

# Uloga polimorfizama gena proupalnih citokina IL-1 i IL-17 u primarnom osteoartritisu koljena i kuka

---

Jotanović, Zdravko

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:121308>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zdravko Jotanović**

**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA PROUPALNIH CITOKINA IL-1 I IL-17 U**  
**PRIMARNOM OSTEOARTRITISU KOLJENA I KUKA**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2013.**

Mentori rada:

Prof. dr. sc. Zlatko Dembić, dr. med.

Prof. dr. sc. Branko Šestan, dr. med., spec. ortoped, subspec. dječje ortopedije

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u  
sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

5. \_\_\_\_\_

Rad ima 153 listova.

UDK: \_\_\_\_\_

Doktorski rad je izrađen pri Klinici za ortopediju Lovran, Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Referentnom centar za bolesti i ozljede koljenog zgloba Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske.

Istraživanje je provedeno pri:

1. Klinici za ortopediju Lovran, Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Referentnom centar za bolesti i ozljede koljenog zgloba Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, Hrvatska
2. Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Katedre za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska
3. Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Hrvatska
4. Imunogenetskom odjelu, Zavoda za oralnu biologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu, Norveška

Zahvaljujem se:

**Prof. dr. sc. Zlatku Dembiću, dr. med.**, mom mentoru, koji me uveo u osnove znanstvenog promišljanja i potaknuo moj interes ka istraživanju, na savjetima, podršci i pomoći pri osmišljavanju i provođenju ovog istraživanja te na pomoći tijekom izrade Doktorskog rada. Specifično se to odnosi na vođenje kroz Doktorski studij „Biomedicina” pri Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci, praćenju mojeg rada i izvršavanja obveza tijekom Doktorskog studija „Biomedicina” pri Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na usmjeravanje u istraživanju i procjeni mojeg napretka, na sudjelovanju prilikom izrade koncepcije i dizajna istraživanja, na edukaciji i nadzoru

prilikom rada s uzorcima humanog porijekla od strane ispitivane i kontrolne skupine uključene u ovo istraživanje te prilikom izvođenja genetskih analiza izolirane genomske DNA u laboratoriju Imunološkog odjela, Zavoda za oralnu biologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu, Norveška, na sudjelovanju prilikom prikupljanja, analize i interpretacije rezultata istraživanja, na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na kritičnoj reviziji i značajnom intelektualnom doprinosu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na završnom odobrenju verzije izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata koji su objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contentsu (CC), na kritičnoj reviziji prilikom izrade prijave teme Doktorskog rada, na kritičnoj reviziji prilikom izrade računalne prezentacije koja odgovara prijavi teme Doktorskog rada, na kritičnoj reviziji prilikom izrade Doktorskog rada te na kritičnoj reviziji prilikom izrade računalne prezentacije koja odgovara obrani Doktorskog rada.

**Prof. dr. sc. Branku Šestanu, dr. med., spec. ortoped, subspec. dječje ortopedije,** mom mentoru, predstojniku Klinike za ortopediju Lovran i pročelniku Katedre za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, na poticaju i omogućavanju provođenja ovog istraživanja te na pomoći tijekom izrade Doktorskog rada. Specifično se to odnosi na vođenje kroz Doktorski studij „Biomedicina” pri Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na praćenje mojeg rada i izvršavanja obveza tijekom Doktorskog studija „Biomedicina” pri Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na usmjeravanje u istraživanju i procjeni mojeg napretka, na sudjelovanju prilikom izrade koncepcije i dizajna istraživanja, na edukaciji i nadzoru prilikom odabira bolesnika uključenih u ovo istraživanje, kreiranja kliničkih i

radioloških kriterija za postavljanje dijagnoze te kreiranja kriterija za uključivanje i isključivanje ispitanika u ovo istraživanje, na edukaciji i nadzoru prilikom uzimanja i pohranjivanja uzoraka humanog porijekla od strane ispitanika uključenih u ovo istraživanje, na sudjelovanju prilikom prikupljanja, analize i interpretacije rezultata istraživanja, na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na kritičnoj reviziji i značajnom intelektualnom doprinosu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na završnom odobrenju verzije izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata koji su objavljeni u časopisima indeksiranim u CC, na kritičnoj reviziji prilikom izrade prijave teme Doktorskog rada, na kritičnoj reviziju prilikom izrade računalne prezentacije koja odgovara prijavi teme Doktorskog rada, na kritičnoj reviziji prilikom izrade Doktorskog rada te na kritičnoj reviziji prilikom izrade računalne prezentacije koja odgovara obrani Doktorskog rada.

**Prof. dr. sc. Biserki Mulac-Jeričević, dipl. ing. kemije,** na praćenju mojeg rada i izvršavanju obveza tijekom Doktorskog studija „Biomedicina” pri Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Rijeci te usmjeravanja u istraživanju, na edukaciji i nadzoru prilikom uzimanja i pohranjivanja uzoraka humanog porijekla od strane ispitanika uključenih u ovo istraživanje, ali i tijekom izolacija genomske DNA iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze, na sudjelovanju prilikom prikupljanja, analize i interpretacije rezultata istraživanja, na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na kritičnoj reviziji i značajnom intelektualnom doprinosu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na završnom odobrenju verzije izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata koji su

objavljeni u časopisima indeksiranim u CC, na kritičnoj reviziji prilikom izrade prijave teme Doktorskog rada te na kritičnoj reviziji prilikom izrade računalne prezentacije koja odgovara prijavi teme Doktorskog rada.

**Prof. dr. sc. Sanji Balen, dr. med., spec. transfuzijske medicine,** predstojnici Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, na edukaciji i nadzoru prilikom uzimanja i pohranjivanja uzoraka humanog porijekla od strane kontrola uključenih u ovo istraživanje, na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na kritičnoj reviziji i značajnom intelektualnom doprinosu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja te na završnom odobrenju verzije izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata koji su objavljeni u časopisima indeksiranim u CC.

**Doc. dr. sc. Radovanu Miheliću, dr. med., spec. ortopedu,** na poticaju i omogućavanju provođenja ovog istraživanja, na sudjelovanju prilikom izrade koncepcije i dizajna istraživanja, na edukaciji i nadzoru prilikom odabira bolesnika uključenih u ovo istraživanje, kreiranja kliničkih i radioloških kriterija za postavljanje dijagnoze te kreiranja kriterija za uključivanje i isključivanje ispitanika u ovo istraživanje, na sudjelovanju prilikom prikupljanja, analize i interpretacije rezultata istraživanja, na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja, na kritičnoj reviziji i značajnom intelektualnom doprinosu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja te na završnom odobrenju verzije

izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata koji su objavljeni u časopisima indeksiranim u CC.

**Tamari Nikolić, dipl. ing. kemije**, na pomoći pri radu u laboratoriju Zavoda za fiziologiju i imunologiju, Katedre za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a prilikom uzimanja i pohranjivanja uzoraka humanog porijekla od strane ispitanika uključenih u ovo istraživanje, ali i tijekom izolacija genomske DNA iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze te na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja.

**Dr. sc. Godfrey Essien Etokebe, profesoru biologije i Marikken Heiland Kaarvatn, studentici medicine**, na pomoći pri radu u laboratoriju Imunogenetskog odjela, Zavoda za oralnu biologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu, Norveška, a prilikom rada s uzorcima humanog porijekla od strane ispitivane i kontrolne skupine uključenih u ovo istraživanje te prilikom izvođenja genetskih analiza izolirane genomske DNA, na sudjelovanju prilikom prikupljanja, analize i interpretacije rezultata istraživanja te na koautorstvu prilikom pisanja izvornih znanstvenih radova iz područja doktorata, a na temelju provedenog istraživanja.

Kompletnom **osoblju Kliničkog odjela za anesteziju i intenzivnu skrb Klinike za ortopediju Lovran** na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka periferne venske krvi ispitanika uključenih u ovo istraživanje.



Kolegama **Tomislavu Aniću, dr. med., spec. ortopedu**, (Specijalna bolnica za ortopediju i opću kirurgiju Dr. Nemeč), **Vedranu Ćurkoviću, dr. med., spec. ortopedu**, (Opća bolnica Karlovac), **Hrvoju Jurkoviću, dr. med., spec. ortopedu**, (Opća bolnica Vukovar), **Danijelu Lopcu, dr. med., spec. ortopedu**, (Opća bolnica Gospić), **Tomislavu Mađareviću, dr. med., spec. ortopedu**, (Klinika za ortopediju Lovran), **Nikoli Matejčiću, dr. med., spec. ortopedu**, (Klinika za ortopediju Lovran), **Hrvoju Mokroviću, dr. med., spec. ortopedu**, (Klinika za ortopediju Lovran), **Domagoju Perkoviću, dr. med., spec. ortopedu**, (Specijalna bolnica za ortopediju i opću kirurgiju Dr. Nemeč), **dr. sc. Ivanu Rakovcu, spec. ortopedu**, (Klinika za ortopediju Lovran) i **Andrej Zecu, dr. med., spec. ortopedu**, (Klinika za ortopediju Lovran) koji su mi, prilikom obavljanja specijalističkog staža tijekom specijalizacije iz ortopedije pri Klinici za ortopediju Lovran, pomogli u prikupljanju suglasnosti i potpisivanju informiranog pristanka od svakog ispitanika uključenog u ovo istraživanje, a nakon pročitane „Obavijesti za ispitanika“, da se uslijed dijagnostičkih ili terapijskih postupaka uzeta periferna venska krv može koristiti u znanstvene svrhe.

**Mirjani Pauletić**, arhivaru medicinske dokumentacije pri Klinici za ortopediju Lovran, na pomoći prilikom prikupljanja podataka iz medicinske dokumentacije o ispitanicima uključenim u ovo istraživanje.

Na kraju, ali po značaju za mene i za sve ono što sam postigao tijekom života na prvom mjestu, zahvaljujem se **supruzi Suzani, sinu Janu** i roditeljima **Radmili i Zdravku**, na neizmjernej potpori, ljubavi, brizi i pažnji tijekom svih proteklih godina mog života.

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja.** Osteoartritis (OA) je česta bolest zglobova sa višestrukim genetskim rizikom. Genetska predispozicija za nastanak kompleksnih nasljednih bolesti kao što je OA velikih zglobova (kuka i koljena) uključuje interleukin-1 obitelj gena (IL1) na kromosomu 2. Također, jedan od lokusa koji mogu pogodovati razvoju OA nalazi se na kromosomu 6 (6p12.3-q13). U blizini ovog lokusa je gen koji kodira interleukin-17A (IL-17A). Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su: 1) utvrditi polimorfizme gena koji kodiraju interleukin-1 (IL-1) i IL-17 u ispitanika s uznapredovalim oblikom primarnog OA (POA) koljena i kuka kojima je ugrađena totalna endoproteza (TEP) kuka, odnosno parcijalna endoproteza (PEP) ili TEP koljena i usporediti s kontrolnom skupinom iz hrvatske populacije dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK), 2) istražiti značaj povezanosti rizika za razvoj POA koljena i kuka i frekvencija dodatnih polimorfnih markera za IL1 regiju [IL1A (rs1800587, C-889T) i IL1B (rs1143634, C+3954T)] kao i za IL17 gen, odnosno IL17A (rs2275913, G-197A), 3) ispitati da li su frekvencije genskih polimorfizma IL1A (rs1800587, C-889T), IL1B (rs1143634, C+3954T) i IL17A (rs2275913, G-197A) povezane s povećanim rizikom za nastanak POA koljena i kuka te 4) proširiti istraživanje uvođenjem rezultata prethodnog istraživanja s dva polimorfna markera za IL1 regiju [IL1B (rs16944, G-511A) i IL1RN varijabilni broj tandemskih ponavljanja (od engl. *Variable Number Tandem Repeat - VNTR*)] kako bi se definirao prošireni haplotip (IL1A C-889T, IL1B C+3954T, IL1B G-511A i IL1RN VNTR) i usporedio s predispozicijom za nastanak bolest(i).

**Ispitanici i metode.** Koristeći studiju slučajeva i kontrola s 500 bolesnika koji boluju od uznapredovalog oblika POA (260 bolesnika s OA kuka kojima je ugrađena TEP kuka i 240 bolesnika s OA koljena kojima je ugrađena PEP ili TEP koljena), analizirane

su frekvencije polimorfizama IL1 obitelji gena u hrvatskoj populaciji. Kontrolnu skupinu čini 531 osoba od kojih su većina zdravi DDK. Genotipizirana su dva polimorfizma jednog nukletioda (od engl. *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) u IL1 obitelji gena na poziciji IL1A (-889, C>T, rs1800587) i IL1B (+3594, C>T, rs1143634) te su njihove frekvencije uspoređene između bolesnika i kontrola. Haplotipovi su predviđeni kombiniranjem dobivenih rezultata i postojećih rezultata iz prethodnih vlastitih istraživanja s dva polimorfna markera za IL1 regiju: IL1B (-511, G>A, rs16944) i IL1RN (VNTR), kako bi se definirao prošireni haplotip [IL1A(rs1800587) - IL1B(rs1143634) - IL1B(rs16944) - IL1RN(VNTR)] i usporedio s predispozicijom za nastanak bolesti u istoj populaciji. Nadalje, genotipiziran je SNP -197 (G>A, rs2275913) IL17A gena u ukupno 358 bolesnika s uznapredovalim oblikom POA (186 bolesnika s OA koljena kojima je ugrađena PEP ili TEP koljena i 172 bolesnika s OA kuka kojima je ugrađena TEP kuka) te 136 zdrava DDK kao kontrolne skupine. Frekvencije alela genskog polimorfizma na poziciji -197G>A IL17A gena su otkrivene Taqman metodom.

**Rezultati.** Analiza haplotipova otkrila je spolne nejednakosti i pokazala da osobe ženskog spola koje su nosioci 1-2-1-1 haplotipa imaju 6 puta manji rizik za nastanak OA koljena, dok osobe istog spola koje su nosioci 1-1-1-2 haplotipa imaju preko 2 puta veću predispoziciju za nastanak OA kuka. Nadalje, genotipiziranjem SNP -197 (G>A, rs2275913) IL17A gena nisu pronađene razlike između alelnih i genotipskih frekvencija između bolesnika i kontrola.

**Zaključci.** Upalni medijatori, kao što je IL-1, mogu imati ulogu u patogenezi POA velikih zglobova, kao i da još neidentificirani specifični spolni čimbenik postoji u hrvatskoj populaciji koji determinira predispoziciju za nastanak POA velikih zglobova. Ovo je prva studija koja je odvojila spolove u procjeni genskog rizika IL1 lokusa za

nastanak POA. Ovim istraživanjem nije pronađena značajna povezanost frekvencije genskog polimorfizma IL17A (rs2275913, G-197A) s povećanim rizikom za nastanak POA koljena i kuka u hrvatskoj populaciji. Također, ovo je prva studija koja pokazuje i nedostatak povezanosti rs2275913 SNP IL17A gena s OA koljena.

**Ključne riječi:** Genetska predispozicija za nastanak bolesti; interleukini, interleukin-1, interleukin-17; osteoartritis, koljeno, kuk; polimorfizam jednog nukleotida

**ROLE OF GENE POLYMORPHISMS OF  
PROINFLAMMATORY CYTOKINES IL-1 AND IL-17  
IN PRIMARY KNEE AND HIP OSTEOARTHRITIS**

**SUMMARY**

**Objectives.** Osteoarthritis (OA) is a frequent joint disease with complex genetic risk. Genetic predisposition to the complex hereditary disease like OA of the large joints (hip and knee) includes the interleukin-1 gene (IL1) cluster on chromosome 2. Also, one of the loci that could predispose the development of OA is located on chromosome 6 (6p12.3-q13). Near this locus is a gene, which encodes the interleukin-17A (IL-17A). The specific objectives of this study were: 1) to identify the interleukin-1 (IL-1) and IL-17 gene polymorphisms in patients with advanced primary knee OA (KOA) and hip OA (HOA) treated because of their illness with total hip replacement (THR) or partial/total knee replacement (PKR/TKR), and compared to a control group of voluntary blood donors from Croatian population, 2) explore the importance of association risk for developing KOA and HOA and frequency of additional polymorphic markers for IL1 gene locus [IL1A (rs1800587, C-889T) and IL1B (rs1143634, C +3954 T)] as well as IL17 gene, i.e. IL17A (rs2275913, G-197A), 3) to examine whether the frequency of polymorphisms IL1A (rs1800587, C-889T), IL1B (rs1143634, C +3954 T), and IL17A (rs2275913, G-197A) are associated with an increased risk of primary KOA and HOA, and 4) to extend this research by introducing the results of previous studies with two polymorphic markers for the IL1 region [IL1B (rs16944, G-511A) and IL1RN Variable Number Tandem Repeat (VNTR)] in order to search for a putative extended risk

haplotype (consisting of 1: C-889T IL1A, 2: IL1B C+3954T, 3: IL1B G-511A, and 4: IL1RN VNTR markers) during association analyses with the disease(s).

**Patients and Methods.** Using a case - control study with 500 OA patients (240 KOA and 260 HOA patients, all with joint replacement), we analyzed frequencies of IL1 gene cluster polymorphisms in Croatian Caucasian population. The control samples came from 531 healthy persons with a majority of voluntary blood donors. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped in the IL1 gene locus at IL1A (-889, C>T, rs1800587) and IL1B (+3594, C>T, rs1143634), and their frequencies were compared between patients and controls. Haplotypes prediction was done by combining current data with previous results on gene polymorphisms (IL1B, rs16944, and the IL-1 receptor antagonist gene [IL1RN] Variable Number Tandem Repeat [VNTR]) for the same population. Furthermore, IL17A SNP of HOA patients were analyzed in our population, and analysis was extended on KOA patients. A total of 358 OA patients, of which 186 KOA patients with PKR or TKR and 172 HOA patients with THR, and 136 healthy voluntary blood donors as controls were genotyped for the IL17A gene SNP -197(G>A, rs2275913). The frequencies of alleles of the IL17A gene SNP at -197G>A were detected by Taqman method.

**Results.** Haplotype analyses revealed gender disparities and showed that women carriers of the 1-2-1-1 haplotype [IL1A(rs1800587) - IL1B(rs1143634) - IL1B(rs16944) - IL1RN(VNTR)] had six-fold lower risk to develop KOA, whereas carriers of the 1-1-1-2 haplotype had over two-fold higher predisposition to HOA. Furthermore, genotyping of the SNP -197 (G> A, rs2275913) IL17A gene did not found differences in the allelic and genotypic frequencies between patients and controls.

