju je od najvećeg značaja. Na tržištu se nalaze gotovi kompletni medijumi različitih proizvođača kao i medijumi sa ili bez prisustva goveđeg fetalnog seruma za diferencijaciju ćelija koji zahtevaju dodatak faktora rasta. U dosadašnjim istraživanjima vezanim za diferencijaciju MMĆ pasa korišćeni su medijumi bez prisustva goveđeg fetalnog seruma sa dodatkom različitih suplemenata. Za osteogenu diferencijaciju najčešće su korišćeni: deksametazon, askorbat 2 fosfat, TGF- β i BMPs. Za hondrogenu diferencijaciju: deksametazon, askorbinska kiselina, TGF- β i ITS, a za adipogenu: deksametazon, IBMX, insulin, indometacin i izobutilmetil-ksantin (*Krawetz i sar., 2012, Reich i sar., 2012, Csaki i sar., 2007*). Ovako napravljeni medijumi imaju prednost u odnosu na gotove komercijalne medijume zato što je im je poznat tačan sastav. Kod gotovih komercijalnih medijuma, poput medijuma

koji je korišćen u našem sistemu uzgajanja ćelija sastav suplemenata nije poznat, a sam medijum je dizajniran za upotrebu na humanim ćelijama. Zbog toga u narednim studijama treba ispitati dejstvo različitih faktora rasta i suplementa, izvršiti optimizaciju ćelijske kulture za adipogenu diferencijaciju i potvrditi ili odbaciti hipotezu da ćelije ST imaju slab adipogeni potencijal. Sa druge strane, prema hijerarhijskom modelu *in vivo* i *in vitro* diferencijacije mezenhimalnih progenitora kostne srži adipogeni potencijal se prvi gubi a osteogeni poslednji (Muraglia i sar., 2000). Činjenica da su samo pojedine ćelije mogle da se preobrazu u adipocite i da se pojedine manje grupe ćelija preobrazu u osteoblaste, a da je aktivnost AP bila samo ne znatno jača kod ćelija uzgajanih u medijumu za diferencijaciju u odnosu na kontrolni medijum ukazuje da je ili veoma mali broj ćelija inicijalno bio multipotentan, ili da su samo pojedine ćelije zapravo bile monopotentni ili bipotentni progenitori ili prekursori adipocita i osteoblasta.

Nakon što je pokazano da ćelije izolovane iz ST imaju pojedine funkcionalne karakteristike MMC, odnosno prevažodno karakteristike progenitorskih ćelija, praćene su njihove karakteristike tokom starenja. Ćelije starijih pasa sporije proliferišu u kulturi, ali je i dalje očuvana njihova bipotentnost. Ćelije starijih pasa u osteogenom medijumu ispoljavaju visoku aktivnost AP koja ne pada ni nakon 10. dana kultivacije za razliku od mladih pasa i akumuliraju veće depozite kalcijuma od mladih. Ovakvi rezultati ukazuju da se sa starenjem pojačava potencijal ćelija ST ka osteogenezi.

Kada su ćelije ST uzgajane u hondrogenom medijumu u trodimenzionalnim uslovima, uspele su da se diferenciraju u pravcu hondrogeneze stvarajući matriks bogat sGAG i kolagenom tipa II koji je karakterističan za hijalinu hrskavicu. Ćelije mladih i starih pasa uzgajane u kontrolnom i u hondrogenom medijumu formirale su ECM veoma bogat sGAG ali su samo PMC mladih pasa formirale ostrvca u ECM veoma slična hijalinoj hrskavici, sačinjena od kolagena tipa II. Dosada u literaturi nije opisano formiranje ovakvih struktura, iako je nekoliko studija opisalo visok hondrogeni potencijal ćelija izolovanih iz ST u poređenju sa ćelijama masnog tkiva i kostne srži (Ando i sar., 2014, Ichinose i sar., 2010). Takođe je koncentracija sGAG dva puta veća u poređenju sa našim predhodnim rezultatima dobijenim na MĆ zubne pulpe (Debeljak Martačić i sar., 2014). Ovi nalazi zajedno sa podacima da sinovijalni hondromatozni noduli sadrže ćelije koje se spontano diferenciraju ka hondro i osteogenezi (Crawford i sar., 2006) i da je genska ekspresija hondrogenih progenitorskih ćelija i sinovijalnih ćelija usko povezana (Zhou i sar., 2014), ukazuje da SM i ST sadrže ćelije koje bi

mogle biti okarakterisane kao mezenhimalni hondro-osteogeni ili hondrogeni progenitori.

8.1.4. Mladi psi imaju veći broj ćelija u sinovijalnoj tečnosti koje nemaju znake starenja u odnosu na stare pse

Ispitivanjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze u ćelijama u trećoj pasaži, uočeno je da ćelije starih pasa ispoljavaju statistički značajno više markera starenja u odnosu na mlade pse.

Poznato je da usled dugotrajne kultivacije ćelija *in vitro*, neminovno, dolazi do promene u fenotipu ćelija koje počinju da ispoljavaju znake starenja: postaju veće, imaju više produžetaka i aktinskih stres filamenata i akumuliraju lizozomalni enzim SA- β -galaktozidazu (*Stenderup i sar., 2003, Mauney i sar., 2004*). Glavna karakteristika starenja ćelija u kulturi je usporavanje ćelijskih deoba i na kraju njihov potpuni prekid. Da bi se pokazalo da li ćelije u kulturi stare ili ne, najčešće se primenjuje citohemijska metoda za određivanje markera starenja, enzima SA- β -galaktozidaze. Ova metoda nije dovoljno precizna jer je semikvantitativna (*Yang i Hu., 2004*).

Ukoliko uzmemo u obzir tumačenje rezultata na osnovu intenziteta boje i promene u morfologiji ćelija možemo reći da su ćelije i starih i mladih pasa imale slab, srednje jak i jak intenzitet boje. Ćelije starijih pasa su takođe bile morfološki promenjenije, sa povećanjem broja pljosnatih ćelija bogatih dugačkim procesusima. Najveći procenat ćelija mladih pasa nije ispoljavao aktivnost ovog enzima i vrlo mali broj ćelija je imao jak intenzitet bojenja. Na skali intenziteta boje, ćelije mladih pasa su najviše ispoljile slab intenzitet bojenja. Nasuprot njima ćelije starih pasa su znatno više ekspimirale ovaj marker starenja.

U našem radu, pokazali smo da se kod starijih pasa produžava vreme udvajanja ćelija i da dolazi do akumuliranja veće količine lizozomalnog enzima β -galaktozidaze u odnosu na mlade pse što dovodi u pitanje mogućnost korišćenja ćelija pasa starijih preko 10 godina, koji po godinama starosti odgovaraju ljudima između 70 i 80 godina, u autologom tipu transplantacije. Ispoljavanje aktivnosti enzima β -galaktozidaze i kod mladih pasa u ranim pasažama (P3) može ići u prilog već gore pomenutoj pretpostavci da ćelije u ST predstavljaju deskvamisane ćelije sa usporenijim ćelijskim ciklusom, pa iz tih razloga u ranim pasažama ispoljavaju znake starenja. Ipak, vrlo je zanimljiv rezultat da nisu sve ćelije imale vidljivu aktivnost β -galaktozidaze. Pedeset posto ćelija

kod mladih pasa i 25 % ćelija kod starijih pasa nije imalo viljivu aktivnost β -galaktozidaze, što ukazuje da se ne odlupljuju samo ostarele ćelije već da je moguće da je prisutan i neki mehanizam kojim bi ćelije aktivno migrirale od sinovijalne membrane do mesta oštećenja hrskavice gde bi eventualno mogle da ispolje regenerativna ili reparativna svojstva važna za homeostazu hrskavice.

8.2. Hrkavica mladih i starih pasa ima uočljive morfološke razlike

Najznačajniji rezultat dobijen u vezi uticaja starenja na zglobnu hrskavicu jeste da starenje dovodi do: smanjenja debljine hrskavice tibije, hipertrofije hondrocita u površinskoj i srednjoj zoni femura i ekspresije kolagena tipa X u nekalcifikovanoj hrskavici femura i tibije. Iako je histološki i imunohistohemijski pregled hrskavice vršen u tom cilju, zbog činjenice da su ispitivani psi imali različite nivoe fizičke aktivnosti, ispitan i njen uticaj na hrskavicu tokom starenja pasa, ali ne i na MĆ.

Umerena fizička aktivnost ima pozitivan efekat na sve telesne funkcije, ali njen uticaj na zglobnu hrskavicu tokom starenja nije u potpunosti ispitan kod ljudi niti kod pasa. Ako fizička aktivnost ima pozitivan uticaj na hrskavicu, trebalo bi da prevenira razvoj degenerativnih promena tokom starenja. Međutim, negativan efekat bi mogao dovesti do većih degenerativnih promena ili do razvoja OA, usled strukturnih, molekularnih, celularnih i mehaničkih promena na zglobnoj hrskavici (*Smolders i sar., 2013, Sun., 2010*).

Međunarodno udruženje za proučavanje osteoartritisa (*OARSI*) preporučuje psa kao model za istraživanje OA čoveka zbog mnogih anatomskih i histoloških sličnosti sa hrskavicom čoveka, ali i zajedničkih patofizioloških osnova razvoja OA. Koleni zglob psa je po građi vrlo sličan građi kolenom zglobu čoveka. Njega čine: anteriorni (kranijalni) i posteriorni (kaudalni) krucijalni ligament, meniskusi sa pripadajućim ligamentima, patelarni ligamenti i masno jastuče. Jedina značajna razlika u građi kolenog zgloba pasa u odnosu na ljude je prisustvo intraartikularne tetive dugog ekstenzora prsta koja prelazi sa anterolateralne strane zgloba i prisustvo lateralne i medijalne sezamoidne kosti u glavi *m. gastrocnemius* u poplitealnoj regiji (*Cook i sar., 2010*).

Pas je vrsta koja živi u neposrednoj blizini ljudi, i neki od trendova savremenog društva, kao što su nedovoljna fizička aktivnost, prekomerno uzimanje kalorične hrane i produžavanje životnog veka se istovetno odražavaju na psa kao i na čoveka. Histološke

promene na hrskavici tokom starenja nisu detaljno istražene i ispitivanja koja opisuju fizičku aktivnost kao faktor rizika za nastanak OA tokom starenja kod pasa su retka. Psi, pretežno mladi biglovi, koriste se kao model za izazivanje OA: presecanje prednjeg ukrštenog ligamenta (*Bendele., 2001*), menisektomija (*Pond i Nuki., 1973*), ili uticaj različitih vrsta fizičkog opterećenja (*Haapala i sar., 1996, Kiviranta i sar., 1992*). Biglovi su hondrodistrofična rasa pasa (*Hansen., 1952*) i nedavno je objavljena detaljna studija o makroskopskim, mikroskopskim i biohemijskim promenama na intervertebralnom disku kod hondrodistrofičnih pasa (*Smolders i sar., 2013*). U ovoj studiji je dokazano da se kod hondrodistrofičnih rasa ranije javljaju degenerativne promene u *nucleus pulposus* vertebralnih diskova koje završavaju kalcifikacijom hrskavice. Upravo iz tih razloga, biglove ne treba uzimati kao model za proučavanje promena na hrskavici vezanih za starenje (*Cook i sar., 2010*). Nemački ovčari nisu hondrodistrofična rasa pasa (*Smolders i sar., 2013*) i zbog toga proučavanje histoloških promena na njihovoj hrskavici može da bude zanimljiv izvor podataka važnih za definisanje promena nastalih tokom procesa starenja. Nemački ovčari se koriste kao policijski i vojni psi (radni psi), ali su takođe popularni i kao kućni ljubimci (neradni psi) svuda u svetu, a u Sjedinjenim Američkim Državama predstavljaju najpopularniju rasu pasa. Fizičku aktivnost koju su imali radni psi u ovom istraživanju, u vidu svakodnevnih treninga i vežbi, se može definisati kao umerena dok je fizička aktivnost koju su imali vlasnički, neradni psi, bila varijabilna, jer aktivnosti u vidu šetnji, trčanja i igranja zavise od svakog vlasnika ponaosob. Obe vrste fizičke aktivnosti se mogu poistovetiti sa stepenom fizičke aktivnosti koja dominira u svakodnevnom životu većine pasa, odnosno predstavlja dobar osnov za procenu promena kod drugih jedinki iste vrste.

Na osnovu opšteg kliničkog, ortopedskog, neurološkog i radiološkog pregleda, kao i pregleda sinovijalne tečnosti potvrđeno je da ne postoji inflamacija u kolenom zglobu ni kod jedne grupe ispitivanih pasa. Jedino odstupanje od fizioloških karakteristika je zabeleženo u vezi povećanja količine sinovijalne tečnosti kod mladih i starih radnih pasa u odnosu na neradne mlade i stare pse. Povećanje količine sinovijalne tečnosti se dovodi u vezu sa pojavom OA, ali s obzirom na to da je kod ovih pasa pokazano da ne postoje OA promene, može se pretpostaviti da je to adaptivna reakcija organizma koja omogućava bolja mehanička i nutritivna svojstva zglobne hrskavice tokom pojačane fizičke aktivnosti. Do sada takav podatak nije opisan u literaturi.