**Conclusions.** Our results differ from earlier studies in Caucasian subpopulations which may be due to the fact that this is the first study to separate genders in assessing the IL1-

locus genetic risk of OA. The results suggest that both inflammatory mediators like IL-1 might be implicated in the pathogenesis of primary OA in large joints and that as yet unidentified gender specific factors exist in a Croatian Caucasian population which determines predisposition for development of primary OA of the large joints. Furthermore, no significant association was found for the IL17A gene SNP rs2275913 with KOA and HOA in Croatian population. This is the first study that shows lack of association of the rs 2275913 SNP in the IL17A gene with KOA.

**Key words:** Genetic Predisposition to Disease; □Interleukins, Interleukin-1, Interleukin-17; Osteoarthritis, Hip, Knee; Single Nucleotide Polymorphism

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>1</b>
1.1 UVOD.....	1
1.2 OSTEOARTRITIS ILI OSTEOARTROZA (ARTROZA)? .....	2
1.3 KLASIFIKACIJA OSTEOARTRITISA.....	4
1.4 EPIDEMIOLOGIJA OSTEOARTRITISA .....	5
<i>1.4.1 Prevalencija i incidencija osteoartritisa</i> .....	6
<i>1.4.2 Rizični čimbenici za nastanak osteoartritisa</i> .....	11
1.4.2.1 Sistemske rizične čimbenice za nastanak osteoartritisa .....	12
1.4.2.1.1 Dob.....	13
1.4.2.1.2 Spol i hormoni.....	13
1.4.2.1.3 Rasna/etnička pripadnost.....	14
1.4.2.1.4 Genetika .....	15
1.4.2.1.5 Kongenitalne/razvojne abnormalnosti.....	16
1.4.2.1.6 Prehrana .....	17
1.4.2.2 Lokalni rizični čimbenici za nastanak osteoartritisa .....	19
1.4.2.2.1 Pretilost .....	19
1.4.2.2.2 Prethodna ozljeda i/ili operativni zahvat .....	20
1.4.2.2.3 Zanimanje .....	21
1.4.2.2.4 Fizička aktivnost i sport .....	21
1.4.2.2.5 Mehanički čimbenici .....	22
1.4.2.2.6 Osovina (usmjerenje) ekstremiteta .....	23
1.4.2.2.7 Laksitet (labavost) zglobova .....	25
1.4.2.3 Rizični čimbenici za nastanak simptomatskog osteoartritisa .....	26
<i>1.4.3 Genetska epidemiologija osteoartritisa</i> .....	27
1.4.3.1 Analiza povezanosti i uloga genetike u nastanku OA .....	31
1.4.3.2 Studije gena kandidata i uloga genetike u nastanku OA .....	35
1.4.3.3 Studije udruženosti genoma i uloga genetike u nastanku OA .....	39
1.4.3.4 Meta-analize i uloga genetike u nastanku OA.....	44
1.5 ETIOPATOGENEZA OSTEOARTRITISA .....	47
<i>1.5.1 Uloga proupalnih citokina u patofiziologiji osteoartritisa</i> .....	51
1.6 KLINIČKA SLIKA OSTEOARTRITISA.....	54



1.7	DIJAGNOSTIKA OSTEOARTRITISA .....	55
1.8	LJUEČENJE OSTEOARTRITISA .....	57
1.9	PREVENCIJA OSTEOARTRITISA .....	59
1.10	PRIKAZ PROBLEMA .....	61
<b>2.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>67</b>
<b>3.</b>	<b>ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>69</b>
3.1	ISPITANICI .....	69
3.1.1	<i>Ispitanici uključeni u istraživanje udruženosti polimorfizama IL-1 genskog lokusa [IL1A (-889, C&gt;T, rs1800587) i IL1B (+3594, C&gt;T, rs1143634)] s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena .....</i>	<i>69</i>
3.1.2	<i>Ispitanici uključeni u istraživanje udruženost IL17A -197 (G&gt;A) genskog polimorfizma s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena .....</i>	<i>71</i>
3.2	KRITERIJI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE OSTEOARTRITISA KOLJENA I KUKA .....	73
3.2.1	<i>Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka .....</i>	<i>73</i>
3.2.2	<i>Radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka .....</i>	<i>74</i>
3.3	KRITERIJI UKLJUČIVANJA I ISKLJUČIVANJA U ISTRAŽIVANJE .....	74
3.3.1	<i>Kriteriji uključivanja u istraživanje .....</i>	<i>74</i>
3.3.2	<i>Kriteriji isključivanja iz istraživanja .....</i>	<i>75</i>
3.4	METODE .....	76
3.4.1	<i>Skupljanje uzoraka periferne venske krvi ispitanika .....</i>	<i>76</i>
3.4.2	<i>Izolacija genomske DNA iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze .....</i>	<i>76</i>
3.4.3	<i>Genetska analiza izolirane genomske DNA i lančana reakcija polimeraze .....</i>	<i>77</i>
3.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	81
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>84</b>
4.1	INTERLEUKIN-1 (IL-1) .....	84
4.1.1	<i>Analiza frekvencije pojedinog alela i genotipova IL-1 genskog lokusa .....</i>	<i>84</i>
4.1.2	<i>Analiza haplotipova .....</i>	<i>88</i>
4.1.3	<i>Analiza genotipova .....</i>	<i>95</i>
4.2	INTERLEUKIN-17 (IL-17) .....	99

4.2.1 Analiza frekvencije pojedinog alela i genotipova.....	99
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>101</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>112</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>117</b>

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Uvod

Osteoartritis (OA) je kronična, degenerativna, progresivna i multifaktorijalna bolest zglobova koja uzrokuje degenerativne promjene zglobne hrskavice, ali i patološke promjene u drugim dijelovima zgloba, kao što su sinovijalni i fibrozni sloj zglobne čahure, subhondralna kost, ligamenti te periartikularni mišići i tetive (1). OA je najčešća bolest mišićno-koštanog sustava u srednjoj i starijoj životnoj dobi u razvijenim zemljama (2). Stoga je od posebne važnosti proučavanje patogeneze, kliničkog aspekta i liječenja ove bolesti, jer ima visoku incidenciju, prevalenciju i značajan medicinski, socijalni i ekonomski utjecaj na društvo (3). Zbog velike kliničke heterogenosti, nejasno je da li je OA jedna bolest ili mješavina različitih poremećaja, ovisno o tome koja su tkiva primarno zahvaćena kod započinjanja i napredovanja bolesti (4). Klinički, OA je karakteriziran fluktuirajućom boli u zglobovima, oteklinom i napetošću zglobova, intraartikularnim krepitacijama te ograničenom pokretljivošću zglobova (5). Ove kliničke značajke su povezane s pojedinim radiološkim promjenama zglobova prisutnim u različitim stadijima uznapredovalosti OA, kao što su suženje zglobne pukotine, skleroza subhondralne kosti, stvaranje koštanih cisti i osteofita (6). Prethodno navedena klinička i radiološka obilježja OA dovode do manjeg ili većeg stupnja nesposobnosti bolesnika za obavljanje svakodnevnih životnih aktivnosti (u ovisnosti o stupnju uznapredovalosti OA) te do pada kvalitete života što zahtijeva liječenje takvih bolesnika. Trenutno, postoje tri temeljna modaliteta liječenja OA: nefarmakološko, farmakološko i kirurško (3). Međutim, trenutna učinkovitost liječenja OA je ograničena u većini slučajeva na smanjenje intenziteta boli, poboljšanje pokretljivosti, olakšavanje aktivnosti

svakodnevnog života i/ili poticanju djelomične regeneracije hrskavice. Također, trenutni terapijski režimi za liječenje OA su samo djelomično učinkoviti i to je glavni razlog nezadovoljstva većina liječnika prilikom liječenja bolesnika s OA (3).

Zašto je tome tako? Iz jednostavnog razloga – uzrok nastanka (etiologija) OA nije u potpunosti razjašnjen, a time i etiološko liječenje ove bolesti nije moguće. S obzirom na činjenicu da etiologija OA nije razjašnjena, glavni cilj liječenja je usporavanje, ili u najboljem slučaju, zaustavljanje napredovanja OA. Brojna dosadašnja istraživanja unaprijedila su naše razumijevanje uzroka, čimbenika rizika, patofizioloških putova i mehanizama odgovornih za nastanak i progresiju OA. Upravo bolje razumijevanje patofiziologije ove bolesti omogućiti će uočavanje nekih novih terapijskih ciljeva u liječenju OA. Međutim, problem postoji ne samo za bolesnike s OA i liječnike koji liječe takve bolesnike, već i za društvo u cjelini, zbog njegove nemogućnosti da se nosi s medicinskim potrebama u pronalaženju adekvatnog liječenja ove bolesti. Dakle, jedan od najvećih izazova u budućnosti će biti pronaći najprikladniju terapiju(e) za OA. To i je glavni razlog zašto znanstvenici istražuju OA (3).

## **1.2 Osteoartritis ili osteoartroza (artroza)?**

Genomske analize osteoartritisa obnovile su raspravu o tome da li je ovu bolest ispravno nazvati osteoartritis ili osteoartroza, zbog semantičkih problema u definiciji upale prisutne u hrskavici (7, 8). Naime, naziv osteoartritis (nastavak –itis na korijen riječi) upućuje na činjenicu da u ovoj bolesti postoji upalna komponenta, za razliku od naziva osteoartroza (nastavak –osis na korijen riječi) koji pak upućuje na činjenicu da je u ovoj bolesti dominantan degenerativni proces. Dakle, u postgenomskom razdoblju molekularne medicine, postavlja se pitanje ne samo semantike, koja proučava značenje

riječi, već i sinonimije (koja proučava semantički odnos između dva leksema koji pripadaju istoj vrsti riječi, imaju različiti izraz i jednak sadržaj), tj. da li su to uopće isti pojmovi kako se to često u literaturi i navodi (9)? Također, navodi se da je pitanje naziva ove bolesti zapravo pitanje izričaja u anglosaksonskom (osteoarthritis) ili germanskom (osteoartroza) govornom području (10), opravdavajući tumačenje pojavom simptoma bolesti kao posljedice djelovanja kemijskog i mehaničkog detritusa zglobne hrskavice. To ima za posljedicu nastanak sinovitisa (upalne promjene sinovijalne membrane zgloba), koji nastaje sekundarno kao posljedica degenerativnih promjena (npr. striženja) hrskavice, zbog čega se u anglosaksonskoj literaturi govori o osteoartritisu (11). Pitanje je što je primarno, a što sekundarno kod osteoartritisa? Naime, ako i nastane upala kod osteoartritisa, da li ona ima sve klasične znakove, prema 20-stoljetnoj definiciji koju je predložio rimski liječnik Cornelius Celsius, a to su prisutnost crvenila i otekline s toplinom i boli (od lat. *rubor et tumor cum calore et dolor*), ili se neki od tih znakova upale ne manifestiraju kod ove bolesti (12)?. Odgovor na ovo pitanje dala je analiza genskim čipovima, koja je pokazala da avaskularna, alimfatična i aneuralna ljudska zglobna hrskavica zahvaćena osteoartritisom (ponekad čak i prije nego što je došlo do jače kliničke manifestacije bolesti) sadrži stanice u hrskavici poput aktiviranih makrofaga, koje pokazuju superindukciju upalnih medijatora, no bez ostalih znakova upale (8). S obzirom na dokazanu prisutnost upalnih medijatora, u postgenomskom razdoblju molekularne medicine, predloženo je ovu bolest nazivati osteoarthritis, a ne osteoartroza, i zato će se ona u ovoj disertaciji nazivati samo *osteoartritisom (OA)*.

### 1.3 Klasifikacija osteoartritisa

Iako postoje brojne klasifikacije OA, najčešće se u literaturi koristi klasifikacija podvrsta OA Pododboru za klasifikacijske kriterije osteoartritisa Odbora za dijagnostičke i terapijske kriterije Američkog društva za reumatizam iz 1986.g. (Tablica 1) (13). OA se može podijeliti na primarni i sekundarni. Primarni OA jest bolest nepoznate etiologije (ali pro-upalnog karaktera prema definiciji nevedenoj u 1.2.) čiji je nastanak vezan uglavnom uz stariju životnu dob. Sekundarni OA nastaje pretežito u mlađoj dobi i u pravilu kao posljedica nekih drugih bolesti ili stanja poznatog uzroka kao što su npr. razvojni poremećaji, trauma ili slično, koje dovode do procesa također karakteriziranog s pojavom upalnih medijatora (14).

#### Tablica 1. Klasifikacija podvrsta osteoartritisa (OA).

(Modificirano iz: Altman R, Asch E, Bloch D i sur. *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum 1986;29(8):1039-49.*)

<p>I. Primarni (idiopatski)</p> <p>A. Lokalizirani</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Šaka: npr., Heberdenovi i Bouchardovi čvorovi (nodusi) - nodalni oblik, erozivni interfalangealni artritis (ne-nodalni), skafometakarpalni, skafotrapezoidalni</li><li>2. Stopala: npr. hallux valgus, hallux rigidus, kontraktura prstiju (čekićasti prsti), talonavikularni</li><li>3. Koljeno<ol style="list-style-type: none"><li>a. Medijalni odjeljak</li><li>b. Lateralni odjeljak</li><li>c. Patelofemoralni odjeljak (npr., hondromalacija)</li></ol></li><li>4. Kuk<ol style="list-style-type: none"><li>a. Ekcentrični (gore)</li><li>b. Koncentrični (aksijalno, medijalno)</li><li>c. Difuzni (coxa senilis)</li></ol></li><li>5. Kralježnica (posebno vratna i slabinska)<ol style="list-style-type: none"><li>a. Apofizealno</li><li>b. Intervertebralno (disk)</li><li>c. Spondiloza (osteofiti)</li><li>d. Ligamentarno (hiperostoza [Forestierova</li></ol></li></ol>	<p>II. Sekundarni</p> <p>A. Post-traumatski</p> <p>B. Kongenitalne ili razvojne bolesti</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Lokalizirani<ol style="list-style-type: none"><li>a. Bolesti zgloba kuka: Legg-Calvé-Perthesova bolest, razvojni poremećaj zgloba kuka, epifizeoliza glave bedrene kosti, plitak acetabulum</li><li>b. Mehanički i lokalni čimbenici: pretilost, nejednaka dužina donjih ekstremiteta, izraziti valgus/varus deformitet, sindrom hipermoblnosti, skolioza</li></ol></li><li>2. Generalizirani<ol style="list-style-type: none"><li>a. Koštane displazije: epifizealna displazija, spondiloapofizealna displazija</li><li>b. Metaboličke bolesti: hemokromatoza, ohronoza, Gaucherova bolest, hemoglobinopatije, Ehlers-Danlosova bolest</li></ol></li></ol> <p>C. Bolesti odlaganja kalcija</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Bolest odlaganja kalcij pirofosfata</li><li>2. Apatitna artropatija</li></ol>
---	---

<p>bolest, ili DISH – difuzna idiopatska skeletalna hiperostoza])</p> <p>6. Ostale lokalizacije: rame, temporomandibularni zglob, sakroilijakalni zglob, gležanj, ručni zglob, akromioklavikularni zglob</p> <p>B. Generalizirani (uključuje 3 ili više gore navedenih područja)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mali (periferni) i kralježnica</li> <li>2. Veliki (centralni) i kralježnica</li> <li>3. Miješani (periferni i centralni) i kralježnica</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Destruktivna artropatija (rame, koljeno)</li> </ol> <p>D. Ostali poremećaji kostiju i zglobova: avaskularna nekroza, reumatoidni artritis, artritis kao posljedica gihta, septički artritis, Pagetova bolest, osteopetroza, osteohondritis</p> <p>E. Ostale bolesti</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Endokrine bolesti: dijabetes mellitus, akromegalija, hipotiroidizam, hiperparatiroidizam</li> <li>2. Neuropatska artropatija (Charcotov zglobovi)</li> <li>3. Razno: smrztotine, Kashin-Beckova bolest, Caissonova bolest</li> </ol>
--	--

#### 1.4 Epidemiologija osteoartritisa

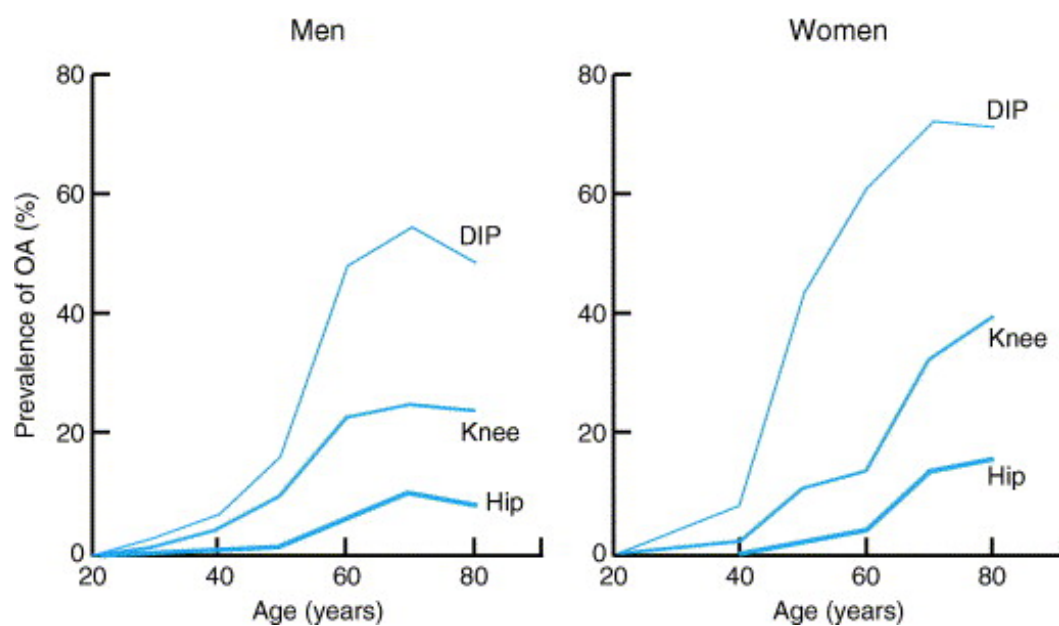
Epidemiološka načela mogu se koristiti kako bi se opisala rasprostranjenost OA u populaciji, ali i da bi se ocijenio utjecaj čimbenika rizika na nastanak i progresiju ove bolesti (15). Za potrebe epidemioloških istraživanja, OA se može definirati patohistološki (16), radiološki (17) ili klinički (13, 18). Radiološka definicija OA je odavno smatrana kao referentni standard (15). Naime, postoji više načina da se radiološki definira ova bolest (13, 17-22). Najčešća metoda za radiološko definiranje OA je Kellgren-Lawrence (K/L) ljestvica za radiološku procjenu OA (17) i atlas individualnih radioloških karakteristika u OA (23). Ostala radiološka mjerenja, uključujući semikvantitativno ocjenjivanje individualnih radioloških karakteristika (kao što su osteofiti i suženje zglobne pukotine) ili izravno mjerenje udaljenosti između dvije kosti koje se zglobljavaju u području određenog zgloba (kao pokazatelja širine zglobnog prostora u koljenima i kukovima) se koristi za istraživanje napredovanja OA u epidemiološkim studijama, ali i u kliničkim istraživanjima lijekova koji modificiraju tijek ove bolesti (od engl. *disease-modifying osteoarthritis drugs - DMOADs*) (24, 25). Mnogo osjetljivija slikovna metoda za procjenu uznapredovalosti OA je magnetska rezonancija (MR), kojom se može vizualizirati više struktura unutar zgloba, definirati

stadij uznapredovalosti OA, ali i mnogo brže detektirati učinkovitost potencijalnih DMOADs nego li je to moguće konvencionalnom radiološkom obradom (19, 26).