Hrskavica tibije mladih pasa je deblja i ima veći broj ćelija u odnosu na hrskavicu femura. Ova pojava je opisana i kod mladih biglova (*Kiviranta i sar., 1987*). Mladi radni psi imaju veći broj i gustinu ćelija u nekalcifikovanoj hrskavici tibije u odnosu na mlade neradne pse, što ukazuje da fizička aktivnost verovatno stimuliše deobu hondrocita kod mladih jedinki.

Međunarodno udruženje za proučavanje osteoartritisa (OARSI) je preporučilo sistem za procenu histoloških promena na hrskavici pasa kod OA. Ovaj sistem nije u potpunosti mogao biti primenjen prilikom opisivanja promena na hrskavici tokom starenja, jer ne opisuje promene koje nastaju u ranoj fazi OA i degenerativnih procesa. Glavni nedostatak preporučenog sistema predstavlja nemogućnost procene smanjenja debljine hrskavice, jer OARSI sistem samo opisuje potpuni gubitak hrskavice kod najtežeg oblika OA u sklopu sa drugim promena potpune destrukcije hondrocita i hrskavičnog matriksa. S obzirom da osim smanjivanja debljine hrskavice nisu postojale druge promene na hondrocitima i ECM koje bi ukazivale na OA, a životinje klinički i radiološki nisu pokazivale znake OA, smanjivanje debljine hrskavice tibije može se tumačiti u sklopu početka razvoja degenerativnih promena nastalih usled starenja.

Smanjivanje debljine nekalcifikovane hrskavice tibije tokom starenja bila je jedna od najizraženijih uočenih promena. Kod ljudi je zabeleženo smanjivanje nekalcifikovane hrskavice femura vezano za proces starenja (*Hudelmaier 2001, Temple 2007*), kao i smanjivanje debljine kalcifikovane hrskavice kod jedinki starijih od 40 godina (*Hudelmaier 2001*). Do sada nema opisa u literaturi o smanjivanju debljine hrskavice tokom starenja kod pasa. Proučavanje uticaja fizičke aktivnosti na strukturne i funkcionalne karakteristike hrskavice dalo je različite rezultate među autorima. U eksperimentalnoj studiji izvedenoj na jedanaest pasa, podvrgnutih umerenoj fizičkoj aktivnosti tokom 10 godina, autori nisu uočili nikakvu razliku u debljini hrskavice tibije u odnosu na kontrolnu grupu pasa iste starosti, ali rezultati nisu poređeni sa rezultatima u odnosu na mlade pse (*Newton i sar., 1997*). Kod mladih biglova je dokazano da jako fizičko opterećenje dovodi do smanjivanja debljine nekalcifikovane hrskavice u medijalnom kondilusu femura za 6% (*Kiviranta i sar., 1992*). Dugotrajno fizičko opterećenje u vidu trčanja u trajanju od godinu dana, nije dovelo do promena u histološkom građi hrskavice, ali je postojalo omekšavanje lateralnog kondilusa femura i tibije (*Arokoski i sar., 1994*). Nasuprot ovim efektima fizičkog opterećenja kod pasa, kod mladih konja, naporno/teško fizičko opterećenje dovodi po povećanja debljine hrskavice (*Firth i sar., 2005*). Nedovoljna fizička aktivnost kod dece smanjuje debljinu

hrskavice za 22-25% u odnosu na čak blago fizički aktivnu decu (*Jones i sar., 2003*). Ovi podaci upućuju na zaključak da se kod mladih jedinki, može očekivati velika adaptaciona sposobnost na ekstremne uticaje mehaničkog opterećenja, dok starenje može biti dominantan faktor koji objašnjava smanjivanje debljine hrskavice tibije kod starih radnih i neradnih pasa.

Druga važna uočena promena vezana za starenje je **povećanje gustine hondrocita** u hrskavici tibije koje je bilo više izraženo kod starih radnih pasa u odnosu na stare neradne pse. Paralelno sa ovom pojavom, smanjivanje debljine hrskavice tibije je dovelo do **smanjivanja ukupnog broja hondrocita** kod starih pasa iz obe ispitivane grupe. Ovaj rezultat je u skladu sa opisanim promenama kod ljudi i kunića da broj hondrocita opada sa starenjem (*Buckwalter i sar., 1998, Barnett i sar., 1963, Loeser 2009*). Iako na osnovu rezultata ove studije mladi i stari radni psi imaju manje pojedinačnih hondrocita a više hondrocita koji se nalaze u formi izogenih grupa, ne može se zaključiti da fizička aktivnost utiče na broj hondrocita i da stimuliše njihovu deobu. U skladu sa tim, kod pasa (*Newton i sar., 1997*) i morskih prasadi (*Hyttinen i sar., 2001*) podvrgnuti dugotrajnom fizičkom opterećenju nisu zabeležene promene vezane za promenu broja hondrocita. Povećanje gustine hondrocita i smanjenje ukupnog broja hondrocita u hrskavici tibije može se objasniti nesrazmernim gubitkom ECM u odnosu na broj hondrocita.

Treća važna promena vezana za starenje je **hipertrofija hondrocita** površinske i srednje zone hrskavice femura. Hipertrofija hondrocita duboke zone vezana za starenje je već opisana kod ljudi (*Goyal i sar., 2012*) i smatra se karakteristikom degenerativnih procesa (*Buckwalter i sar., 1997a i 1997b*), što može biti faktor rizika za nastajanje OA. Poznato je da hipertrofični hondrociti ne reaguju na anaboličke citokine i da imaju izmenjenu sintetsku aktivnost jer stvaraju PG izmenje strukture sa kraćim lancima koji vezuju manju količinu vode (*Lammi i sar., 2002, Martin i sar., 1997 i 2000*). Analizom PG/GAG u srednjoj i dubokoj zoni nije uočena razlika između mladih i starih radnih i neradnih pasa. Pretpostavljamo da smanjenje broja hondrocita i moguće promene u strukturi i funkciji PG/GAG, čak i bez promena u safranin O bojenju koje bi dokazao njihov gubitak, mogu smanjiti sadržaj vode i doprineti smanjenju debljine hrskavice tibije. Još jedna uočena karakteristika vezana za starenje je pojava kružnih izogenih grupa u srednjoj zoni hrskavice femura. Ovaj tip distribucije ćelija je karakterističan za reakciju hrskavice na povrede i tipičan je za OA (*Cook, 2010*). S obzirom da je integritet hrskavice očuvan i da ne postoje fisure već samo blage undulacije uočene kod

pojedinih starih pasa, smatramo da je pojava takvih formacija posledica degenerativnih procesa a ne fizičke aktivnosti. Duplikacija zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice opisana je kod ljudi kao promena vezana za starenje (*Havelka i sar., 1984*) ali i pojavu OA (*Lane i sar., 1980*). Pretpostavlja se da duplikacija zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice dovodi do smanjivanja njene debljine (*Mori i sar., 1993*). Prema dobijenim rezultatima, duplikacija zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane zone može delimično da objasni smanjenje debljine hrskavice tibije jer je duplikacija uočena kod pojedinih starih pasa iz obe ispitivane grupe. Kod konja je takođe uočena duplikacija zone koja deli kalcifikovanu od nekalcifikovane hrskavice ali bez smanjenja debljine hrskavice tibije (*Muir i sar., 2008*) što može ukazivati da neki drugi faktori vezani za starenje utiču na smanjenje debljine hrskavice tibije kod starih radnih i neradnih pasa.

Imunohistohemijska analiza komponenti ECM femura i tibije potvrdila je da je kolagen tipa I eksprimiran samo u koštanom tkivu kod svih ispitivanih pasa, dok je kolagen tipa II bio homogeno distribuiran u nekalcifikovanoj hrskavici što je ukazivalo na očuvanost njenog integriteta. Kolagen tipa X je različito eksprimiran u kalcifikovanoj i nekalcifikovanoj hrskavici femura i tibije mladih i starih, radnih i neradnih pasa. Kod svih mladih pasa, kolagen tipa X je uočen samo u kalcifikovanoj zoni hrskavice. Ekspresija kolagena tipa X je karakteristična za hipertrofične hondroците i opisana je u fetalnoj (*Kirsch i sar., 1991*), adultnoj hrskavici i kod OA (*Goyal i sar., 2012*). Kod ljudi je sa starenjem uočena manja ekspresija kolagena tipa X nego kod pacijenata sa OA (*Goyal i sar., 2012, Hoyland i sar., 1991, von der Mark i sar., 1992*). Zanimljivo je da je kod mladih hondrodistrofičnih pasa uočena ekspresija kolagena tipa X u nekalcifikovanoj hrskavici i to uglavnom na mestima spajanja kolagena tipa II i u dubokoj zoni hrskavice (*Lane i sar., 1980*). Ova razlika u ekspresiji kolagena tipa X između mladih biglova i nemačkih ovčara verovatno leži u hondrodistrofičnoj prirodi njihove hrskavice. Dobro je poznato da ekspresija kolagena tipa X prethodi mineralizaciji hrskavice tokom endohondralnog okoštavanja, a hondrodistrofične rase imaju ranu mineralizaciju *nucleus pulposus*-a koji je odgovoran za ranu ekspresiju kolagena tipa X (*Itoh i sar., 2008*). Ovi rezultati ukazuju da je odabir rase vrlo važan parametar prilikom proučavanja histoloških promena na hrskavici.

Između starih radnih i neradnih pasa uočena je razlika u vezi ekspresije kolagena tipa X koja je pored kalcifikovane hrskavice bila izražena i u nekalcifikovanoj hrskavici. Kod starih neradnih pasa kolagen tipa X je bio eksprimiran u teritorijalnom

matriksu površinske, srednje i duboke zone hrskavice, dok je kod starih radnih pasa bio distribuiran u srednjoj i dubokoj zoni. S obzirom da hipertrofični hondrociti sintetiziraju kolagen tipa X, možemo da pretpostavimo da dugotrajna fizička aktivnost ima pozitivan uticaj na sintetsku aktivnost hondrocita površinske zone smanjujući ekspresiju kolagena tipa X. Izostanak ekspresije kolagena tipa X u površinskoj zoni nije u potpunosti jasan i objašnjiv, ali može se smatrati da je posledica pozitivnog efekta umerene fizičke aktivnosti koju su radni psi imali tokom svog radnog veka.

8.3. Sinovijalna membrana mladih i starih pasa nema uočljivih morfoloških razlika

Na osnovu histološke analize sinovijalne membrane (SM) mladih i starih kao i radnih i neradnih pasa nisu uočene promene koje narušavaju integritet i funkciju SM. Jedina razlika uočena sa starenjem je bila vezana za lokalno povećanje broja slojeva sinoviocita intime kratkih nabora i pojava mastocita u subintimi SM, što ne prevazilazi fiziološke karakteristike ovog tkiva. Fizička aktivnost je stimulisala povećanje broja dugih prstolikih nabora kod mladih i starih radnih pasa što se može dovesti u vezu sa adaptivnim odgovorom SM na fizičko opterećenje. Imunohistohemijskom analizom ekspresije molekula CD44 nisu uočene razlike između ispitivanih grupa. Histološka i IHH analiza dokazuje odsustvo inflamacije u SM i kolenom zglobu. Ipak, dalje ispitivanje sinovijalne membrane je od ključnog značaja za odgonetanje porekla ćelija koje imaju osobine mezenhimalnih progenitora, a koje su u ovoj tezi definisane kao unipotentni hondrogeni progenitori. Činjenica da se SM starijih pasa ne razlikuje od sinovijalne membrane mladih pasa, a da se ćelije u sinovijalnoj tečnosti po svojim funkcionalnim osobinama razlikuju, ukazuje da su neophodna dalja ispitivanja promena sinovijalne membrane sa starenjem koja bi mogla da ukažu na poreklo promena na samim ćelijama sinovijalne tečnosti.

9. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih analizom uzorkovanog materijala primenom navedenih metoda u izradi ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Sinovijalna tečnost pasa sadrži populaciju ćelija mezenhimalnog porekla koje mogu da formiraju kolonije fibroblasta, proliferišu i imaju slab adipogeni, dobar osteogeni i visok hondrogeni potencijal *in vitro*.
2. Visok hondrogeni potencijal navedenih ćelija se ogleda u spontanoj sintezi sulfatisanih glikozaminoglikana i kolagena tipa II koji predstavljaju osnovne komponente ekstracelularnog matriksa hijaline hrskavice.
3. Ispitivane ćelije *in vivo* zadržavaju dugotrajan hondrogeni potencijal što ih čini zanimljivim za dalja ispitivanja u cilju regeneracije hrskavice.
4. Ćelije izolovane iz sinovijalne tečnosti starijih pasa imaju produženo vreme udvajanja u kulturi, veći broj starih ćelija i povećan osteogeni potencijal u odnosu na ćelije izolovane iz sinovijalne tečnosti mladih pasa.
5. Na osnovu svih izloženih *in vitro* karakteristika može se pretpostaviti da sinovijalna tečnost pasa sadrži bipotentne i/ili opredeljene progenitore za osteoblaste i hondrocite.
6. Starenje dovodi do umerenih degenerativnih promena na hrskavici. Sa starenjem se smanjuje debljina hrskavice tibije, dolazi do hipertrofije hondrocita u površinskoj i srednjoj zoni i ekspresije kolagena tipa X u nekalcifikovanoj hrskavici. Ove promene mogu da stvore preduslov za razvoj degenerativnog osteoartritisa tokom starenja.
7. Fizička aktivnost ima pozitivan uticaj na očuvanje integriteta hrskavice tokom starenja. Fizička aktivnost smanjuje ekspresiju kolagena tipa X u površinskoj zoni hrskavice.

10. LITERATURA

1. Aigner T, Stöve J. Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003; 55(12):1569-93.
2. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol*, 2008; 18(3): 213-9.
3. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(5): 1522-32.
4. Ando W, Kutcher JJ, Krawetz R, Sen A, Nakamura N, Frank CB, Hart DA. Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy*, 2014; 16(6):776-88.
5. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2007; 28:5462-70.
6. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A*, 2008; 14(12):2041-9.
7. Aranda P, Agirre X, Ballestar E, Andreu EJ, Román-Gómez J, Prieto I, Martín-Subero JI, Cigudosa JC, Siebert R, Esteller M, Prosper F. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLoS One*, 2009; 4(11): 7809.
8. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003; 69:144-55.
9. Arokoski J, Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, Helminen HJ. Softening of the lateral condyle articular cartilage in the canine knee joint after long distance (up to 40 km/day) running training lasting one year. *Int J Sports Med*, 1994; 15: 254-60.
10. Barker TH, Hagood JS. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1793:921-3.
11. Barnett CH, Cochrane W, Palfrey AJ. Age Changes in articular cartilage of rabbits. *Ann Rheum Dis*, 1963; 22:389-400.
12. Becerra J, Andrades JA, Guerado E, Zamora-Navas P, López-Puertas JM, Reddi AH. Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010; 16(6):617-27.
13. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001; 1:363-76.
14. Bennett D, May C. Joint diseases of dogs and cats. *Ettinger SJ Feldman EC Textbook of veterinary internal medicine*. Saunders Philadelphia, 2002; 2032-77.

15. Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*, 2010; 21 :1057-66.
16. Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*, 2007; 40(3): 568-76.
17. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are Human and Mouse Satellite Cells Really the Same? *J. Histochem Cytochem*, 2010; 58(11): 941-955.
18. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994; 331(14):889-95.
19. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg*, 1997a; 79A:600–11.
20. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage II. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg*, 1997b; 79A:612–32.
21. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, 1998; 47:487-504.
22. Burgin LV, Aspden RM. Impact testing to determine the mechanical properties of articular cartilage in isolation and on bone. *J Mater Sci Mater Med*, 2008; 19(2):703-11
23. Bush PG, Pritchard M, Loqman MY, Damron TA, Hall AC. A key role for membrane transporter NKCC1 in mediating chondrocyte volume increase in the mammalian growth plate. *J Bone Miner Res*, 2010; 25(7):1594-1603.
24. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000; 14:183–8.
25. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 2011; 8 :11-5.
26. Ceron JJ, Eckersall PD, Martinez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Path*, 2005; 34(2):85-99.
27. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, Grimandi G, Guicheux J. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today*, 2009;14(19-20):913-25.
28. Conn MP. *Handbook of Models for Human Aging*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 2006.
29. Cook JL, Kuroki K, Visco D, Pelletier JP, Schulz L, Lafeber FP. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010; 18: S66-S79.
30. Crawford A, Frazer A, Lippitt JM, Buttle DJ, Smith T. A case of chondromatosis indicates a synovial stem cell aetiology. *Rheumatology (Oxford)*, 2006; 45(12):1529-33.
31. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry Cell Biology*, 2007; 128:507–520.
32. Dang Y, Cole AA, Homandberg GA. Comparison of the catabolic effects of fibronectin fragments in human knee and ankle cartilages. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003; 11(7):538-47.

33. Das S, Bonaguidi M, Muro K, Kessler JA. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus*, 2008; 24(3-4): E4.
34. de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 2000; 19(5): 389-94.
35. Debeljak Martačić J, Francuski J, Lužajić T, Vuković N, Mojsilović S, Drndarević N, Petakov M, Glibetić M, Marković D, Radovanović A, Todorović V, Kovačević Filipović M: Characterization of deciduous teeth stem cells isolated from crown dental pulp. *Vojnosanit Pregl*, 2014; 71:1-10.
36. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E, Linskens M, Rubeji I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92(20):9363–7.
37. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 14): 2971-81.
38. Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*, 2011; 37 :1074-80.
39. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 2006; 8:315–317.
40. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 2004; 117(Pt 6):889-97.
41. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 2002; 4(1):30-5.
42. Eyre DR, Matsui Y, Wu JJ. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*, 2002; 30(6): 844-8.
43. Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009; 15:75–86.
44. Fassler R., Schnegelsberg PN, Dausman J, Shinya T, Muragaki Y, McCarthy MT, Olsen BR, Jaenisch R. Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(11): 5070-4.
45. Felson DT. Identifying different osteoarthritis phenotypes through epidemiology. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010; 18(5):601-4.
46. Firth EC, Rogers CW. Musculoskeletal responses of 2-year-old thoroughbred horses to early training. 7. Bone and articular cartilage response in the carpus. *N Z Vet J*, 2005; 53:113-22.
47. Fortier LA, Travis AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther*, 2011; 23, 2(1):9
48. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970; 3(4): 393-403.

49. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976; 4(5): 267-74.
50. Friedenstein AJ, Lalykina KS. Thymus cells are inducible to osteogenesis. *Eur J Immunol*, 1972; 2(6): 602-3.
51. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968; 6(2): 230-47.
52. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966; 16(3): 381-90.
53. Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Clegg PD, Innes JF. Biomarkers of cartilage turnover. Part2: Non-collagenous markers, 2010; 185(1):43-9.
54. Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, Cao T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum*, 2006; 15;55(3):493-500.
55. Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, Cao T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum*, 2006; 55(3):493-500.
56. Ghadially FN, Roy S. Ultrastructure of rabbit synovial membrane. *Annals Rheum Dis*, 1966; 25 (4): 318–326.
57. Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, Von der Mark K. Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol*, 1996; 15(4): 231-8.
58. Gonczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008; 9(5): 355-66.
59. Goyal N, Gupta M, Gill DK. Analysis of collagen type II and X in ageing and osteoarthritic articular cartilage. *J Investig Biochem*, 2012; 1:12-6.
60. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998; 78(3): 783-809.
61. Guercio A, Di Marco P, Casella S, Cannella V, Russotto L, Purpari G, Di Bella S, Piccione G. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int*, 2012; 36 :189-94.
62. Haapala J, Lammi MJ, Inkinen R, Parkkinen JJ, Agren UM, Arokoski J, Kiviranta I, Helminen HJ, Tammi MI. Coordinated regulation of hyaluronan and aggrecan content in the articular cartilage of immobilized and exercised dogs. *J Rheumatol*, 1996; 23: 1586-93.
63. Haeusler G, Walter I, Helmreich M, Egerbacher M. Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation. *Calcif Tissue Int*, 2005; 76(5): 326-35.
64. Hansen HJ. A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog, with special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthop Scand*, 1952; 11:1–117.
65. Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, Koga H, Nakagawa Y, Tsuji K, Hishikawa S, Kobayashi E, Sekiya I. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal

- stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014; 22(7):941-50.
66. Havelka S, Horn V, Spohrová D, Valouch P. The calcified-noncalcified cartilage interface: the tidemark. *Acta Biol Hung*, 1984; 35: 271-9.
 67. Herthel DJ. Suspensory desmitis therapies. *Proc 12th ACVS Symp*, 2002: 165-167
 68. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, Sekiya I, Caroom CT, Prockop DJ, Thomas DB. Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am*, 2012; 94(8):701-12.
 69. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intraarticular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells*, 2009; 27:878–87.
 70. Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford RP, Grant ME, Freemont AJ. Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone Miner*, 1991; 15:151–63.
 71. Hudelmaier M, Glaser C, Hohe J, Englmeier KH, Reiser M, Putz R, Eckstein F. Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis Rheum*, 2001; 44:2556– 61.
 72. Hunziker EB, Kapfinger E. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br*, 1998; 80(1):144-50.
 73. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002; 10: 564–72.
 74. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*, 1996; 78:721–33.
 75. Hunziker EB. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001; 9:22–32.
 76. Hyttinen MM, Arokoski JP, Parkkinen JJ, Lammi MJ, Lapveteläinen TM, Mäntyselkä K, Király K, Tammi MI, Helminen HJ. Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001; 9:694-701.
 77. Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I. Morphological differences during *in vitro* chondrogenesis of bone marrow, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest*, 2010; 90:210-221.
 78. Itoh H, Asou Y, Hara Y, Haro H, Shinomiya K, Tagawa MJ. Enhanced type X collagen expression in the extruded nucleus pulposus of the chondrodystrophoid dog. *J Vet Med Sci*, 2008; 70:37-42.
 79. Ivanović Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, Cipolleschi MG, Milenkovic P, Praloran V, DelloSbarba P. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like)

- progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. *Stem Cells*, 1999; 17(4):219-25.
80. Jacobsen S, Niewold TA, Halling-Thomsen M, Nanni S, Olsen E, Lindegaard C, Andersen PH. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2006a; 110:325-30.
 81. Jacobsen S, Niewold TA, Kornalijnslijper E, Toussaint MJ, Gruys E. Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2005;104:21–31.
 82. Jacobsen S, Thomsen MH, Nanni S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am. J. Vet. Res*, 2006b; 67: 1738–1742.
 83. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespa DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002; 418(6893): 41-9.
 84. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 1993; 36:137-46.
 85. Jones E, Churchman SM, English A, Buch MH, Horner EA, Burgoyne CH, Reece R, Kinsey S, Emery P, McGonagle D, Ponchel F. Mesenchymal stem cells in rheumatoid synovium: enumeration and functional assessment in relation to synovial inflammation level. *Ann Rheum Dis*, 2010; 69:450–7.
 86. Jones EA, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, Corscadden D, Chapman T, Emery P, Hatton P, McGonagle D. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*, 2008; 58:1731–40.
 87. Jones G, Bennell K, Cicuttini FM. Effect of physical activity on cartilage development in healthy kids. *Br J Sports Med*, 2003; 37:382-3.
 88. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005; 7(4): 160-9.
 89. Kaplan JM, Youd ME, Lodie TA. Immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2011; 6 :297-316.
 90. Kim HJ, Delaney JD, Kirsch T. The role of pyrophosphate/phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. *Bone*, 2010; 47(3): 657- 65.
 91. Kirsch T, von der Mark K. Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. *Eur J Biochem*, 1991; 196:575-80.
 92. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Weight-bearing controls glycosaminoglycan concentration and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *Arthritis Rheum*, 1987; 30:901-8.
 93. Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Arokoski J, Säämänen AM, Helminen HJ. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. *Clin Orthop Relat Res*, 1992; 283:302-8.

94. Kjelgaard-Hansen M, Christensen MB, Lee MH, Jensen AL, Jacobsen S. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid from spontaneously diseased dogs with joint diseases or other conditions. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007; 117(3-4):296-301.
95. Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, Suzuki S, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther*, 2008; 10 (4):84.
96. Kovačević Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Lafarge X, Milenković P, Praloran V, Ivanović Z. Interleukin-6 (IL-6) and low O(2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol*, 2007; 212(1):68-75.
97. Kovačević Filipović M. The Blood is Rich in Different Types of Mesoderm Derived Stem and Progenitor Cells. *Acta veterinaria (Beograd)*, 2014; 64:156-178.
98. Krawetz RJ, Wu YE, Martin L, Rattner JB, Matyas JR, Hart DA. Synovial fluid progenitors expressing CD90+ from normal but not osteoarthritic joints undergo chondrogenic differentiation without micro-mass culture. *PLoS One*, 2012; 7(8):e43616.
99. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003; 423(6937):332-6.
100. Lammi PE, Lammi MJ, Hyttinen MM, Panula H, Kiviranta I, Helminen HJ. Site-specific immunostaining for type X collagen in noncalcified articular cartilage of canine stifle knee joint. *Bon*, 2002; 31, 690-6.
101. Lampe AK, Dunn DM, von Niederhausern AC, Hamil C, Aoyagi A, Laval SH, Marie SK, Chu ML, Swoboda K, Muntoni F, Bonnemann CG, Flanigan KM, Bushby KM, Weiss RB. Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *J Med Genet*, 2005; 42(2):108-20.
102. Lane LB, Bullough PG. Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 1980; 62:372-5.
103. Lesley J, Hyman R. CD44 structure and function. *Frontiers Biosci*, 1998; 3:616-30.
104. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005; 21:605-31.
105. Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fässler R, Lapveteläinen T, Kiraly K, Peltari A, Arokoski J, Lui H, Arita M. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev*, 1995; 9(22): 2821-30.
106. Loeser FR. Aging and Osteoarthritis: The role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009; 17:971-9.
107. Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J. Cell. Physiol*, 2000; 185:98–106.
108. Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab*, 2010 June; 21(6): 369–374.
109. Mao JR, Bristow J. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest*, 2001;107(9):1063-9.