Studije koje proučavaju simptomatski OA mogu biti više klinički relevantne, jer sve osobe koje imaju radiološki dokazan OA nemaju simptomatski OA, a isto tako, sve osobe koje imaju simptomatski OA ne moraju imati i radiološki dokazan OA (27). S obzirom na postojanje različitih kliničkih i radioloških kriterija za postavljanje dijagnoze OA, svaki skup kliničkih i radioloških kriterija može na različite načine definirati OA u pojedinih ispitanika (27).

#### 1.4.1 Prevalencija i incidencija osteoartritisa

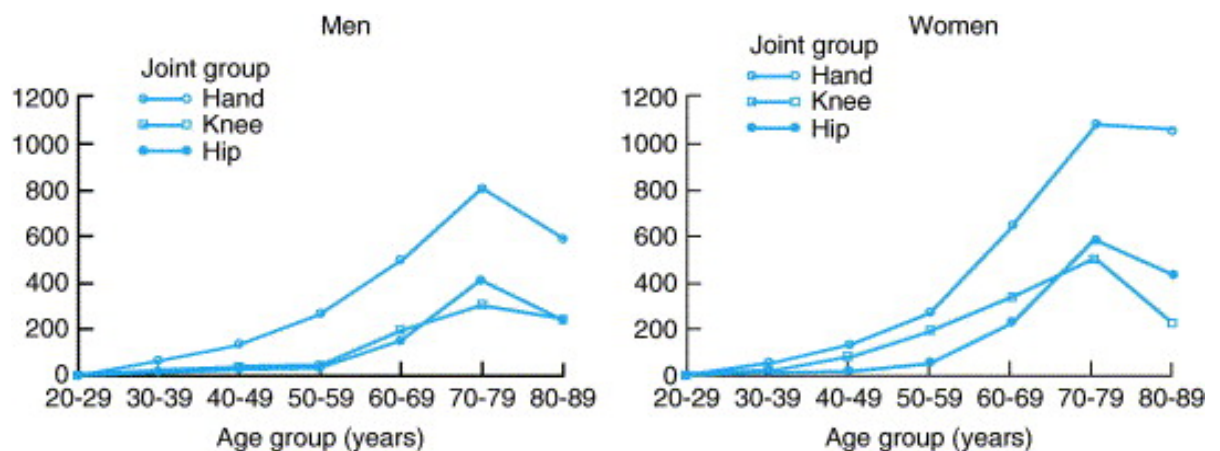
Prevalencija (udio oboljelih u populaciji ovisan o incidenciji i trajanju bolesti) i incidencija (broj novooboljelih u odnosu na broj osjetljivih osoba koje mogu oboliti od određene bolesti unutar jedne populacije tijekom određenog vremenskog razdoblja) primarnog OA koljena i kuka raste s porastom dobi (Slika 1 i 2) (28-30).





**Slika 1.** Prevalencija osteoartritisa (Prevalence of OA) distalnih interfalangealnih (DIP) zglobova šake, koljena (Knee) i kuka (Hip) u osoba muškog (Men) i ženskog (Women) spola u nizozemskoj populaciji s obzirom na dob u godinama [Age (years)].

(Preuzeto iz van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. *Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. Ann Rheum Dis 1989;48(4):271-80.*)



**Slika 2.** Incidencija osteoartritisa šake (Hand), koljena (Knee) i kuka (Hip) u osoba muškog (Men) i ženskog (Women) spola s obzirom na dob u godinama [Age group (years)]. Podaci Zdravstvenog plana zajednice Fallon (od engl. *Fallon Community Health Plan*).

(Preuzeto iz: Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. *Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. Arthritis Rheum 1995;38(8):1134-41.*)

Uznepredovanje OA dovodi do gubitka funkcije zahvaćenog zgloba (ili zglobova), otežane dnevne aktivnosti i pada razine kvalitete života. Od svih zglobova, primarnim OA najčešće su zahvaćeni maleni zglobovi šaka, koljena i kukovi (31, 32).

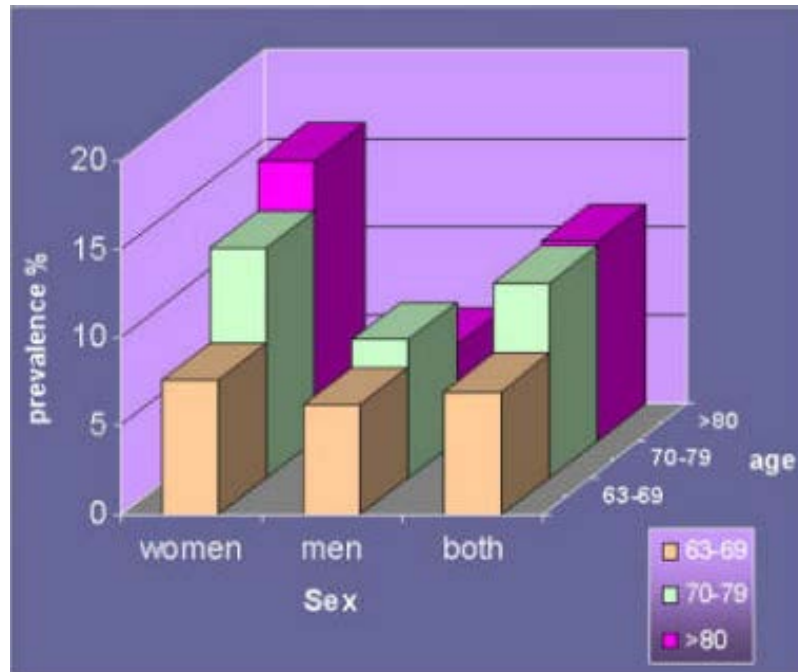
Prevalencija OA varira u ovisnosti prema definiciji OA u pojedinoj studiji, koji se specifični zglob zahvaćen OA promatra te prema karakteristikama promatrane populacije u istraživanju (15). Tako je prevalencija radiološki dokazanog OA šake standardizirana prema dobi bila 27,2% među sudionicima Framinghamske studije (33).

Prevalencija radiološki dokazanog OA koljena standardizirana prema dobi u osoba dobi  $\geq 45$  godina je bila 19,2% među sudionicima Framinghamske studije (33) i 27,8% u Osteoarthritis projektu okruga Johnston (od engl. *Johnston County Osteoarthritis Project*) (34). U trećem istraživanju Nacionalnog zdravlja i prehrane (od engl. *The Third National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES III*), oko 37% ispitanika u dobi  $> 60$  godina ili starijih je imalo radiološki dokazan OA koljena (35).

Radiološki dokazan OA kuka bio je manje učestao u odnosu na radiološki dokazan OA šake ili koljena. Na primjer, oko 7% žena u dobi  $\geq 65$  godina je imalo radiološki dokazan OA kuka u studiji osteoporotičnih prijeloma (od engl. *The Study of Osteoporotic Fractures Research Group*) (36). Međutim, učestalost radiološki dokazanog OA kuka bila je mnogo veća u Osteoarthritis projektu okruga Johnston, s 27% ispitanika u dobi od najmanje 45 godina, pokazujući radiološki dokaz uznapreovalosti OA kuka po K/L ljestvici 2 ili više (34). Moguće objašnjenje razlika između tih studija jesu razlike u promatranim populacijama, razlike u definiranju OA, distribucija čimbenika rizika za nastanak OA kao i razlike među promatračima koji su ocjenjivale stupanj radiološke uznapreovalosti OA (15).

Simptomatski OA se općenito definira prisutnošću boli i ograničene pokretljivosti zahvaćenog zgloba uz pojedine radiološke karakteristike (suženje zglobne pukotine, osteofiti, subhondalne ciste, skleroza subhondralne kosti), a u ovisnosti o

stupnju uznapređovalosti OA (15). Prevalencija simptomatskog OA također raste s porastom dobi (Slika 3) (37).

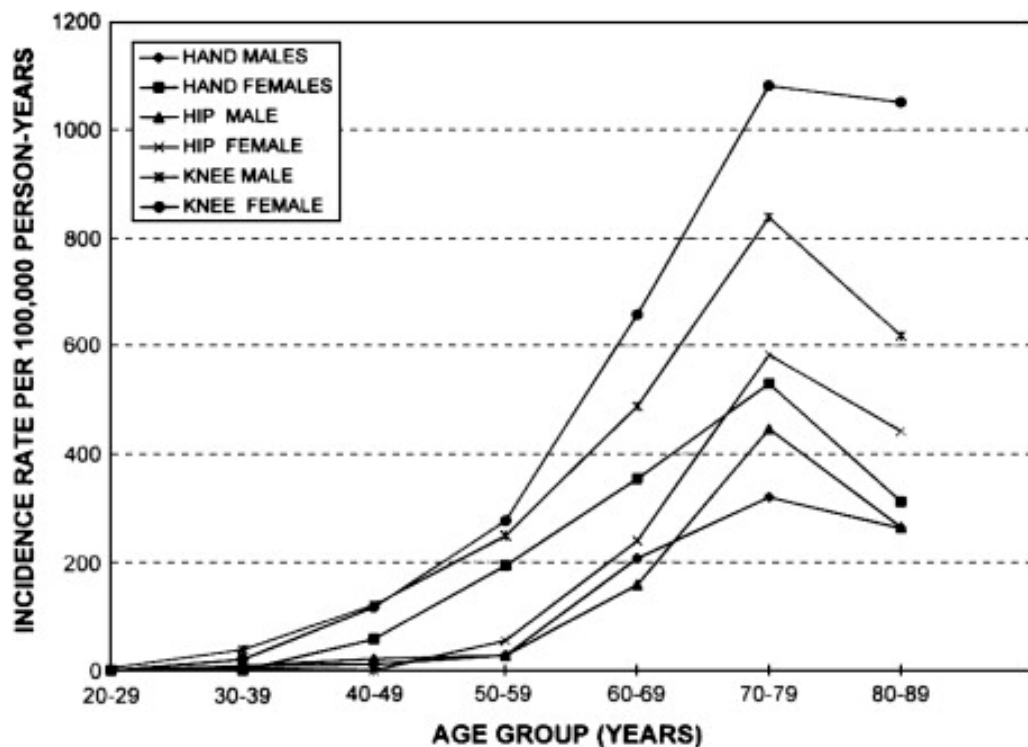


**Slika 3.** Prevalencija (prevalence) simptomatskog osteoartritisa u osoba ženskog (women) i muškog (men) spola te oba (both) spola s obzirom na dob u godinama (age).

(Preuzeto iz: Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20(3 Suppl 1):42-50.)

Prevalencija simptomatskog OA šake standardizirana prema dobi iznosila je 6,8%, a prevalencija simptomatskog OA koljena standardizirana prema dobi iznosila 4,9% među sudionicima Framinghamske studije dobi  $\geq 26$  godina (33). Međutim, prevalencija simptomatskog OA koljena bila je 16,7% među ispitanicima dobi  $\geq 45$  godina Osteoarthritis projekta okruga Johnston (34), dakle mnogo veći nego što je objavljeno u Framinghamskoj studiji (33). Oko 9% ispitanika u istraživanju Osteoarthritis projekta okruga Johnston imalo je simptomatski OA kuka (34). Oliveria i sur. (29) u svojem su istraživanju izvijestili da incidencija simptomatskog OA kuka,

koljena i šake standardizirana prema dobi i spolu iznosi 88, 240 i 100 na 100 000 osoba godišnje u ispitanika iz Organizacije za očuvanje zdravlja Massachusetts (od engl. *Massachusetts health maintenance organization*) te da stopa incidencije simptomatskog OA šake, koljena ili kuka rapidno raste oko 50. godine života, a iste se potom izjednačavaju nakon 70. godine života (Slika 4).



**Slika 4.** Incidencija osteoartritisa šake (hand), kuka (hip) i koljena (knee) u ispitanika Zdravstvenog plana zajednice Fallon u periodu od 1991. do 1992. – razdioba po dobi [Age group (years)] i spolu (muškarci – males, žene – females)].

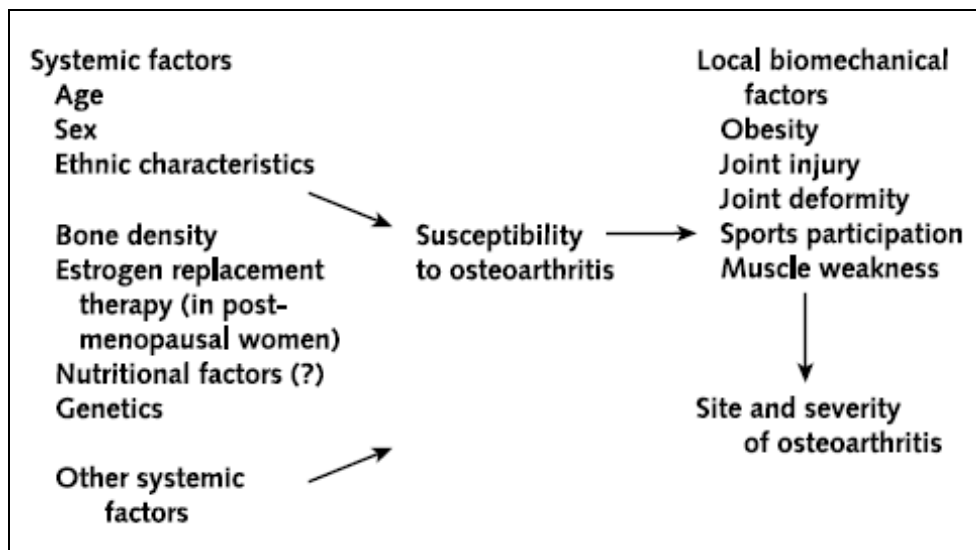
(Preuzeto iz: Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 1995;38(8):1134-41.)

Murphy i sur. (38) procjenjuju da je cijeloživotni rizik za nastanak simptomatskog OA koljena oko 40% za muškarce i 47% za žene. Takav rizik raste na

60% u ispitanika s indeksom tjelesne mase (ITM) (od engl. *Body mass index - BMI*) od 30 ili više.

#### 1.4.2 Rizični čimbenici za nastanak osteoartritisa

Osteoarthritis ima multifaktorijalnu etiologiju te se nastanak OA može smatrati posljedicom interakcije između sistemskih i lokalnih čimbenika kao što je prikazano na slici 5 (39).



**Slika 5.** Patogeneza osteoartritisa (OA) s mogućim čimbenicima rizika. Na predispoziciju za nastanak osteoartritisa (Susceptibility to osteoarthritis) mogu utjecati razni sistemski rizični čimbenici (Systemic factors): dob (Age), spol (Sex), etnička pripadnost (Ethnic characteristics), koštana gustoća (Bone density), nadomjesno hormonsko liječenje u postmenopauzi (Estrogen replacement therapy in post-menopausal women), čimbenici prehrane (Nutritional factors), genetika (Genetics) kao i ostali sistemski čimbenici (Other systemic factors). Predispozicija za nastanak OA uz lokalne biomehaničke čimbenike rizika (Local biomechanical factors), a to su pretilost

(Obesity), ozljeda zgloba (Joint injury), deformitet zgloba (Joint deformity), sportska aktivnost (Sports participation) i slabost mišića (Muscle weakness) utječe na lokalizaciju i težinu osteoartritisa (Site and severity of osteoarthritis).

*(Preuzeto iz: Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA i sur. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. Ann Intern Med 2000;133(8):635-46.)*

Na primjer, osoba može imati naslijeđenu predispoziciju za razvoj OA, ali isti može nastati samo ako ta osoba zadobije povredu zgloba (15). Relativna važnost čimbenika rizika može varirati za različite zglobove, za različite faze bolesti, za nastanak u odnosu na progresiju bolesti te za radiološki dokazan OA u odnosu na simptomatski OA (15). Postoje određeni dokazi koji sugeriraju da čimbenici rizika mogu djelovati drugačije prema individualnim radiološki-definiranim karakteristikama bolesti, kao što su osteofiti i suženje zglobne pukotine (39).

Postoje višestruki rizični čimbenici za nastanak primarnog OA koljena i kuka, kao što su dob, spol, etnička pripadnost, pretilost, vrsta zanimanja (40) te genetski čimbenici za koje se vjeruje da su udruženi s razvojem i napredovanjem OA koljena i kuka (41). Zaključno, čimbenici rizika za nastanak OA svrstani su u dvije skupine: sistemski i lokalni. O svakom od pojedinih sistemskih i lokalnih rizičnih čimbenika za nastanak osteoartritisa biti će više govora u narednim potpoglavljima.

#### 1.4.2.1 Sistemski rizični čimbenici za nastanak osteoartritisa

U sistemske čimbenike rizika za nastanak OA ubrajaju se dob, spol, hormoni, rasna/etnička pripadnost, genetika, kongenitalne/razvojne abnormalnosti i prehrana.

#### 1.4.2.1.1 Dob

Dob predstavlja jedan od najjačih čimbenika rizika za nastanak OA svih zglobova (39, 42, 43). Povećanje incidencije i prevalencije OA s porastom dobi vjerojatno je posljedica kumulativnog izlaganja različitim čimbenicima rizika i biološkim promjenama koje se javljaju sa starenjem, a koje mogu utjecati na smanjenje funkcionalne sposobnosti pojedinog zgloba prilikom djelovanja određenih nepovoljnih okolnosti, kao što su stanjenje zglobne hrskavice, gubitak mišićne snage, slaba propriocepcija i oksidativno oštećenje (15).

#### 1.4.2.1.2 Spol i hormoni

Kod osoba ženskog spola ne samo da postoji mogućnost da će češće imati OA u odnosu na muškarce, već će se kod njih razviti i puno teži oblik OA nego kod osoba muškog spola (44). Povećana pojavnost OA u žena u vrijeme menopauze potaknula je istraživanja o tome da li hormonalni čimbenici mogu imati ulogu u nastanku OA. Međutim, rezultati opservacijskih studija o utjecaju bilo endogenih ili egzogenih estrogena na nastanak OA su međusobno proturječni (45-47). U randomiziranom kliničkom istraživanju Srce i estrogen/progestin nadomjesna studija (od engl. *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study - HERS*) u skupini žena u postmenopauzi s bolestima srca nije pronađena statistički značajna razlika u prevalenciji koljenske boli ili pridružene ograničene dnevne aktivnosti između onih žena koje su uzimale nadomjesnu hormonsku terapiju estrogena uz progestin i onih koje su dobivale placebo (48). Rezultati placebo-kontroliranog i dvostruko slijepog randomiziranog istraživanja Inicijative za zdravlje žena (od engl. *Women's Health Initiative*) su pokazali da za žene

na estrogenskom nadomjesnom hormonskom liječenju postoji 15% manja vjerojatnost da će biti potrebna ugradnja TEP koljena ili kuka u odnosu na one žene koje nisu podvrgnute takvom liječenju (omjer izgleda iznosio je 0.86; dok je 95% interval pouzdanosti bio 0.70-1.00), ali i da nadomjesno hormonsko liječenje u vidu kombinacije estrogena i progestina nije bilo povezano s rizikom za ugradnju TEP koljena ili kuka (49).

#### 1.4.2.1.3 Rasna/etnička pripadnost

Prevalencija OA, kao i lokalizacija pojedinih zglobova zahvaćenih OA, razlikuje se među rasnim i etničkim skupinama (15). Tako je zamijećena rjeđa pojavnost OA šake i kuka u Kineza proučavanih u Pekinškoj studiji osteoartritis (od engl. *Beijing Osteoarthritis Study*) nego li u bijelaca u Framinghamskoj studiji, dok je kod Kineskinja u Pekinškoj studiji OA bila prisutna statistički značajno veća prevalencija kako radiološki dokazang tako i simptomatskog OA koljena nego li u bjelkinja iz Framinghamske studije (50, 51). Rezultati iz istraživanja Osteoartritis projekta okruga Johnston su pokazali da je prevalencija OA kuka u afroameričkih žena (23%) bila slična onoj u bijelkinja (22%), dok je prevalencija OA iste lokalizacije u osoba muškog spola bila nešto viša u Afroamerikanaca (21%) nego li u bijelaca (17%) (52). Zanimljiva je činjenica iz istoga istraživanja da je prevalencija individualnih radioloških karakteristika OA kuka varirala između Afroamerikanaca i bijelaca. Tako se navodi da je suženje zglobne pukotine zgloba kuka u njegovom gornjem dijelu kao i pojava osteofita u lateralnom dijelu zgloba kuka češća u Afroamerikanaca nego li u bijelaca (52). Izuzev toga, za Afroamerikance također postoji veća vjerojatnost da će se kod njih razviti teži oblik OA koljena kao i da će osteofiti nastati u sva tri (medijalnom, lateralnom i



patelofemoralnom) odjeljka (kompartmenta) koljena u odnosu na bijelce (53). Da li je neka od ovih rasnih/etničkih razlika povezana s razlikama u anatomskim karakteristikama glave bedrene kosti i acetabuluma, što se pokazalo važnim kod radiološki dokazanog OA kuka u bijelaca (54, 55), ostaje otvoreno pitanje za buduća istraživanja.

#### 1.4.2.1.4 Genetika

Rezultati nekoliko studija dokazali su važnost nasljedne komponente za nastanak primarnog OA kao i varijaciju nasljednosti s obzirom na lokalizaciju OA (56-61). Studije jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca kao i studije obitelji pokazale su da nasljedna komponenta OA iznosi između 50 i 65% s većim genetskim utjecajima za nastanak OA šake i kuka nego li za nastanak OA koljena (56-58). Naime, jedna od takvih studija jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca je studija Spector i sur. (57), u kojoj se koristio radiološki probir 250 žena parova blizanaca (130 monozigotnih i 120 dizigotnih parova blizanaca) za dijagnosticiranje OA šake i koljena te je pronađeno da je genetski utjecaj za nastanak OA prethodno navedenih lokalizacija u rasponu od 39-65% (ovisno o lokalizaciji, OA koljena < OA šake). U studiji Kujale i sur. (59) učinjen je probir bolesnika kojima je dijagnosticiran OA određene lokalizacije, a iz populacije blizanaca i pojedinih obitelji s učestalom pojavom OA na temelju ispunjenih anketnih upitnika ispitanika. Autori ove studije su dokazali razlike u uzroku nastanka OA između muškaraca i žena, s dodatnim genetskim učinkom koji objašnjava 44% varijacije u žena, dok negenetski obiteljski učinak objašnjava 37% ukupne varijacije u muškaraca odgovorne za nastanak OA. Bijkerk i sur. (60) su također istraživali dokaz o nasljednosti u ispitanika s radiološki dijagnosticiranim OA šake, kuka ili koljena, ali

nisu uspjeli pronaći dokaze o genetskom učinku na nastanak OA kuka ili koljena. MacGregor i sur. (61) istražili su genetski doprinos nastanka radiološki dokazanog OA kuka u žena i zaključili da je genetski doprinos odgovoran za nastanak ove bolesti značajan i iznosi oko 60% varijabilnosti u populaciji.

U studiji udruženosti genoma, Kerkhof i sur. (62) izvijestili da je C alel polimorfizma rs3815148 *COG5* (Component of oligomeric golgi complex 5) gena na kromosomu 7q22 povezan s 1.14 puta povećanom prevalencijom OA koljena i/ili šake, kao i s 30% povećanim rizikom za progresiju OA koljena. Također, nekoliko je studija ukazalo na inverznu povezanost između generalizirane hiper mobilnosti zglobova s OA šake i koljena i razine serumskog oligomernog proteina hrskavičnog matriksa (63, 64). O utjecaju genetike kao sistemskog čimbenika rizika za nastanak OA biti će detaljnije govora u potpoglavlju 1.4.3 (Genetska epidemiologija osteoartritisa).

#### 1.4.2.1.5 Kongenitalne/razvojne abnormalnosti

Neke kongenitalne (prirođene) ili razvojne anomalije (kao što su npr. razvojni poremećaj zgloba kuka, Legg-Calvé-Perthesova bolest ili poskliz glave bedrene kosti) su povezane s pojavom OA kuka u kasnijoj životnoj dobi (65-67). S obzirom na činjenicu da su ovi razvojni deformiteti rijetki, za pretpostaviti je da imaju mali utjecaj na pojavnost OA kuka u općoj populaciji (15). Nekoliko studija je istraživalo subklinički oblik acetabularne displazije (definira se vrijednostima Wibergova kuta između 20-25° u osoba bez kliničkih tegoba u području zgloba kuka) koja predstavlja češći i blaži oblik razvojne abnormalnosti zgloba kuka i njenu povezanost s nastankom OA kuka, s proturječnim rezultatima (54, 68-71). Lane i sur. (54) u svojem su istraživanju pokazali da su i abnormalni Wibergov kut i acetabularna displazija

povezani s približno trostruko povećanim rizikom za raniji nastanak OA kuka u žena, sugerirajući da bi subklinička acetabularna displazija mogla biti značajan čimbenik rizika za nastanak OA kuka.

#### 1.4.2.1.6 Prehrana

Prehrambeni čimbenici, koji predstavljaju jedan od sistemskih rizičnih čimbenika za nastanak OA, predmet su velikog interesa istraživača koji nastoje razjasniti njihovu ulogu u nastanku OA. Međutim, rezultati tih istraživanja su proturječni. Naime, jedan od prehrambenih čimbenika za kojeg se pretpostavlja da je važan za nastanak OA je vitamin D. Bez dovoljno vitamina D, kosti mogu postati tanke, krhke ili deformirane. U Framinghamskoj studiji, ispitanici s najnižom (<27 ng/ml) kao i oni sa srednjom vrijednosti (27-33 ng/ml) 25-hidroksivitamina D u serumu su imali 3 puta veći rizik za progresiju OA koljena u usporedbi s onim ispitanicima u kojih su zabilježene najviše vrijednosti 25-hidroksivitamina D u serumu, međutim, takav učinak nije zabilježen za rizik od naglog nastupa ove bolesti (72). U studiji osteoporotičnih prijeloma, žene sa srednjim (23-29 ng/mL) i najnižim (8-22 ng/ml) vrijednostima 25-hidroksivitamina D u serumu imale su 3 puta veću vjerojatnost da će se kod njih razviti nagli nastup OA kuka (definiran suženjem zglobne pukotine) u odnosu na žene s najvišim vrijednostima (30-72 ng/ml) ovog vitamina u serumu (73). Također, u istoj studiji je dokazano i da razine vitamina D u serumu nisu bile povezane s rizikom od osteofitnog oblika OA kuka ili s novonastalim OA kuka. Međutim, rezultati dvije longitudinalne studije (Framinghamske i Bostonske) nisu potvrdile zaštitni učinak vitamina D na strukturno pogoršanje OA koljena (74). Zaključno, nedavno objavljeno dvogodišnje, randomizirano, placebo-kontrolirano, dvostruko slijepo kliničko istraživanje koje je

postavilo pitanje da li suplementacija vitaminom D smanjuje simptomatologiju i strukturalnu progresiju OA koljena, je pokazalo da dodatak vitamina D kroz navedeno razdoblje (a nakon usporedbe s placebo) nije smanjio koljensku bol niti je smanjio gubitak volumena hrskavice u 146 bolesnika sa simptomatskim OA koljena (75).

Niska razina unosa vitamina C povezana je s povećanim rizikom za progresiju, ali ne i s incidencijom radiološki dokazanog i simptomatskog OA koljena među sudionicima Framinghamske studije (76). U ispitanika Osteoartritis projekta okruga Johnston s visokim udjelom alfa:gama-tokoferol odnosa zabilježen je 50% manji rizik za razvoj radiološki dokazanog OA koljena (77). Međutim, rezultati dvostruko slijepog, placebo kontroliranog kliničkog ispitivanja učinka vitamina E na simptomatske i strukturalne promjene u 136 bolesnika s OA koljena su pokazali da uzimanje vitamina E kroz period od 2 godine nije ublažilo simptome niti smanjilo strukturalne promjene (volumen hrskavice mjereno pomoću pretrage s magnetskom rezonancijom) u bolesnika s OA koljena (78).

Preliminarni rezultati istraživanja Osteoartritis projekta okruga Johnston pokazali su da su suboptimalne razine selena, mjerene u noktu palca stopala ispitanika, povećale rizik od nastanka OA u jednom ili oba koljena, s time da je težina bolesti bila povezana s dužinom deficijencije selena (79). Međutim, druga studija je pokazala suprotno, naime da je visok unos selena bio značajno povezan s povećanim rizikom za nastanak OA kuka i koljena (80).

Nadalje, u studiji Neogia i sur. (81) pokazano je da je niska razina serumskog vitamina K povezana s povećanom prevalencijom radiološki dokazanog OA šake i koljena. Još jedna studija potvrdila je hipotezu da suboptimalan unos vitamina K predstavlja čimbenik rizika za nastanak OA koljena, što upućuje na činjenicu da bi vitamin K mogao imati protektivnu ulogu za nastanak OA koljena (82).

#### 1.4.2.2 Lokalni rizični čimbenici za nastanak osteoartritisa

U lokalne čimbenike rizika za nastanak OA ubrajaju se pretilost, prethodna ozljeda i/ili operativni zahvat, zanimanje, fizička aktivnost i sport, mehanički čimbenici, osovina (usmjerenje) ekstremiteta i laksitet (labavost) zglobova.

##### 1.4.2.2.1 Pretilost

Pretilost (indeks tjelesne mase – ITM  $\geq 30$ ) i prekomjerna tjelesna težina (ITM 25.0-29.9) su odavno prepoznati kao čimbenici rizika za nastanak OA, poglavito za nastanak OA koljena (39). Rezultati Framinghamske studije su pokazali da žene koje su izgubile oko 5 kg na tjelesnoj težini imaju 50% manji rizik za nastanak simptomatskog OA koljena (83). Isto istraživanje je također pokazalo da je gubitak težine bio značajno povezan sa smanjenjem rizika za nastanak radiološki dokazanog OA koljena. Također, studije su pokazale i da redukcija tjelesne težine dovodi do smanjenja boli i poboljšanja pokretljivosti u već dokazanom OA koljena (84, 85). Istraživanje artritisa, navika prehrane i promicanja tjelesne aktivnosti (od engl. *Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial – ADAPT*) je pokazalo da su gubitak na tjelesnoj težini u kombinaciji s tjelovježbom, ali ne i gubitak na tjelesnoj težini ili tjelovježba zasebno, bili učinkoviti u smanjenju boli i poboljšanju funkcije u pretilih osoba starije dobi sa simptomatskim OA koljena (84). Rezultati meta-analize ukazali su na činjenicu da su učinci mršavljenja na bol kod OA koljena bili manje dosljedni, dok je smanjenje težine od oko 5% povezano s poboljšanjem tjelesne aktivnosti bolesnika (85).

Odnos između prekomjerne tjelesne težine i OA kuka je nedosljedan. Ako on i postoji, takva povezanost, tj. utjecaj prekomjerne tjelesne težine na nastanak OA kuka,

je manje izražena nego li kod osoba s OA koljena (86, 87). Međutim, dokazano je da pretilost povećava rizik za nastanak obostranog radiološki dokazanog, ali i simptomatskog OA kuka (88). U studiji Karlsona i sur. (89) je zamijećeno da je povećani ITM (posebice u dobi od 18. godine života) značajno povezan s povećanim rizikom za ugradnju TEP kuka. Povećano opterećenje zglobova je vjerojatno glavni, ali ne i jedini mehanizam kojim pretilost uzrokuje nastanak OA koljena ili kuka; naime, prekomjerno opterećenje koljena i kukova može dovesti do njihova oštećenja uz popratni gubitak ligamentarne i druge strukturalne potpore (15).

#### 1.4.2.2.2 Prethodna ozljeda i/ili operativni zahvat

Brojna istraživanja pokazala su da je ozljeda koljena jedan od najjačih čimbenika rizika za nastanak OA (15). Teška ozljeda anatomskih struktura zgloba, kao npr. unutarzglobni prijelomi, ozljede meniska koje zahtijevaju meniscektomiju ili puknuće prednje ukrižene sveze mogu rezultirati povećanim rizikom za nastanak OA koljena te dovesti do pojave bolova i funkcionalnog ograničenja (90, 91). U Framinghamskoj studiji prevalencija ozljede meniska bila je mnogo veća među ispitanicima s radiološki dokazanim OA koljena (82%) u odnosu na one bez OA (25%). Prevalencija ozljede meniska povećava se s povećanjem K/L stupnja ( $p < 0.001$  za trend), a među onima s umjerenim (K/L = 3) i teškim (K/L = 4) oblikom radiološki dokazanog OA koljena zamijećeno je da kod 95% osoba postoji dokaz za ozljedu meniska (92).

#### 1.4.2.2.3 Zanimanje

Opetovano korištenje zglobova pri obavljanju radnih aktivnosti povezano je s povećanim rizikom za nastanak OA (15). Istraživanje Crofta i sur. (93) je otkrilo da kod poljoprivrednika postoji povećani rizik za nastanak OA kuka. Nadalje, prevalencija Heberdenovih čvorova bila je mnogo veća u radnika u pamučnoj industriji, dok OA kralježnice nije bio ništa učestaliji u odnosu na kontrolnu skupinu (94). U radnika čije zanimanje zahtijeva opetovani pincetni hvat je zamijećena povećana učestalost OA distalnih interfalangealnih zglobova nego li u radnika čije zanimanje zahtijeva opetovani snažan stisak šake (95).

Rizik za nastanak OA koljena bio je više nego dva puta veći za muškarce čija su radna mjesta zahtijevala nošenje tereta te klečanje ili čučanje u srednjoj životnoj dobi u odnosu na one čija radna mjesta nisu zahtijevala takve fizičke aktivnosti (96). Također, rizik za nastanak OA koljena povezan s čučanjem ili klečanjem bio je mnogo veći u ispitanika koji su imali prekomjernu tjelesnu težinu ili čiji je posao uključivao podizanje tereta (97).

#### 1.4.2.2.4 Fizička aktivnost i sport

Dosadašnje studije koje su ispitivale odnos između sportskih aktivnosti i posljedičnog nastanka OA dale su proturječne rezultate (15). Postoje pokazatelji u literaturi da je povećan rizik za nastanak OA koljena i kuka u natjecatelja dugoprugaša (98-100), dok je kod profesionalnih nogometaša povećan rizik za nastanak OA koljena u usporedbi s osobama koje ne igraju nogomet (99, 101). Začudujuća je činjenica da opća tjelesna aktivnost također može povećati rizik za nastanak OA. Na primjer, fizička aktivnost

među osobama starije životne dobi uključenih u Framinghamsku studiju općenito je karakterizirana kao šetanje i vrtlarstvo. Međutim, osobe koja se bavile učestalo takvim aktivnostima imale su tri puta veći rizik za nastanak radiološki dokazanog OA koljena za vrijeme praćenja od osam godina nego li osobe koje su živjele više sedentarnim načinom života (102). Slični rezultati dobiveni su i u studiji Lane i sur. (103), u kojoj je kod žena koje su tijekom života imale visoku razinu fizičke aktivnosti zabilježena visoka prevalencija OA kuka. Nasuprot tome, druge su studije pokazale da, u odsutnosti akutne ozljede, umjereno rekreativno trčanje na duge pruge i džoging ne povećavaju rizik za nastanak OA koljena (104, 105).

#### 1.4.2.2.5 Mehanički čimbenici

Odnos između mišićne snage i OA je složen, može varirati u ovisnosti od lokalizacije zgloba zahvaćenog OA i nije u potpunosti razjašnjen. Mišićna slabost i atrofija su obično povezane s OA koljena te se za njih predmnijeva da su posljedica smanjene pokretljivosti zglobova zahvaćenih OA kako bi se izbjegla pojava boli ili pogoršavanje postojeće boli (15). Studija Slemenda i sur. (106) je pokazala da je kod žena koje su imale asimptomatski radiološki dokazan OA koljena bez atrofije mišića zabilježena slabost četveroglavog mišića natkoljenice, sugerirajući da bi to mogao biti čimbenik rizika za razvoj simptomatskog OA koljena. Baker i sur. (107) potvrdili su u svojem istraživanju da su osobe koje su imale asimptomatski patelofemoralni i tibiofemoralni radiološki dokazani OA koljena imale slabiju snagu četveroglavog mišića natkoljenice od onih koji nisu imali OA. U pojedinim studijama slabost četveroglavog mišića natkoljenice ne samo da je posljedica bolnog OA koljena, već i povećava rizik za strukturalno oštećenje koljena (108, 109). Druga studija je, međutim, pokazala da



povećana snaga četveroglavog mišića natkoljenice uz prisutno loše usmjerenje i labavost zglobova može biti povezana s povećanim rizikom za napredovanje OA koljena (110).