110. Marhaug G., Hackett B, Dowton SB. Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse. *Clin. Exp. Immunol*, 1997; 107: 425-34.
111. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2008; 473(2):98-105.
112. Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys*, 1998; 350(1):61-71.
113. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 2002. 24(1): 91-8.
114. Martin JA, Buckwalter JA. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J*, 2001; 21:1-7.
115. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology*, 2000; 37:129-40.
116. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res*, 1997; 15:491-8.
117. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, Decaminada M, Patruno M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci*, 2011; 91:18-24.
118. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res*, 2014 May; 472(5):1357-64.
119. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V. Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials*, 2004; 25:3233-43.
120. McDonald TL, Larson MA, Mack DR, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2001; 83: 203-11.
121. McGonagle D, Jones E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. *Rheumatology (Oxford)*, 2008; 47:1114-6.
122. McKee CM, Lowenstein CJ, Horton MR, Wu J, Bao C, Chin BY, Choi AMK, Noble PW. Hyaluronan fragments induce nitric oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 1997; 272: 8013-18.
123. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. *J Clin Invest*, 1996; 98:2403-13.
124. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009; 20 :419-27.
125. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001; 226(6):507-20.

126. Mobasheri A, Bondy CA, Moley K, Mendes AF, Rosa SC, Richardson SM, Hoyland JA, Barrett-Jolley R, Shakibaei M. Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2008; 200:1-84.
127. Mori S, Harruff R, Burr DB. Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Arch Pathol Lab Med*, 1993; 117:196-8.
128. Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*, 2008; 47 :1137-43.
129. Muir P, Peterson AL, Sample SJ, Scollay MC, Markel MD, Kalscheur VL. Exercise-induced metacarpophalangeal joint adaptation in the Thoroughbred racehorse. *J Anat*, 2008; 213:706-17.
130. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci*, 2000; 113 (7):1161–66.
131. Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*, 2003; 48(7):1873-80.
132. Newton MP, Mow CV, Gardner RT, Buckwalter AJ, Albright PJ. The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. *Am J Sports Med*, 1997; 25:282-7.
133. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)*, 1998; 94(5):549-55.
134. Ortega N, Wang K, Ferrara N, Werb Z, Vu TH. Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Model Mech*, 2010; 3(3-4): 224-35.
135. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005; 40(4): 229-42.
136. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*, 1961; 43B:752-7.
137. Perera JR, Jaiswal PK, Khan WS. The potential therapeutic use of stem cells in cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012; 7(2):149-56.
138. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284(5411): 143-7.
139. Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis*, 1973; 32:387-8.
140. Portron S, Merceron C, Gauthier O, Lesoeur J, Sourice S, Masson M, Fellah BH, Geffroy O, Lallemand E, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C. Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One*, 2013; 8(4):e62368.

141. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009; 15(1): 29-41.
142. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells-a comparative study. *Vet Res Commun*, 2012;36(2):139-48.
143. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001; 98(9):2615-25.
144. Roegiers F, Jan YN. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 2004; 16(2):195-205.
145. Saari H. Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate. *Ann Rheum Dis*, 1991; 50:389-392.
146. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 2001; 33(3): 738-50.
147. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Ageing Aging of mesenchymal stem cells. *Res Rev*, 2006 Feb; 5(1):91-116.
148. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*, 2011;10(1):146-52.
149. Smith MD. The Normal Synovium. *The Open Rheumatology Journal*, 2011; 5(Suppl 1:M2):100-6.
150. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150:76-85. Erratum in: *Anal Biochem*, 1987; 163:279.
151. Smolders LA, Bergknut N, Grinwis GC, Hagman R, Lagerstedt AS, Hazewinkel HA, Tryfonidou MA, Meij BP. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. *Vet J*, 2013; 195:292-9.
152. Sommarin Y, Larsson T, Heinegard D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res*, 1989; 184(1): 181-92.
153. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003; 33:919-26.
154. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*, 2008; 129:163-73.
155. Sun HB. Mechanical loading, cartilage degradation and arthritis. *Ann NY Acad Sci*, 2010; 1211: 37-50.
156. Swoboda B, Pullig O, Kirsch T, Kladny B, Steinhäuser B, Weseloh G. Increased content of type-VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage: quantitation by inhibition ELISA. *J Orthop Res*, 1998; 16(1): 96-9.
157. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126(4):663-76.

158. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011; 8(2):177-87.
159. Temple MM, Bae WC, Chen MQ, Lotz M, Amiel D, Coutts RD, Sah RL. Age- and site-associated biomechanical weakening of human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007; 15:1042-52.
160. Theise ND. Stem cell plasticity: recapping the decade, mapping the future. *Exp Hematol*, 2010; 38(7):529-39.
161. Turnpenny L, Spalluto CM, Perrett RM, O'Shea M, Hanley KP, Cameron IT, Wilson DI, Hanley NA. Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2006; 24(2): 212-20.
162. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(26): 14720-5.
163. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*, 2005; 100(1): 12-27.
164. Vallon R, Freuler F, Sta-Tsedu N, Robeva A, Dawson J, Wenner P, Engelhardt P, Boes L, Schnyder J, Tschopp C, Urfer R, Baumann G. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 2001; 166:2801-7.
165. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*, 1991 Oct;5(13):2814-23.
166. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002: 369-91.
167. Verzijl N, De Groot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2000; 275(50): 39027-31.
168. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*, 2010; 19(3):279-89.
169. Villiers E, Blackwood L: *BSAVA manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. Second edition, BSAVA, 2006
170. Vindigni V, Michelotto L, Lancerotto L, Puppa AD, D'Avella D, Abatangelo G, Cortivo R, Zavan B. Isolation method for a stem cell population with neural potential from skin and adipose tissue. *Neurol Res*, 2009; Aug 5.
171. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 1992; 35:806-11.
172. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 2004; 116(5): 639-48.
173. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*, 2007; 3(4): 239-48.

174. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985; 228:1324-26.
175. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 318(1-2): 10-4.
176. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000; 61(4): 364-70.
177. Yang NC, Hu ML. A fluorimetric method using fluorescein di-beta-D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated beta-galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Anal Biochem*, 2004; 325(2):337-43.
178. Zhou C, Zheng H, Seol D, Yu Y, Martin JA. Gene expression profiles reveal that chondrogenic progenitor cells and synovial cells are closely related. *J Orthop Res*, 2014; 32(8):981-8.
179. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002; 13(12): 4279-95.

11. PRILOG

Tabela 7. Ukupna debljina i gustina ćelija (broj ćelija po mm²) kalcifikovane i nekalcifikovane hrskavice femura i tibije, ukupan broj ćelija po vertikalnom preseku (širine 1000µm) nekalcifikovane hrskavice femura i tibije, i površina hondrocita (µm²).

Grupa	G1	G2	G3	G4	ANOVA
Debljina ne kalcifikovane hrskavice µm					
Femur	539.8±265.4	696.6±172.2	595.5±411.2	503.3±127.1	0.777
Tibia	1196.9±119.2 c‡,d‡	1317.4±381.4 c‡,d‡	502.9±153.4 ^a ‡,b‡	547.7±146.1 ^a ‡,b‡	0.000
Debljina kalcifikovane hrskavice µm					
Femur	137.9±53.6	136.0±35.5	155.0±72.7	123.4±49.7	0.752
Tibia	105.8±13.1	163.6±41.0	125.3±41.2	157.9±117.2	0.419
Gustina ćelija ne kalcifikovane hrskavice (broj ćelija po mm²)					
Femur	1219.7±183.2	831.8±290.2	1230.2±716.8	841.8±377.9	0.363
Tibia	740.5±19.9	658.0±215.5 ^{c*}	1379.5±623.1 d*	1276.2±300.3	0.019
Gustina ćelija kalcifikovane hrskavice (broj ćelija po mm²)					
Femur	1827.6±982.0 d*	1220.9±345.5	1337.3±546.7	641.4±371.6 a*	0.023
Tibia	1165.8±270.9	1099.3±123.0	1532.1±478.7	1124.8±257.0	0.065
Ukupan broj ćelija po vertikalnom preseku (širine 1000µm)					
Femur	700.3±74.5	644.8±112.8	643.9±113.4	551.5±126.0	0.216
Tibia	859.3±80.9 ^{d*}	732.2±100.2	643.3±201.8	540.5±147.2 ^a *	0.037
Površina hondrocita µm²					T test
	G1 i G2		G3 i G4		
FSZ [◊]	61.89±7.88 ^{c*}		75.63±25.10		0.040
TSZ ^{◊◊}	64.00±14.22		74.58±36.77		0.285
FIZ [°]	124.11±16.72 ^{c‡}		168.63±29.28		0.000
TIZ ^{°°}	136.00±10.84		147.79±31.25		0.155
FDZ [*]	161.89±50.14		176.68±37.19		0.445
TDZ ^{**}	156.56±21.41		160.37±52.35		0.787

Da bi se uporedila srednja vrednost numeričkih varijabli između grupa urađena je One-way analiza varijanse (ANOVA) i Tukey post hoc test. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (X ± SD).

◊Površinska zona femura, ◊◊ Površinska zona tibije, °Srednja zona femura, °° Srednja zona tibije, *Duboka zona femura, **Duboka zona tibije.

^aU odnosu na mlade radne pse (G1), ^bU odnosu na mlade neradne pse (G2), ^cU odnosu na stare radne pse (G3), ^dU odnosu na stare neradne pse (G4), ^eMladi radni (G1) i mladi neradni (G2) psi u odnosu na stare radne (G3) i stare neradne pse (G4), * $-P < 0.05$; † $-P < 0.01$; ‡ $-P < 0.001$.

BIOGRAFIJA

Jelena V. Francuski je diplomirala 2008. godine na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (FVMUB), sa prosečnom ocenom 8,52.

U okviru TEMPUS programa za međunarodnu saradnju, 2006. godine je provela tri meseca na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Bolonji, Italija. 2010. godine je u organizaciji Odeljenja za poljoprivredu, pri ambasadi SAD u Beogradu završila Kurs za dobrobit životinja.

Doktorske akademske studije je upisala 2009. godine na FVMUB i sve ispite položila sa prosečnom ocenom 9,63. Doktorsku disertaciju je prijavila 2012 godine. Od 2011. godine istraživač je na projektu broj 175061 pod nazivom *Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja* koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije. 2011. godine je bila u radnoj poseti Kliničkoj hematološkoj i biohemijskoj laboratoriji i Laboratoriji za matične ćelije FVM u Bolonji. Član je tima međunarodnog evropskog projekta COST MP 1005 pod nazivom *Nano i makro biomaterijali (dizajn, obrada, karakterizacija, modeliranje) i aplikacija matičnih ćelija u regenerativnoj ortopedskoj i stomatološkoj medicini (NAMABIO)*. U okviru tog projekta 2012. godine provela je dva meseca u Centru za osteoartikularni i dentalni tkivni inženjering, LIOAD, INSERM U791, Univerziteta u Nantu, Francuska. Od 2012. godine je član srpskog tima bilateralnog međunarodnog projekta Pavle Savić pod nazivom *Evaluacija i primena mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz sinovijalne tečnosti psa za terapiju osteoartritisa*.

Od aprila 2014. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za Patološku fiziologiju FVMUB. Koautor je 5 radova objavljenih u međunarodnim časopisima i većeg broja radova saopštenih na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Radovi u poslednje dve godine su u direktnoj vezi sa problematikom predložene doktorske disertacije i odnose se na biologiju matičnih ćelija, regenerativnu medicinu i ispitivanje inflamacije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Француски

број уписа __14/3__

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

***Ex vivo* карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из
синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10.10.2014

Jelena Francuski

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Француски

Број уписа 14/3

Студијски програм Клиничка патологија и терапија животиња

Наслов рада

Ex vivo карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости _____

Ментор др Милица Ковачевић Филиповић венредни професор Факултета ветеринарске медицине у Београду _____

Потписани Јелена Француски

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10. 10. 2014

Jelena Francuski

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

***Ex vivo* карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из**

синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.10.2014.


Jelena Tomuski

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.