Dominick i sur. (111) su, koristeći rezultate genetske studije generaliziranog OA (od engl. *Genetics of Generalized Osteoarthritis Study*), pronašli inverznu povezanost između snage stiska šake i OA karpometakarpalnih zglobova te između snage pincetnog hvata i OA metakarpofalangealnih zglobova. S druge strane, veća snaga stiska šake je povezana s povećanim rizikom za nastanak radiološki dokazanog OA šake među sudionicima Framinghamske studije: muškarci s maksimalnom snagom stiska šake imaju povećani rizik za nastanak OA u proksimalnim interfalangealnim i metakarpofalangealnim zglobovima šake te karpometakarpalnom zglobu palca, dok žene s maksimalnom snagom stiska šake imaju povećani rizik za nastanak OA metakarpofalangealnih zglobova (112). Autori ovog rada sugeriraju da maksimalna sila koje djeluje na pojedine zglobove može utjecati na nastanak OA u tim zglobovima.

#### 1.4.2.2.6 Osovina (usmjerenje) ekstremiteta

Usmjerenje koljena (tj. kut kojeg čini sjecište linije koja spaja centar rotacije glave bedrene kosti sa sredinom koljena i linije koja spaja sredinu koljena sa sredinom gležnja) je ključna odrednica raspodjele opterećenja u ovom zglobu. Svaki odmak od normalnog usmjerenja utječe na raspodjelu opterećenja koljena. S obzirom na prethodno navedeno, za pretpostaviti je da poremećaj usmjerenja koljena može povećati rizik za nastanak, kao i progresiju OA u odnosu na koljena s normalnim usmjerenjem (15).

U prospektivnoj kohortnoj studiji, Sharma i sur. (113) su pokazali da je, u prisutnosti postojećeg OA koljena, abnormalno anatomske usmjerenje značajno

povezano s ubrzanim strukturalnim pogoršanjem u odjeljku pod najvećim tlačnim opterećenjem. Koljena s varus usmjerenjem (središte koljena je lateralno od osovine opterećenja donjeg ekstremiteta) na početku praćenja su imala četiri puta veći rizik za progresiju OA medijalnog odjeljka koljena, dok su ona koljena s valgus usmjerenjem (središte koljena je medijalno od osovine opterećenja donjeg ekstremiteta) na početku praćenja imala gotovo pet puta veći rizik za progresiju OA lateralnog odjeljka koljena. Isto istraživanje je također pokazalo da je utjecaj varus ili valgus usmjerenja koljena na rizik za progresiju OA bio veći u koljenima s težim oblikom radiološki dokazane bolesti nego li u koljenima s blagim ili umjerenim oblikom radiološki dokazane bolesti (114). Drugo istraživanje je pokazalo da je usmjerenje koljena bilo povezano s veličinom i progresijom oštećenja koštane srži kao i s ubrzanim gubitkom hrskavice na MR (115).

Veza između usmjerenja koljena i rizika od naglog nastupa OA koljena je manje jasna. Rezultati Rotterdamske studije su otkrili da među koljenima s K/L stupnjem 0 i 1, koljena s valgus usmjerenjem imaju 54% veći rizik, a koljena s varus usmjerenjem imaju dvostruko veći rizik za nastanak radiološki dokazanog OA u usporedbi s koljenima s normalnim usmjerenjem (116). Međutim, u Framinghamskoj studiji su korištene četiri mjere za usmjerenje koljena (anatomska os, kondilarni kut, kut platoa goljenice i kut između tangenti na površinu kondila femura i platoa goljenice) te nije pronađena povezanost niti za jednu od tih mjera s povećanim rizikom za nagli nastup radiološki dokazanog OA koljena (117). Autori ovog rada pretpostavljaju da usmjerenje ne može biti primarni čimbenik rizika za nastanak radiološki dokazanog OA koljena, već pokazatelj težine bolesti i/ili njene progresije.

#### 1.4.2.2.7 Laksitet (labavost) zglobova

Laksitet koljena predstavlja još jedan potencijalni čimbenik rizika za nastanak OA koljena. Kod varus ili valgus deformiteta koljena, laksitet koljena u bolesnika kod kojih je osteoartritisom zahvaćeno samo jedno koljeno je veći kod zdravog koljena u odnosu na koljeno zahvaćeno OA, sugerirajući tako da povećani laksitet koljena može prethoditi nastanku OA koljena kao i predisponirati nastanku ove bolesti (118). Također, antero-posteriorna labavost koljena može biti povećana kod osoba koje imaju blagi oblik OA, s time da se takva labavost smanjuje s progresijom OA koljena (119, 120).

Još jedan čimbenik koji može promijeniti biomehaniku koljena i kuka je nejednakost dužine donjih ekstremiteta (15). U Osteoartritis projektu okruga Johnston kod osoba s nejednakom dužinom donjih ekstremiteta (razlika od najmanje 2 cm u dužini) zamijećena je gotovo dva puta veća vjerojatnost za nastanak radiološki dokazanog OA koljena kao i 40% veća vjerojatnost da će te osobe imati određenu simptomatologiju koljenog zgloba (121). Rezultati multicentrične studije osteoartrisa (od engl. *Multicenter Osteoarthritis Study – MOST*) su također pokazali da nejednakost dužine donjih ekstremiteta  $\geq 1$  cm ne samo da je povezana s povećanom učestalošću radiološki dokazanog OA koljena, već je ista povezana i s povećanim rizikom od naglog nastupa simptomatskog i progresivnog OA koljena (122). Ovi rezultati ukazuju da nejednakost dužine donjih ekstremiteta predstavlja potencijalni čimbenik rizika za nastanak OA koljena.

#### 1.4.2.3 Rizični čimbenici za nastanak simptomatskog osteoartritisa

Iako je simptomatski OA koljena učestao, čineći manji ili veći stupanj nesposobnosti i stvarajući ogromne medicinske troškove, većina prethodnih studija je ipak bila usmjerena na čimbenike rizika za nastanak radiološki dokazanog OA (39). Naime, istraživanja su pokazala da nisu svi čimbenici rizika za nastanak radiološki dokazanog OA snažni predskazatelji zglobne simptomatologije (39, 42). Za žene s radiološki dokazanim OA koljena postoji veća vjerojatnost da će se razviti simptomatologija u odnosu na muškarce (123). Također, u Afroamerikanca je općenito zabilježena veća simptomatologija koljena i kuka nego li u bijelaca (34). Teške fizičke aktivnosti, a posebice one aktivnosti koje zahtijevaju klečanje, savijanje koljena, čučanje ili dugotrajno stajanje (102, 124), kao i ozljede koljena (125), također su povezane s visokom učestalosti simptomatskog OA koljena. Za osobe koje imaju uznapredovali oblik radiološki dokazanog OA postoji veća vjerojatnost da će navoditi bolove u zglobovima nego li one osobe s blažim oblikom radiološki dokazanog OA (24). Rezultati dviju opservacijskih studija su pokazali da postoji značajna povezanost stupnja uznapredovalosti radiološki dokazanog OA koljena s prevalencijom učestalosti, prisutnosti i jačine koljenske boli (126). Nadalje, suženje zglobne pukotine je značajnije povezano sa svakom od mjera boli (učestalost, prisutnost i jačina) nego li s prisutnošću osteofita.

Brojne studije su pokazale da je nekoliko morfoloških i patoloških promjena otkrivenih MR, kao što su lezija koštane srži (127, 128), sinovitis (129, 130), zglobni izljev (129) ili periartikularne lezije (131) koljena, povezano s koljenskom boli, za razliku od drugih studija čiji rezultati nisu potvrdili povezanost lezije koštane srži i koljenske boli (132).

Iako se bol u zglobu zahvaćenog OA odavno smatra kroničnom, ona nije nužno i konstanta (15). Naime, liječnici često primjećuju da bolesnici s OA imaju epizode rekurentne boli ili pogoršanja boli tijekom ove bolesti; bol koja se javlja u zglobu zahvaćenim OA često se pogoršava prilikom aktivnosti zahvaćenog zgloba, a smanjuje prilikom mirovanja (15). Takvi obrasci pojave boli u OA su promatrani u epidemiološkim studijama. Jedna od takvih studija je i studija Goberman-Hilla i sur. (133), koji su izvijestili da je bol u zglobovima među ispitanicima s OA koljena ili kuka često intermitentna i varijabilna te da strategije prilagodbe na bol i izbjegavanje boli mijenjaju doživljaj boli. Zbog metodoloških i logističkih poteškoća, provedeno je nekoliko studija koje su ispitale dinamičan odnos između čimbenika rizika i fluktuacije boli u OA. Jedna od takvih studija je koristila tjedne telefonske intervjuje tijekom 12 tjedana kako bi se procijenio utjecaj fluktuacije boli u koljenu ili kuku (134). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su takve fluktuacije bile česte te da su zamijećene u oko 49% osoba, dok je smanjenje boli bilo povezano s poboljšanom funkcijom, smanjenjem izostajanja s posla, smanjenjem remećenja sna i smanjenjem korištenja resursa zdravstvene skrbi.

#### 1.4.3 Genetska epidemiologija osteoartritisa

Genetska epidemiologija proučava genetske čimbenike koji određuju distribuciju i dinamiku bolesti u populaciji koristeći različite metoda analize (135). S pojavom genotipizacije visoke propusnosti (od engl. *high-throughput genotyping*) postalo je moguće genotipiziranje (analiza varijacije DNA sekvenci) preko milijun točkastih polimorfizama (od engl. *single nucleotide polymorphism*; SNP) po osobi kao i genotipiziranje na desetke ili tisuće osoba u jednoj studiji (136). Prethodno navedeno,

kao i činjenica da trenutne SNP mape obuhvaćaju preko 85% genoma u bjelačke populacije (137), znači da pristup analize udruženosti genoma ima potencijal otkriti genetski doprinos kod kompleksnih ljudskih bolesti kao što je osteoartritis (136). Etiološki uvid koji omogućuju takva istraživanja trebao bi dovesti do poboljšanja dijagnostičkih i prognostičkih mogućnosti kao i omogućiti razvoj mnogo specifičnije terapije za osteoartritis velikih zglobova.

Jedan od prvih pokazatelja da postoji genetska predispozicija za osteoartritis poznata je još od 1941.g. (Tablica 2, studija pod rednim brojem 1, označena zelenom bojom) (138). Naime, Stecher je primijetio češću pojavu Heberdenovih čvorova (vretenastih zadebljanja osteoartritisom promijenjenih distalnih interfalangealnih zglobova šake) u pojedinim obiteljima. U svom radu zaključuje da je taj fenotip naslijeđen kao dominantna osobina sa snažnom prevagom u korist ženskog spola te postavlja koncept po kojem je OA nasljedna bolest. Daljnje studije obitelji (Tablica 2, studije pod rednim brojevima 2-7, označene zelenom bojom) su pokazale da se nodalni OA (iznenadna pojava otekline, bolova i crvenila u području distalnih interfalangealnih zglobova šake osoba ženskog spola starijih od 45 godina) često javlja u sklopu generaliziranog OA te se, na temelju rezultata tih studija, predložilo poligeno nasljeđe za OA, definiravši time OA kao kompleksnu (poligeno) bolest (138-144).

**Tablica 2.** Popis odabranih epidemioloških studija osteoartritisa u razdoblju od 1941. – 2000.

Redni broj	Referencija	Zemljopisno podrijetlo	Lokalizacija osteoartritisa (OA)
1	138	SAD	OA šake
2	139	SAD	OA šake
3	140	UK	OA šake
4	141	UK	OA šake
5	142	UK	Generalizirani OA

6	143	UK	Generalizirani OA
7	144	UK	Generalizirani OA
8	145	SAD	Generalizirani OA (OA šake i koljena)
9	58	UK	Generalizirani OA (OA šake i koljena)
10	146	Švedska	OA kuka
11	147	UK	OA koljena i kuka
12	148	UK	OA kuka
13	149	Island	OA kuka
14	150	SAD	OA kralješnice
15	151	Japan	OA kralješnice
16	152	Italija	OA kralješnice
17	153	SAD	OA kralješnice
18	57	UK	OA koljena i šake
19	154	UK	OA vratne i slabinske kralješnice
20	61	UK	OA kuka

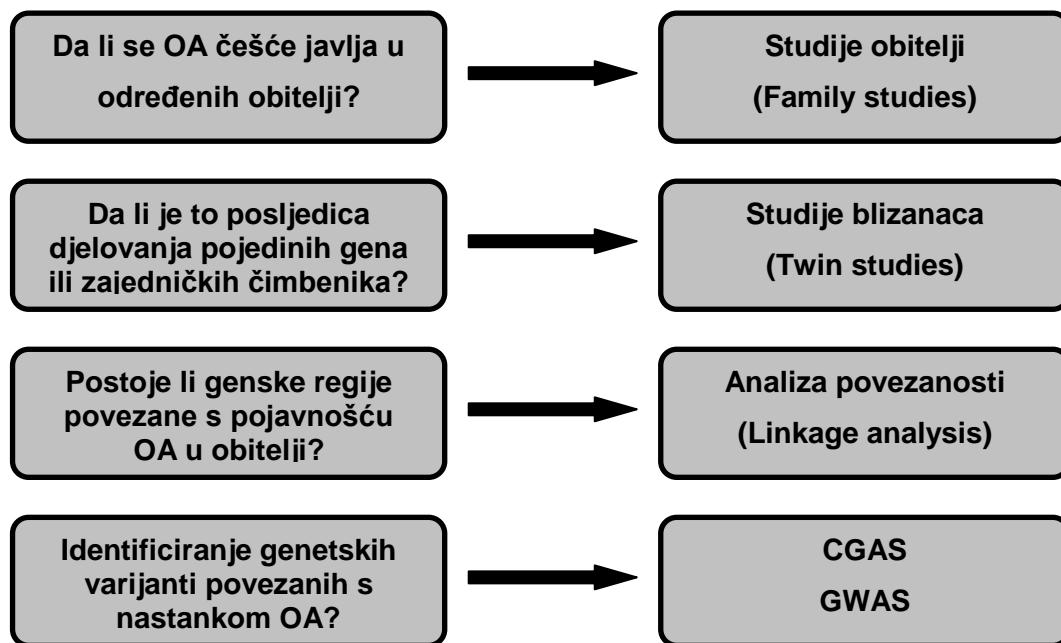
Da bi se potvrdila uloga različitih gena u razvoju OA, provedene su brojne daljnje epidemiološke studije (Tablica 2, studije pod rednim brojevima 8-17, označene plavom bojom) (58, 145-153). Te su studije uključile one obitelji u kojih je zamijećena češća pojava OA šake, koljena, kuka i kralješnice. Rezultati ovih studija potvrdili su značajan utjecaj nasljeđa u nastanku OA. Međutim, epidemiološke studije često imaju 2 osnovna manjka: nedovoljan broj podataka te mogućnost da na rizik za nastanak OA mogu utjecati čimbenici okoliša koji su nepoznati, nezabilježeni ili se teško mogu potvrditi jer su dobiveni anamnestički (kao što je npr. vrsta zanimanja bolesnika, itd.).

Zbog tih se razloga genetska podloga za nastanak potencijalno nasljednih bolesti (u ovom slučaju OA) dokazuje studijama blizanaca (Tablica 2, studije pod rednim brojevima 18-20, označene crvenom bojom) (57, 61, 154). U tim se studijama uspoređuje učestalost pojave bolesti u monozigotnih u odnosu na dizigotne blizance.

Kako monozigotni blizanci dijele 100% njihovog genetskog materijala, bilo koja zamijećena konkordancija (prisutnost iste osobine, tj. bolesti u oba člana para blizanaca) u incidenciji pojave bolesti odražava se i na genetski rizik od nastanka takve bolesti te se izračunava rizik od nastanka takve bolesti u odnosu na konkordanciju zamijećenu kod dizigotnih blizanaca koji dijele samo 50% njihova genetskog materijala. Rezultati ovih studija su pokazali, nakon korekcije poradi poznatih drugih čimbenika rizika (kao što su pretilost, vrsta zanimanja, sportske aktivnosti, itd.), da se nastanak 74% radiološki dokazanog OA slabinskog dijela kralježnice, 73% radiološki dokazanog OA vratnog dijela kralježnice, 65% radiološki dokazanog OA šake, 60% radiološki dokazanog OA kuka i 39 % radiološki dokazanog OA koljena u osoba ženskog spola može pripisati genetskim čimbenicima neovisno o poznatim predisponirajućim čimbenicima kao što su čimbenici okoliša ili demografski čimbenici (136). Klasične studije blizanaca i studije obitelji također su istraživale genetski doprinos redukciji volumena hrskavice kod radiološki dokazanog OA (155), kao i genetski doprinos kod progresije radiološki dokazanog OA (156).

Postoji nekoliko mogućih strategija koje se mogu koristiti kako bi se istražila uloga genetike u OA, a to su: studije obitelji, studije blizanaca, analiza povezanosti, studije gena kandidata, studije udruženosti genoma (Slika 6) i meta-analize (136, 157-162). Kako su u ovom poglavlju već opisane studije obitelji i studije blizanaca, u narednim potpoglavljima biti će detaljnije opisane analiza povezanosti, studije gena kandidata, studije udruženosti genoma i meta-analize kao strategije za istraživanje uloge genetike u nastanku OA.





**Slika 6.** Vrste genetskih studija. Skraćenice: CGAS – Candidate Gene Approach Studies (Studije gena kandidata), GWAS – Genome-Wide Association Studies (Studije udruženosti genoma), OA – Osteoarthritis.

(Modificirano iz: Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. *Med Clin North Am* 2009;93(1):45-66, x.)

#### 1.4.3.1 Analiza povezanosti i uloga genetike u nastanku OA

U genetici, pojam genski lokus odnosi se na određeno mjesto na kromosomu ili DNA koje obično sadrži jedan ili više gena (160). U populaciji se zbog mutacija DNA i prirodnog probira jedan gen obično nalazi u više oblika. Višestruki oblici jednog gena određene vrste se nazivaju aleli. Ako aleli jednog genskog lokusa prelaze frekvenciju od 1% onda ih nazivamo polimorfizmima, u suprotnom se nazivaju mutacijama. Dakle, minimalna razlika između alela iznosi jedan nukleotid koji može biti deletiran, umetnut, ponovljen ili promijenjen (a potonji s najviše 3 različitih alela u populaciji, jer postoje

samo 4 nukleotida). Kada se proučavaju specifični aleli na dva ili više susjednih lokusa u kromosomu, onda se takva specifična kombinacija alela naziva haplotip. Polimorfizmi i mutacije nekog lokusa zovu se također i genetski markeri. Polimorfizam jednog nukleotida se obično naziva i točkastim polimorfizmom (SNP), a to je dio DNA (iznad 1% zastupljenosti u populaciji) kojem je zamijenjena jedna nukleotidna baza s nekim drugim nukleotidom (ili pak najviše tri u ostalim alelima). Kada se uspoređuju aleli na lokusu između dvije osobe, oni mogu biti identični po porijeklu ako alel dolazi od istog roditelja (ili pretka), ili identični po stanju (npr. ako je jedan bolesnik dobio alel od majke i njegov/njezin brat/sestra dobio identičan alel od oca) (160).

Genetska povezanost je izraz kojim se objašnjava nalaz veće zastupljenosti određenog genskog lokusa kod skupine ljudi s određenom osobinom ili bolešću (u ovom slučaju OA). *Linkage disequilibrium* ili disekvilibrij povezanosti (npr. dva markera na susjednim odsječcima nekog kromosoma) je pojava da se aleli naslijeđuju zajedno češće nego normalno, što znači da se njihovi genetski markeri naslijeđuju kao jedinstveni blok (koji se zbog nekog razloga opire normalnoj frekvenciji *crossing over*-a tijekom mejoze). Dakle, genetski markeri se mogu koristiti kao alat za praćenje uzorka naslijeđa gena koji kodiraju neki ili neke proteine, a ovi izražavaju određenu fenotipsku osobinu ili sklonost nekoj bolesti.

Kako bi se identificirala kromosomska regija koja nosi gene povezane s nastankom OA, istraživači se koriste parovima srodnika (braća i sestre) koji su oboljeli od OA. (160). Kada je udio alela identičnih po porijeklu, a koje prvi srodnici konkordantni za OA dijele za određeni marker, veći od očekivanog, zaključeno je da je taj marker po svojoj kromosomskoj lokalizaciji blizu genima odgovornim za nastanak OA na kromosomu, odnosno da je pronađena značajna povezanost s OA.

Do sada je objavljeno nekoliko analiza putem probira 0.5 milijuna genskih markera (uglavnom SNP-ova) da bi se uvidjela povezanost genoma (od engl. *genome-wide association screening* ili *genome-wide linkage analysis*) manjeg broja obitelji ili blizanaca u srodstvu s osobama oboljelim od OA iz Ujedinjenog Kraljevstva (163-165), Finske (166), Islanda (167, 168) i Sjedinjenih Američkih Država (169, 170). Ove analize povezanosti genoma su provedene na bolesnicima s utvrđenim OA kuka, koljena ili šake te su identificirani brojni genomske intervale koji mogu nositi predispoziciju za nastanak OA na kromosomima 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 13, 15, 16, 19 i na kromosomu X (Tablica 3).

**Tablica 3.** Kromosomske regije identificirane analizama povezanosti genoma koje su provedene u obiteljima sa srođnicima oboljelih od osteoartritisa (OA) – odabrane publicirane studije.

(Modificirano iz: Valdes AM, Spector TD. *The contribution of genes to osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am* 2008;34(3):581-603.)

Kromosom	Ref.	Citogenetska lokalizacija	Geni u regiji povezani s OA	Analiza povezanosti	Povezanost s osobinom
1	169, 170	1p32-p22	-	SAD	OA šake
	165	1q42.12-1q42.13	-	UK	OA šake
2	166	2q12-2q21	IL1	Finska	OA šake, koljena i kuka
	163, 164	2q31.1-2q34	FRZB	UK	OA kuka
	167-170	2p23.2-2p16.2	MATN3	Island, SAD	OA šake
	165	2p13.2-2p14	-	UK	OA šake
3	167, 168	3p22.2-3p14.1	-	Island	OA šake
	165	3p25.1-3p25.2	-	UK	OA šake
4	166, 167	4q26-4q32.1	-	Finska, Island	OA šake
6	163, 164	6p21.1-6q15	BMP5, HLA	UK	OA kuka
7	169, 170	7q34-7q36.3	-	SAD	OA šake
	166	7p15-7p21	-	Finska	OA šake

11	163, 164	11p12- 11q13.4	LRP5	UK	OA kuka
13	169, 170	13q33.1- 13q34	-	SAD	OA šake
15	169, 170	15q21.3- 15q26.1	-	SAD	OA šake
16	163, 164, 167, 168	16p13.1- 16q12.1	IL4R	Island, UK	OA kuka
	163, 164	16q22.1- 16q23.1	-	UK	OA koljena i kuka
19	163, 164, 169, 170	19q13	-	SAD, UK	OA šake
	165	19q13.2	-	UK	OA šake
X	166	Xcen	-	Finska	OA šake
<p>Legenda: <b>BMP5</b> - Bone morphogenetic protein 5 gene (gen koji kodira Koštani morfogenetski protein 5), <b>FRZB</b> - Frizzled-related protein gene (gen koji kodira Frizzled-vezani protein), <b>HLA</b> - Human leukocyte antigen gene family (obitelj gena koja kodira Humane leukocitne antigene), <b>IL1</b> – Interleukin-1 gene (gen koji kodira Interleukin-1), <b>IL4R</b> - Interleukin-4 receptor gene (gen koji kodira Interleukin-4 receptor), <b>LRP5</b> - low density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (gen koji kodira receptor-vezani lipoprotein 5 male gustoće), <b>MATN3</b> – Matrilin-3 gene (gen koji kodira Matrilin-3), <b>Ref.</b> – Referencija, <b>SAD</b> - Sjedinjene Američke Države, <b>UK</b> - Ujedinjeno Kraljevstvo, <b>Xcen</b> – centromera X kromosoma.</p>					

Lee i sur. (171) su učinili meta-analizu analiza povezanosti genoma za OA koja je uključila 893 obitelji (3000 bolesnika) s OA iz tri prethodno proučavane populacije (Island, Ujedinjeno Kraljevstvo i Sjedinjene Američke Države). Njihova analiza je obuhvatila sve lokuse povezane s nastankom OA u tim analizama povezanosti genoma. Na temelju njihovih rezultata, autori su zaključili da genetske regije u područjima kao što su 7q34-7q36.3, 11p12-11q13.4, 6p21.1-6q15, 2q31.1-2q34 i 15q21.3-15q26.1 najvjerojatnije sadrže gene koji predisponiraju nastanku OA.

Kromosomske regije identificirane analizama povezanosti genoma prikazane su sažeto u tablici 3. Neki od intervala identificiranih analizama povezanosti genoma su naknadno podvrgnuti analizama udruženosti, prvenstveno studijama gena kandidata (od

engl. *Candidate gene approach studies – CGAS*) i to interleukin-1 (IL1) obitelj gena, kromosom 2q11-q13; matrilin-3 (MATN3) gen, kromosom 2p24.1; interleukin-4 receptora (IL4R) gen, kromosom 16p12.1; frizzled-vezani protein (FRZB) gen, kromosoma 2q32.1 te gen koji kodira koštani morfogenetski protein 5 (BMP5), kromosom 6p12.1. Nešto više o studijama gena kandidata i ulozi genetike u nastanku OA biti će navedeno u narednom potpoglavlju.

#### 1.4.3.2 Studije gena kandidata i uloga genetike u nastanku OA

Studije gena kandidata usmjerene se na istraživanje promjena u pojedinim genima, što zahtijeva poznavanje funkcije tog gena i njegovu moguću ulogu u patološkom procesu pojedine bolesti (172). Kada se govori o osteoartritisu, ove studije se koriste za probir velikog broja ispitanika za mutacije u pojedinim genima za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u nastanku OA (173).

Detaljnim proučavanjem brojnih objavljenih preglednih članaka iz područja genetike OA perifernih zglobova, došlo se do spoznaje da su, zaključno do kraja 2006.g., u literaturi objavljene 94 značajne povezanosti s nastankom OA perifernih zglobova u 83 različita gena (174). Od toga, samo je u 14 slučajeva bila ponovljena značajna povezanost s nastankom OA i u drugim studijama. Neki od tih gena kandidata povezanih s nastankom OA navedeni su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Geni kandidati povezani s nastankom osteoartritisa (OA) – odabrane publicirane studije.

*(Modificirano iz: Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. Curr Genomics 2008;9(8):542-7.)*

<b>Gen</b>	<b>Fenotipska manifestacija</b>	<b>Referencije</b>
COL11A1 (Kolagen, tip 11, $\alpha$ 1)	Rana pojava OA	175, 176
COL11A2 (Kolagen, tip 11, $\alpha$ 2)	Rana pojava OA	177
COL1A1 (Kolagen, tip 1, $\alpha$ 1)	Usporavanje OA kuka u žena	178
COL2A1 (Kolagen, tip 2, $\alpha$ 1)	Rana pojava OA	178-180
COL9A1 (Kolagen, tip 9, $\alpha$ 1)	Rana pojava OA	181, 182
COMP (Hrskavični oligomerni matriks protein)	Rana pojava OA	180, 183
IL1 (Interleukin 1 genska obitelj; IL1A, IL1B, IL1RN)	OA koljena i kuka	182, 184
<i>IL6</i> (Interleukin 6)	OA kuka	185
IL17 (Interleukin 17 gen; IL17A, IL17F)	Predispozicija za nastanak OA	186
IL4R (Interleukin 4 receptor)	OA kuka u žena	187
ESR1 (Estrogen receptor alfa)	OA u žena	188, 189
VDR (Vitamin D receptor)	OA različitih zglobova	190-192
FRZB (Frizzled-vezani protein)	OA kuka u žena	180, 193, 194
ASP (Asporin)	OA koljena i kuka	180, 195, 196
ACAN (Agrekan)	OA šake	197
IGF1 (Inzulinu sličan čimbenik rasta 1)	↑ rizik za nastanak OA	179, 197, 198
TGFB1 (Transformirajući čimbenik rasta beta 1)	OA	197
TIMP3 (Tkivni inhibitor metaloproteinaze 3)	OA koljena i kuka	197
ADAM12 (ADAM metalopeptidazna domena 12)	OA koljena	199
LRCH1 (Domena ponavljanja bogata leucinom i kalponinskom homologijom 1)	OA koljena	200, 201
CALM1 (Kalmodulin 1)	OA kuka u japanskoj populaciji	180
MATN3 (Matrilin-3)	Rana pojava OA koljena i šaka	167
CILP (Hrskavični protein intermedijarnog sloja)	OA koljena u muškaraca	199
CLEC3B (Domena obitelji C-tipa lektina 3, član B)	OA koljena	199
BMP2 (Koštani morfogenetski protein 2)	Usporavanje OA koljena u žena	199

S obzirom na opsežnost objavljenih podataka u studijama gena kandidata i ulozi genetike u nastanku OA, u ovom potpoglavlju će biti proizvoljno navedene odbrane studije (vezane uz tematiku ovog doktorskog rada) kao i rezultati tih studija.

Među genima kandidatima koji imaju ulogu u nastanku OA čini se da važnu ulogu imaju geni koji kodiraju sintezu strukturalnih proteina vanstaničnog matriksa hrskavice, a posebice se to odnosi na one gene koji kodiraju sintezu kolagena tipa II (COL2A1) (178-180). Postoji mnogo razloga za pretpostavku da su promjene o ovom genu odgovorne za nastanak degenerativnih promjena zglobova zahvaćenih OA, kao što je udruženost različitih mutacija ovog gena s osteohondrodisplazijom ili ispravnom funkcijom COL2A1 gena koji kodira najzastupljenije proteine u vanstaničnom matriksu (179, 181, 202). Među preostalim genima koji kodiraju sintezu strukturalnih proteina vanstaničnog matriksa, kod određenih gena kandidata kao što su COL9A2, COL11A1, COL11A2 ili COMP, također je pronađena povezanost s predispozicijom za nastanak OA (176, 177, 183, 203). S druge strane, u literaturi su zabilježene i promjene u ovim genima koje imaju protektivnu ulogu za nastanak OA. Naime, studija Liana i sur. (204) ukazuje na povezanost između određenih mutacija COL1A1 gena i smanjene vjerojatnosti za nastanak OA kuka u žena. Međutim, u literaturi su objavljene i studije čiji rezultati govore u prilog tome da određeni geni koji kodiraju sintezu strukturalnih proteina vanstaničnog matriksa hrskavice ne povećavaju predispoziciju za nastanak OA (178, 182).

Brojne studije su dokazale važnost upalnog procesa u patofiziologiji OA (8, 205-209). Iako se za OA smatra da to nije klasični autoimuni proces, dokazano je da su različiti citokini uključeni u metabolizam hrskavice te da su sintetizirani ne samo od strane sinovijalnih stanica već da ih sintetiziraju i hondrociti (172). Naime, interleukin-1 (IL-1) predstavlja glavni proupalni i prokatabolički citokin koji postoji u zglobovima i

stimulira brojne proteinaze koje potom mogu razgraditi komponente vanstaničnog matriksa hrskavice. Sve dok su anaboličke i kataboličke aktivnosti citokina u ravnoteži, integritet hrskavice ostaje očuvan (172). Ukoliko postoje čimbenici koji potiču kataboličku aktivnost proupalnih citokina, nastaje degenerativni proces unutar hrskavice što ima za posljedicu nastanak OA (210). Iz svega prethodno navedenog, logično je za pretpostaviti da različiti geni koji kodiraju sintezu raznih interleukina mogu utjecati na genetsku predispoziciju za nastanak OA (211). Geni koji kodiraju sintezu citokina poput IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-4R, IL-6, IL-17A i IL-17F analizirani su u brojnim studijama u kojima je uočeno da su razne promjene u tim regijama DNA, uključujući polimorfizme jednog nukleotida, mikrosatelitna područja i varijabilni broj tandemskih ponavljanja, povezane s OA različitih lokalizacija (184-187, 212).

U neke od preostalih gena koji su uključeni u osteoartritični proces ubrajaju se oni koji kodiraju ESR1 (Estrogen receptor alfa), VDR (Vitamin D receptor), FRZB (Frizzled-vezani protein), ASP (Asporin), ACAN (Agrekan), IGF1 (Inzulinu sličan čimbenik rasta 1), TGF $\beta$ 1 (Transformirajući čimbenik rasta beta 1), TIMP3 (Tkivni inhibitor metaloproteinaze 3), ADAM12 (ADAM metalopeptidazna domena 12), LRCH1 (Domena ponavljanja bogata leucinom i kalponinskom homologijom 1), CALM1 (Kalmodulin 1), MATN3 (Matrilin-3), CILP (Hrskavični protein intermedijarnog sloja), CLEC3B (Domena obitelji C-tipa lektina 3, član B) i BMP2 (Koštani morfogenetski protein 2) (Tablica 4), ali i brojni drugi geni.

Zaključno, kada je riječ o studijama gena kandidata i ulozi genetike u nastanku OA, onda svakako treba napomenuti činjenicu da iako je do sada otkriveno više od 80 gena kandidata povezanih s nastankom OA raznih lokalizacija, samo je jedan od tih gena pokazao konzistentnu i snažnu povezanost (kod replikacija u drugim populacijama, meta-analiza i studija udruženosti genoma) s nastankom OA, a to je SNP



rs143383, koji se nalazi na 3' kraju netranslacijske regije (3'UTR) GDF5 gena (213). Čimbenik rasta i diferencijacije 5 (od engl. *Growth and differentiation factor 5 – GDF5*) je izvanstanična signalna molekula i član TGF- $\beta$  superobitelji. On sudjeluje u razvoju, održavanju i obnavljanju tkiva sinovijalnih zglobova (214). Polimorfizam rs143383, koji je karakteriziran s C i T alelom, je 2007.g. povezan s predispozicijom za nastanak OA, nakon čega su ubrzo uslijedile i druge studije koje su izvijestile o povezanosti ovog gena s OA, kao i brojne meta-analize koje nisu ostavile mjesta sumnji o udruženosti ovog gena s nastankom OA (213, 215-218).

Upravo činjenica da je, od svih do sada učinjenih studija gena kandidata i ispitivanja povezanosti s predispozicijom za nastanak OA, samo jedna od njih (GDF5 gen) izdržala opsežna i detaljna ispitivanja upućuje na zaključak da je pogrešno smatrati da postoji samo jedan ključan alel (nekog gena) za nastanak sklonosti za OA, ali i naglašava naše prilično rudimentarno znanje o uzroku nastanka OA. Također, ova činjenica ujedno i opravdava agnostički pristup studija udruženosti genoma (od engl. *Genome-wide association study - GWAS*) u istraživanju predispozicije za nastanak OA (219).

#### 1.4.3.3 Studije udruženosti genoma i uloga genetike u nastanku OA

Studije udruženosti genoma (GWAS) predstavljaju relativno novi način identificiranja gena odgovornih za nastanak pojedine bolesti u humanoj populaciji. Ova metoda pretražuje kroz cijeli genom učestalost genetskih markera (uglavnom u formi polimorfizama jednog nukleotida, ali i nekih drugih poput delecija ili insercija nukleotida), a koji se pojavljuju mnogo češće unutar genoma osoba koje boluju od određene bolesti u odnosu na osobe koje ne boluju od iste bolesti. Svaka takva studija

može istovremeno pretražiti stotine tisuća pa čak i više milijuna SNP-a. Istraživači koriste podatke iz GWA studija kako bi točno odredili kromosomalnu regiju (koja često sadrži desetke pa čak i do stotine različitih gena) od kojih možda samo jedan gen ili pak neki drugi funkcionalni dio DNA (kao npr. mikroRNA ili regulatorne sekvence koje vežu nuklearne faktore) može pridonijeti riziku za nastanak određene bolesti. Kako GWA studije pretražuju polimorfizme duž cijelog genoma, one predstavljaju obećavajući način istraživanja kompleksnih i čestih bolesti u kojima mnoge genetske varijacije pridonose visokom riziku za nastanak takvih bolesti (220). Međutim, njihovi nedostaci su dvojak: 1) premda mogu pronaći regije kromosoma s visokom rizičnošću za neku bolest, ne mogu točno detektirati pojedine gene u tom lokusu (međutim, to je ovisno o koncentraciji genetskih markera upotrebljenih u studiji, odnosno probiru), i 2) takve studije su «slijepe» za genetske sklonosti srednje rizičnosti (npr. one s rizikom od 1.2 do 3 puta) u bolestima s kompleksim (poligenetskim) naslijeđivanjem.

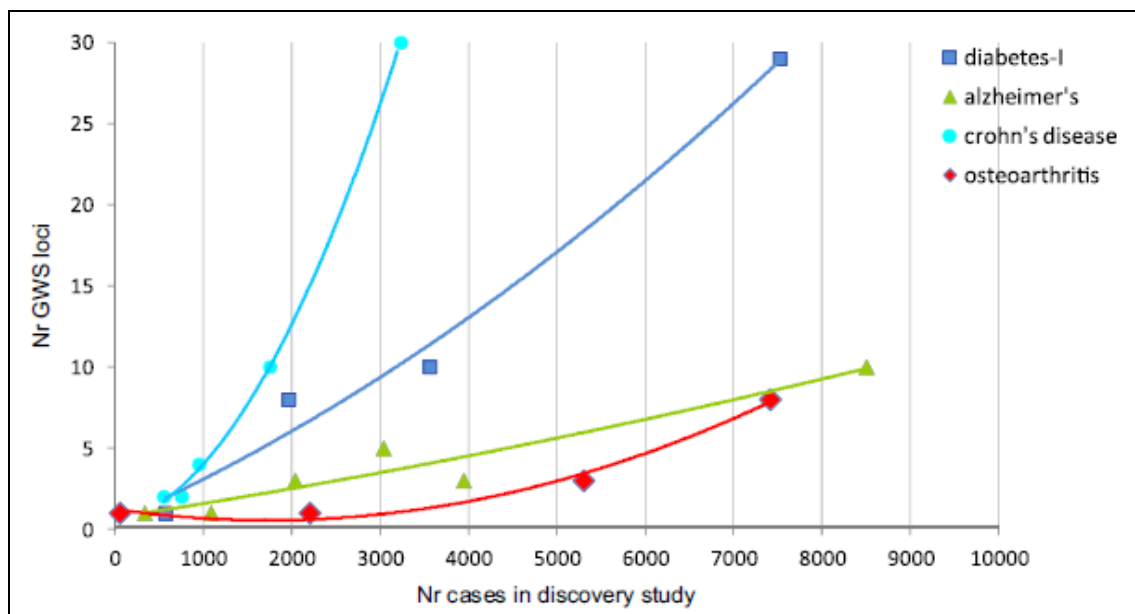
GWA studije se uspješno primjenjuje u proučavanju mnogih složenih bolesti te je u manje od 5 godina identificirano više od 1500 lokusa koji su povezani s predispozicijom za nastanak pojedine bolesti i kvantitativnih svojstava (tj. fenotipskih karakteristika) (221). Do sada je publicirano nekoliko GWA studija za OA (Tablica 5).

**Tablica 5.** Popis do sada objavljenih studija udruženosti genoma (GWAS) s osteoartritisom (OA).

Ref.	IVU	RVU	R	OG	MG	NSA	<i>p</i>	OR ili $\beta$ i [95% CI]
222 <sup>a</sup>	94 (I), 633 (K)	334 (I), 375 (K)	14q24- q31	CALM1	CALM1	rs3213718	9.8 x 10 <sup>-7</sup>	2.40 [1.43-4.02]
201 <sup>b</sup>	335 (I), 335 (K)	443 (I), 303 (K)	13q14	LRCH1	LRCH1	rs912428	7.8 x 10 <sup>-3</sup>	1.44 [1.10-1.89]
		346 (I), 264 (K)						
223 <sup>b</sup>	94 (I), 658 (K)	242 (I), 485 (K)	3p24.3	DVWA	DVWA	rs11718863	7.3 x 10 <sup>-11</sup>	1.43 [1.28-1.59]
	646 (I),	417 (I),				rs7639618		

	631 (K)	413 (K)						
224 <sup>b</sup>	357 (I), 285 (K)	1177 (I), 2372 (K)	1q31.1	PTGS2, PLA2G4A	PTGS2, PLA2G4 A	rs4140564	3 x 10 <sup>-6</sup>	1.59 [1.31-1.94]
			2q33.3	PARD3B	PARD3B	rs1207421	6 x 10 <sup>-6</sup>	1.46 [1.24-1.73]
225 <sup>c</sup>	1804 (I)	3266 (K)	16p13.3	A2BP1	A2BP1	rs716508	1.81 x 10 <sup>-5</sup>	-0.12
62 <sup>a-c</sup>	1341(I), 3496 (K)	13597 (I), 40000 (K)	7q22.3	COG5	COG5	rs3815148	8 x 10 <sup>-8</sup>	1.14 [1.09-1.19]
226 <sup>b</sup>	899 (I), 3396 (K)	167 (I), 347 (K)	6p21.32	BTNL2	BTNL2	rs10947262	5 x 10 <sup>-9</sup>	1.31 [1.20-1.44]
		243 (I), 426 (K)		HLA- DQA2				
		570 (I), 645 (K)		HLA- DQB1				
227 <sup>a, b</sup>	3177 (I), 4894 (K)	10525 (I), 48392 (K)	22q11.2 1	MICAL3	MICAL3	rs2277831	2.3 x 10 <sup>-5</sup>	1.07 [1.04-1.11]
			6p21.1	C6orf130	C6orf130	rs11280	3.2 x 10 <sup>-5</sup>	1.10 [1.05-1.16]
			1p21	COL11A1	COL11A 1	rs2615977	1.1 x 10 <sup>-5</sup>	1.10 [1.05-1.15]
228 <sup>a, b</sup>	3177 (I), 4894 (K)	15864 (I), 19610 (K)	13q34	MCF2L	MCF2L	rs11842874	2 x 10 <sup>-8</sup>	1.17 [1.11-1.23]
229 <sup>a</sup>	6523 (I)	4442 (I)	19p13.3	DOT1L	DOT1L	rs12982744	1.1 x 10 <sup>-11</sup>	0.09 [0.06-0.11]
230 <sup>a, b</sup>	7410 (I), 11009 (K)	7473 (I), 42938 (K)	3p21.1 6p21.1 1q41 16q12.2	GNL3, GLT8D1	GNL3; PBRM1	rs11177	5 x 10 <sup>-9</sup>	1.09 [1.06-1.12]
				SUPT3H, CDC5L	CDC5L - SUPT3H	rs10948172	6 x 10 <sup>-7</sup>	1.08 [1.05-1.12]
				NR	LYPLAL 1 - ZC3H11 B	rs1417066	1 x 10 <sup>-6</sup>	1.07 [1.04-1.10]
				FTO	FTO	rs8044769	4 x 10 <sup>-6</sup>	1.07 [1.04-1.10]
<p>Legenda: <b>β</b> – Regresijski koeficijent, <b>GWAS</b> – Genome-wide associaton study (Studija udruženosti genoma), <b>I</b> – Ispitanici, <b>IVU</b> – Inicijalna veličina uzorka, <b>K</b> – Kontrole, <b>MP</b> – Mapirani gen(i), <b>NSA</b> – Najjači SNP-rizičan alel, <b>OG</b> – Objavljeni gen(i), <b>OR</b> – Odds ratio (Omjer izgleda), <b>p</b> – p-vrijednost, <b>R</b> – Regija, <b>Ref.</b> – Referencija, <b>RVU</b> – Replikacijska veličina uzorka.</p> <p><sup>a</sup>Studija provedena na ispitanicima s OA kuka</p> <p><sup>b</sup>Studija provedena na ispitanicima s OA koljena</p> <p><sup>c</sup>Studija provedena na ispitanicima s OA šake</p>								

Iz prethodno navedene tablice razvidno je da je broj objavljenih genskih lokusa, a za koje je pronađena snažna povezanost s OA, do kraja 2012.g. relativno mali. Razlog tome je najvjerojatnije nedostatak snage studija (od engl. *study power*). Naime, snaga studije u genetskim epidemiološkim studijama je ovisna o veličini uzorka i fenotipskoj heterogenosti (Slika 7) (231).



**Slika 7.** Snaga genetskih studija ovisna je o veličini ispitivanog uzorka i fenotipu. Broj GWAS "pogodaka" (SNPs sa  $p < 5 \times 10^{-8}$ ) kao funkcija veličine uzorka ispitivane skupine za nekoliko glavnih kompleksnih bolesti uključujući osteoarthritis (OA). Skraćenice: Nr cases in discovery cohort – Broj ispitanika u studiji, Nr GWAS loci – Broj GWAS (genome-wide association studies - studija udruženosti genoma) genskih lokusa.

(Preuzeto iz: van Meurs JB, Uitterlinden AG. Osteoarthritis year 2012 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(12):1470-6.)

Što se tiče veličine ispitivanog uzorka u GWA studijama za OA, u svim GWA studijama koje su objavljene do početka 2010.g. veličina ispitivanog uzorka bila je srednje velika (do 5070 ispitanika i kontrola u fazi otkrivanja suspektih genskih lokusa) (Tablica 5). U ostalim bolestima u humanoj populaciji opće je prihvaćena pretpostavka da je nužna međunarodna suradnja kako bi se postigla potrebna veličina uzorka za GWA studiju (231). Primjeri takve međunarodne suradnje koja je rezultirala potrebitom veličinom ispitivanog uzorka su DIAGRAM konzorcij (dijabetes, >45 000 osoba) (232), CARDIOGRAM/C4D konzorcij (65 000 ispitanika s koronarnom bolesti

srca i 130 000 kontrola) (233, 234) i do sada najveći poznati GIANT-konzorcij koji je pregledao antropometrijske karakteristike u >250 000 osoba (235). Kada je riječ o OA, postoji nekoliko poznatih inicijativa za suradnju kako bi se dosegla željena veličina ispitivanog uzorka potrebna kako bi se pronašli novi i značajni GWAS genski lokusi uključeni u nastanak OA. Rezultati takve, do sada najveće zabilježene međunarodne suradnje za istraživanje OA, u kojem je uspostavljena suradnja između arcOGEN i TREAT-OA konzorcija objavljeni su krajem 2012.g. (230). U toj GWA studiji, u kojoj je inicijalna veličina ispitivanog uzorka bila veća od 7000 ispitanika s OA, identificirano je 9 novih genskih lokusa uključenih u nastanak OA (Tablica 5, referencija 230). Ova je studija pokazala da veći ispitivani uzorak rezultira identificiranjem većeg broja genskih lokusa,

Druga karakteristika o kojoj ovisi snaga studije u genetskim epidemiološkim studijama je fenotipska heterogenost. Naime, upravo Slika 7 pokazuje da postoje velike razlike u broju identificiranih genskih lokusa između različitih fenotipova. Tako je kod Crohnove bolesti pronađeno na desetke genskih lokusa u relativno malom broju ispitivanog uzorka, vjerojatno zbog male fenotipske heterogenosti. Za razliku od toga, kod Alzheimerove bolesti i OA je identificiran manji broj genskih lokusa unatoč relativno velikom ispitivanom uzorku, što govori u prilog tome da za ove bolesti postoji velika fenotipska heterogenost. Takva velika fenotipska heterogenost kod OA proizlazi iz činjenice da se dijagnoza ove bolesti postavlja na temelju kombinacije kliničkih parametara (bol i ograničena pokretljivost zglobova zahvaćenih OA) i stupnjevanja strukturalnog oštećenja zglobova pomoću široko primjenjivane K/L ljestvice koja uključuje procjenjivanje stvaranja nove kosti (osteofita) i procjenu stupnja degradacije hrskavice. Općenito, smatra se da je OA izuzetno heterogenog fenotipa s različito

definiranim statusom bolesti (u ovisnosti o njezinom stupnju uznapređovalosti) kao dodatnim izvorom fenotipske heterogenosti (236).

Zaključno, genetska istraživanja dobila su ogroman poticaj uvođenjem GWA studija kao tehnike za identifikaciju novih gena u kompleksnim bolestima. Za OA, GWA studije postaju sve uspješnije u identificiranju novih gena uključenih u nastanak ove bolesti. Taj uspjeh u budućnosti biti će i veći s povećanjem veličine ispitivanog uzorka i pravilnim određivanjem fenotipskih karakteristika OA (231).

#### 1.4.3.4 Meta-analize i uloga genetike u nastanku OA

Meta-analize predstavljaju statističku metodu kojom se matematički kombiniraju rezultati između pojedinih studija kako bi se poboljšala pouzdanost rezultata dobivenih individualnim studijama (237). Ova statistička metoda je postala popularna u procjeni uloge genetike u nastanku OA kako bi se premostile razlike u rezultatima pojedinih studija gena kandidata. Naime, kako se u studijama gena kandidata za koje postoji predispozicija za nastanak OA veličina ispitivanog uzorka kreće oko nekoliko stotina ispitanika i kontrola, genetski utjecaj je mali i postoje poteškoće u dobivanju značajnih (snažnih) rezultata koji se mogu ponoviti u nekoj drugoj populaciji. Osim toga, takve individualne studije gena kandidata, zbog male veličine ispitivanog uzorka, mogu imati malu statističku snagu, ali i dati lažno pozitivne rezultate (238). Meta-analiza, kao statistička metoda, ima svoje prednosti i nedostatke (kao i svaka druga statistička metoda) u utvrđivanju uloge genetike u nastanku OA o kojima će detaljnije biti raspravljano u poglavlju 5.

Do sada je u literaturi objavljeno svega 7 meta-analiza koje su analizirale ulogu genetike u nastanku OA. Prva takva meta-analiza objavljena je 2007.g. i analizirala je

povezanost D-ponavljajućih alela ASPN (Asporin) gena s predispozicijom za nastanak OA koljena i kuka u 6882 ispitanika (1370 slučajeva i 2296 kontrola u 6 studija s OA koljena te 1800 slučajeva i 1416 kontrola u 3 studije s OA kuka) u 5 različitih etničkih skupina (Grčka, Japan, Kina, Ujedinjeno Kraljevstvo i Španjolska) (239). Rezultati dobiveni ovom meta-analizom pokazali su da postoje etničke razlike u učinku ASPN gena na predispoziciju za nastanak OA. Autori ove studije u zaključku navode da su D-ponavljajući aleli ASPN gena globalno povezani s nastankom OA koljena, ali njegova veličina učinka pokazuje etničke razlike: veća je u Istočnim Azijata, a slabija u Europljana.

Godinu dana kasnije objavljena je slijedeća meta-analiza koja je analizirala ulogu genetike u nastanku OA (217). U toj su meta-analizi kombinirani podaci više od 11000 individua. Dobiveni rezultati pokazali su čvrsti dokaz za pozitivnu povezanost između SNP +1104T/C (rs143383) u 5'-UTR regiji GDF5 gena i OA u Europljana i Azijata. Ovi rezultati predstavljaju prvi značajan dokaz o postojanju čimbenika rizika za nastanak OA prisutnog u dvije značajno različite etničke grupe.

Treća meta-analiza koja je analizirala predispoziciju za nastanak OA objavljena je 2009.g. (240). U ovoj studiji prvo je genotipizirano 3 različita polimorfizma (rs7639618, rs11718863 and rs9864422) DVWA gena (kodira sintezu dvostrukog von Willebrandovog čimbenika A) u 1120 ispitanika s OA koljena, 1482 ispitanika s OA kuka i 2147 kontrola, od kojih su svi europskog podrijetla (Grčka, Nizozemska, Španjolska i Ujedinjeno Kraljevstvo). Potom su, kako bi procijenili globalni utjecaj, autori u studiju uključili izvorne podatke studije o povezanosti ovog gena s predispozicijom za nastanak OA koljena u Japanaca i Kineza (223). Meta-analizom je dokazana globalna povezanost polimorfizma rs7639618 s OA koljena (OR = 1.29, 95% CI = 1.15–1.45,  $p = 2.70 \times 10^{-5}$ ). Ovaj učinak pokazao je umjerenu heterogenost; naime,

polimorfizam rs7639618 nije pokazao zasebnu povezanost s OA koljena u Europljana (OR = 1.16, 95% CI = 0.99–1.35,  $p = 0.063$ ). Također, nije uočena zasebna povezanost s OA kuka u Europljana s  $p$ -vrijednosti 0.851. Rezultati ove meta-analize ukazuju na činjenicu da može postojati globalni utjecaj polimorfizma rs7639618 DVWA gena među osobama s OA koljena, no očigledna manja veličina učinka (engl. *effect size*) u kombinaciji s visokom frekvencijom rizičnog alela u Europljana ponovo naglašava etničke razlike u učinku otkrivenih gena uključenih u predispoziciju za nastanak OA.

2010. godine objavljene su 2 meta-analize koje su procijenile odnos između zajedničkih genetskih varijacija ESR2 (Estrogen receptor  $\beta$ ) gena i OA (241) te IL-1 regije i OA (242). Prva meta-analiza je uključila 2364 ispitanika s OA kuka, 1983 ispitanika s OA koljena, 1431 ispitanika s OA šake i gotovo 6000 kontrola uključenih u 7 različitih studija iz 4 različite etničke skupine (Grčka, Nizozemska, Španjolska i Ujedinjeno Kraljevstvo). U zaključku ove meta-analize autori navode da nije vjerojatno da postoji povezanost između zajedničkih genetskih varijanti ESR2 gena i OA kuka, koljena i šake iako se ne može isključiti povezanost s vrlo malom veličinom učinka (*effect size*). Druga meta-analiza procijenila je povezanost markera i haplotipova IL-1 regije i OA. U tu meta-analizu uključeno je 1238 ispitanika s OA kuka ili OA koljena ili OA šake i 1269 kontrola uključenih u 8 različitih studija iz 3 različite etničke skupine (Nizozemska, Sjedinjene Američke Države i Ujedinjeno Kraljevstvo). Autori u zaključku navode da rezultati ove meta-analize ne potvrđuju, ali upućuju da postoji određeni rizik za nastanak OA šake i kuka povezan s IL-1 regijom, osobito u IL1B genu i moguće u IL1RN genu.

Posljednje 2 meta-analize koje su procijenile ulogu genetike u nastanku OA objavljene su 2011.g. Prva od njih (243) je u svoju analizu uključila 4 GWA studije s inicijalnom veličinom uzorka od 2371 ispitanika s OA koljena i 35909 kontrola u



populaciji bijelaca. S kumulativnom veličinom uzorka od 6709 ispitanika s OA koljena i 44439 kontrola identificiran je jedan statistički značajan genski lokus na kromosomu 7q22 za OA koljena (rs4730250,  $p = 9.2 \times 10^{-9}$ ) potvrđujući svoju ulogu u predispoziciji za nastanak OA koljena. U drugoj meta-analizi iz 2011.g. (244), Kerkhof i sur. su željeli razjasniti utjecaj zajedničkih genetskih varijanti IL1B i IL1RN gena na rizik za nastanak OA koljena i OA kuka, kao i na uznapređovalost OA koljena. Za procjenu utjecaja zajedničkih genetskih varijanti IL1B i IL1RN gena na rizik za nastanak OA koljena i OA kuka, autori su u ovu meta-analizu uključili 3595 ispitanika s OA kuka i 6559 kontrola te 5013 ispitanika s OA koljena i 9132 kontrole uključenih u 8 različitih studija iz 3 različite etničke skupine (Estonija, Nizozemska i Ujedinjeno Kraljevstvo). Za procjenu uloge IL1RN haplotipa na uznapređovalost radiološki dokazanog OA koljena, u meta-analizu je uključeno 1918 ispitanika s OA koljena K/L stupnja 1 ili 2 i uspoređeno s 199 ispitanika s OA koljena K/L stupnja 3 ili 4. Zaključno, autori navode da zajedničke genetske varijante IL-1 regije nisu povezane s prevalencijom OA kuka i koljena, ali rezultati ove meta-analize upućuju da bi IL1RN gen mogao imati ulogu u stupnju uznapređovalosti OA koljena.

### **1.5 Etiopatogeneza osteoartritisa**

Posljednja i još uvijek važeća definicija osteoartritisa je ona iz 1995.g., koju su konsenzusom definirali stručnjaci na području ove bolesti iz Američke akademije ortopedskih kirurga (od engl. *American Academy of Orthopaedic Surgeons – AAOS*), Nacionalnog instituta za artritis, muskuloskeletalne i kožne bolesti (od engl. *National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases - NIAMS*), Nacionalnog instituta za starenje (od engl. *National Institute on Aging – NIA*), Zaklade za artritis (od

engl. *Arthritis Foundation*) i Zaklade za istraživanje i edukaciju u ortopediji (od engl. *Orthopaedic Research and Education Foundation - OREF*), a ona glasi:

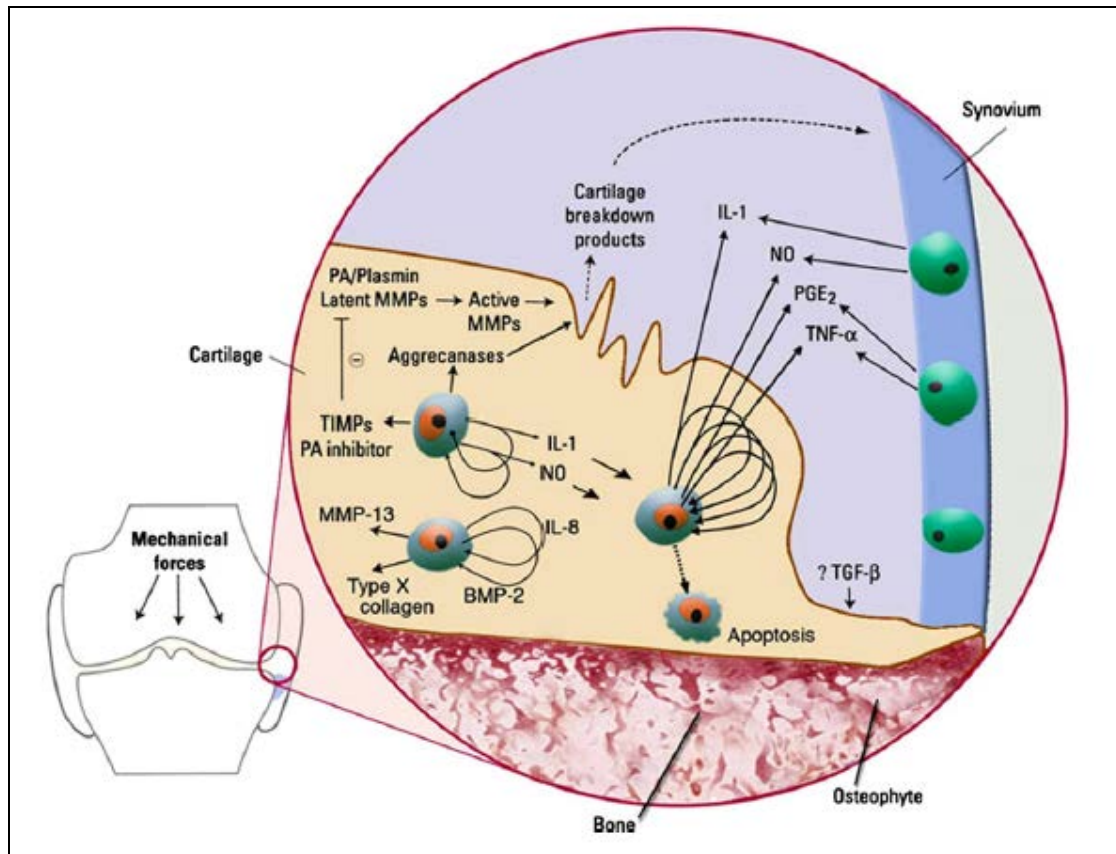
„Osteoartritis (OA) predstavlja grupu različitih preklapajućih bolesti koje mogu imati različiti uzrok nastanka, ali sličan biološki, morfološki i klinički ishod. Patofiziološki proces tijekom ove bolesti ne zahvaća samo zglobnu hrskavicu, već zahvaća cijeli zglob uključujući subhondralnu kost, ligamente, zglobnu čahuru, sinovijalnu membranu i periartikularne mišiće. Naposljetku nastaje degeneracija zglobne hrskavice s fibrilacijom, fisurama i ulceracijama te gubitak pune debljine hrskavice do subhondralne kosti. OA nastaje kao rezultat međudjelovanja mehaničkih i bioloških događaja koji destabiliziraju ravnotežu degradacije i sinteze hondrocita i vanstaničnog matriksa zglobne hrskavice, kao i subhondralne kosti. Brojni čimbenici, kao što su genetski, razvojni, metabolički i traumatski, dovode do započinjanja ove bolesti. Promjene tijekom OA zahvaćaju sva tkiva diartroidalnih zglobova. OA se u svojoj završnoj fazi manifestira morfološkim, biokemijskim, molekularnim i biomehaničkim promjenama stanica i matriksa što dovodi do razmekšavanja, fibrilacije, ulceracije i gubitka zglobne hrskavice, skleroze i eburnacije subhondralne kosti, stvaranja osteofita i subhondralnih cisti. Kada postane klinički evidentan, OA se manifestira bolom, napetošću, ograničenom pokretljivošću, krepitacijama i povremenom oteklinom zahvaćenog zgloba, kao varijabilnim stupnjem upale bez sistemskih učinaka (5).“

Prema Brandtu i sur. (245), ovakva inkluzivna definicija nudi za svakoga po nešto, ali nije od pomoći u razumijevanju etiopatogeneze OA. OA je najčešća bolest mišićno-koštanog sustava u srednjoj i starijoj životnoj dobi u razvijenim zemljama (2). Stoga je od posebne važnosti proučavanje patogeneze, kliničkog aspekta i liječenja ove bolesti, jer ima visoku incidenciju, prevalenciju i značajan medicinski, socijalni i

ekonomski utjecaj na društvo. Etiologija OA nije u potpunosti razjašnjena, a time i etiološko liječenje ove bolesti nije moguće. S obzirom na činjenicu da etiologija OA nije razjašnjena, glavni cilj liječenja je usporavanje, ili u najboljem scenariju, zaustavljanje napredovanja OA (3).

Brojna dosadašnja istraživanja unaprijedila su naše razumijevanje uzroka, čimbenika rizika, patofizioloških putova i mehanizama odgovornih za nastanak i progresiju OA (3). Kada je riječ o molekularnoj patogenezi OA, ovom bolesti je zahvaćen cijeli zglob (246). Naime, i hrskavica i sinovijalna membrana i kost mogu biti glavna mjesta proizvodnje citokina, čimbenika rasta, kemokina i medijatora upale koji potiču nastanak upale i progresivnu destrukciju zgloba zahvaćenog OA (206, 247). Destrukcija zgloba zahvaćenog OA primarno je okarakterizirana destrukcijom hrskavice kao posljedice upalnih promjena u samoj hrskavici na molekularnom nivou (8, 206). Abnormalno mehaničko opterećenje čini se da „budi“ hondrocite iz stanja niske metaboličke aktivnosti (248) i stimulira ove stanice na proizvodnju upalnih medijatora, od kojih mnoge proizvode makrofagi tijekom odgovora na ozljedu ili infekciju (8). U te upalne medijatore se ubrajaju brojni citokini i kemokini [kao što su IL-1, IL-6, IL-8 (Interleukin-8), IL-17, IL-18 (Interleukin-18), monocitni kemotaktični protein 1 (od engl. *Monocyte chemoattractant protein-1 – MCP-1*), čimbenik inhibicije leukemije (od engl. *Leukemia inhibitory factor – LIF*), s rastom povezani onkogen (od engl. *Growth-related oncogene – GRO*) i onkostatini M (od engl. *Oncostatin M – OSM*)], kao i reaktivne vrste kisika (od engl. *Reactive oxygen species – ROS*) (kao što su dušični oksid, superoksid, vodikov peroksid i peroksinitrit) (247). Svi prethodno navedeni medijatori upale zajedno s derivatima arahidonske kiseline (prostaglandini i leukotrieni) povećavaju kataboličku aktivnost hondrocita, što ima za posljedicu proizvodnju i

otpuštanje brojnih proteolitičkih enzima, uključujući agrekanaze i matriks metaloproteinaze, koje dovode do razgradnje hrskavičnog matriksa (247) (Slika 8).



**Slika 8.** Shematski prikaz molekularne patogeneze osteoartritisa (OA). Active MMPs – Aktivne matriks metaloproteinaze, Aggrecanases – Agrekanaze, Apoptosis – Apoptoza (programirana stanična smrt), Bone – Kost, Cartilage – Hrskavica, BMP-2 – Koštani morfogogenetski protein-2, Cartilage breakdown products – Proizvodi razgradnje hrskavice, IL-1 – Interleukin-1, IL-8 – Interleukin-8, Latent MMPs – Latentne matriks metaloproteinaze, Mechanical forces – Mehaničko opterećenje, MMP-13 – Matriks metaloproteinaza-13, NO – Dušični oksid, Osteophyte – Osteofit, PA inhibitor - Inhibitor aktivatora plazminogena, PA/Plasmin – Aktivator plazminogena/Plazmin, PGE<sub>2</sub> – Prostaglandin E<sub>2</sub>, Synovium – Sinovijalna membrana, TGF-β – Čimbenik

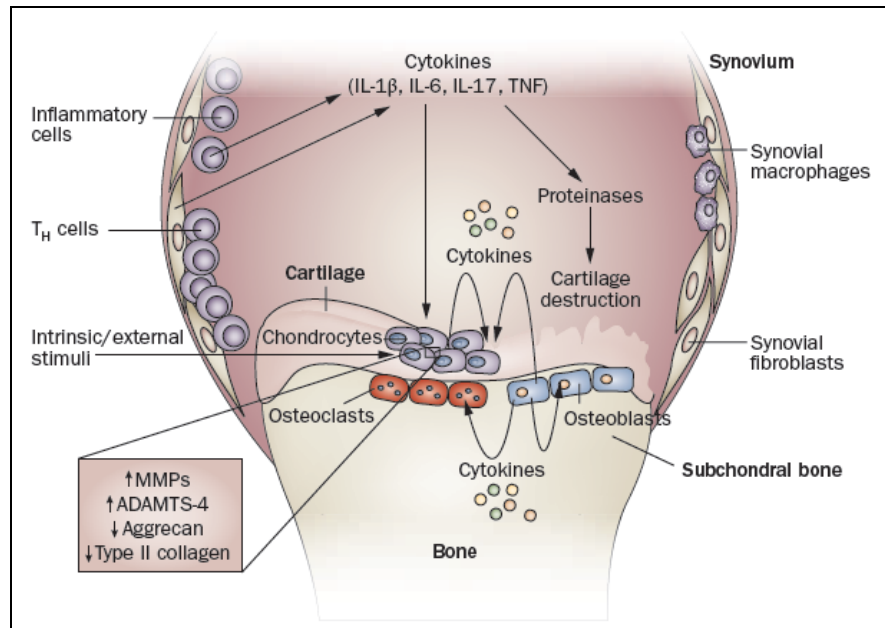
transformacije rasta-  $\beta$ , TIMPs – Tkivni inhibitori metaloproteinaza, TNF- $\alpha$  – Čimbenik nekroze tumora- $\alpha$ , Type X collagen – Tip X kolagena.

(Preuzeto iz: Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(6):304-12.)

Zaključno, buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena na bolje razumijevanje etiologije i patofiziologije ove bolesti, što će posljedično omogućiti i uočavanje nekih novih terapijskih ciljeva te uspješnije liječenje bolesnika s OA.

#### 1.5.1 Uloga proupalnih citokina u patofiziologiji osteoartritisa

Danas prevladava mišljenje da nastanak i napredovanje OA uključuje upalu čak i u ranijim stadijima bolesti (249). Epidemiološke studije su pokazale jasan dokaz o povezanosti između progresije oštećenja tibiofemoralne hrskavice i prisutnosti reaktivne ili upalom promijenjene sinovijalne membrane (250, 251). Upalni čimbenici kao što su proupalni citokini predstavljaju ključne medijatore poremećenog metabolizma i pojačanog katabolizma tkiva zglobova zahvaćenih OA (252). Čini se da su interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), čimbenik nekroze tumora (od engl. *Tumor necrosis factor – TNF*) i interleukin-6 (IL-6) glavni proupalni citokini uključeni u patofiziologiju OA, iako se i za ostale upalne medijatore, uključujući interleukin-15 (IL-15), IL-17, IL-18, interleukin-21 (IL-21), LIF i kemokine [kemokin C-C motiv ligand 5 (od engl. *Chemokine (C-C motif) ligand 5 - CCL5*), IL-8, s rastom povezani onkogen  $\alpha$  (od engl. *Growth-related oncogene  $\alpha$  – GRO $\alpha$* ) i MCP-1] smatra da su također uključeni u patofiziološke procese ove bolesti (Slika 9) (252).



**Slika 9.** Uloga proupalnih citokina u patofiziologiji osteoartritisa (OA). Razina proupalnih citokina, uključujući IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6, je povišena u OA. Ovi citokini imaju ulogu u patogenezi OA kroz nekoliko mehanizama djelovanja uključujući supresiju anaboličkih i poticanje kataboličkih procesa upalnog odgovora, što će imati za posljedicu strukturalno oštećenje zgloba zahvaćenog OA. ADAMTS-4 – Disintegrin i metaloproteinaza s trombospondinskim motivom-4, Aggrecan - Agrekan, Bone - Kost, Cartilage - Hrskavica, Cartilage destruction - Destrukcija hrskavice, Cytokines - Citokini, IL-1 $\beta$  – Interleukin-1 $\beta$ , IL-6 - Interleukin-6, IL-17 - Interleukin-17, Intrinsic/external stimuli – Unutarnji/vanjski stimulusi, Inflammatory cells – Upalne stanice, MMPs - Matriks metaloproteinaze, Subchondral bone – Subhondralna kost, Synovial fibroblasts – Sinovijalni fibroblasti, Synovial macrophages – Sinovijalni makrofagi, Synovium - Sinovijalna membrana, TNF - Čimbenik nekroze tumora, Type II collagen – Tip II kolagena, Osteoblasts - Osteoblasti, Osteoclasts - Osteoklasti, Proteinases – Proteinaze.

(Preuzeto iz: Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(1):33-42.)

S obzirom na činjenicu da su IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6 glavni proupalni citokini uključeni u patofiziologiju OA, u ovom potpoglavlju biti će opisana njihova uloga u patofiziološkim procesima ove bolesti. Također, u ovom potpoglavlju biti će opisana i uloga IL-17 u patofiziologiji ove bolesti jer je i jedan od ciljeva našeg istraživanja bio istražiti značaj povezanosti rizika za razvoj POA koljena i kuka i frekvencije polimorfnog markera za gen koji kodira IL-17, odnosno IL-17A, u hrvatskoj populaciji.

Razina IL-1 $\beta$  je povišena u sinovijalnoj tekućini, sinovijalnoj membrani, subhondralnoj kosti i hrskavici u zglobovima zahvaćenim OA (252). IL-1 $\beta$  suprimira ekspresiju kolagena tipa II (253, 254) i agrekana (255). On potiče i otpuštanje matriks metaloproteinaza-1, -3 i -13 (MMP-1, MMP-3 i MMP-13) (256, 257). Zaključno, IL-1 $\beta$  potiče proizvodnju IL-6 (258) i kemokina kao što su IL-8 (259), MCP-1 (260) i CCL5 (261).

Razina TNF je također povišena u sinovijalnoj tekućini, sinovijalnoj membrani, subhondralnoj kosti i hrskavici u zglobovima zahvaćenim OA (252). On suprimira sintezu proteoglikana, veznog proteina i kolagena tipa II u hondrocitima (262). Nadalje, TNF potiče otpuštanje MMP-1, MMP-3 i MMP-13 (256, 257). TNF i inducira proizvodnju IL-6 (258), ali i kemokina kao što su IL-8 (259), MCP-1 (260) i CCL5 (261).

Razina IL-6 je povišena u sinovijalnoj tekućini i serumu bolesnika s OA (263). IL-6 potiče ekspresiju MMP-1 i MMP-13 u kombinaciji s IL-1 $\beta$  i onkostatinom (264, 265). Za razliku od toga, IL-6 smanjuje ekspresiju kolagena tipa II (266).

IL-17 je proupalni citokin za kojeg se predmnijeva da ima ulogu u patofiziologiji OA. Lučen primarno od aktiviranih memorijskih CD4<sup>+</sup> T stanica (subtipa Th17), IL-17 se veže za specifične receptore koji su eksprimirani od strane gotovo svih stanica i tkiva (252). CD4<sup>+</sup> T stanice su identificirane u podležućem sloju

sinovijalne membrane bolesnika s OA (267). Također, u bolesnika s OA je detektirana T-stanična reaktivnost na površinske antigene hondrocita (268). Do sada nije sa sigurnošću utvrđeno da T stanice proizvode IL-17 u OA (252). Iako točna uloga IL-17 u patofiziologiji OA nije u potpunosti razjašnjena, različiti radovi upućuju na činjenicu da je IL-17 uključen u ranoj fazi upalnog procesa te da potiče lučenje proupalnih medijatora od strane brojnih drugih stanica (252). Tako je dokazano da IL-17 u hondrocitima inducira IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6, koji potom potiču proizvodnju dušičnog oksida (od engl. *nitric oxide* - *NO*) i MMP i smanjuju razinu proteoglikana (269-271). Za IL-17 je također dokazano da inhibira sintezu proteoglikana od strane hondrocita u mišjem modelu zglobne hrskavice putem NO (272). U studiji Honoratia i sur. (273) dokazano je i da IL-17 potiče lučenje vaskularnog endotelijalnog čimbenika rasta (od engl. *Vascular endothelial growth factor* - *VEGF*) u sinovijalnim fibroblastima izoliranih od bolesnika s OA. Prema Kapooru i sur. (252), buduće studije svakako trebaju biti usmjerene prema razjašnjavanju uloge IL-17 u OA, tj. da li je IL-17 zaista i uključen u patofiziologiju OA.

## **1.6 Klinička slika osteoartritisa**

Tegobe vezane uz pojavu osteoartritisa opisuju se kao prisutnost simptoma i znakova ove bolesti u određenog bolesnika čiji je zglob (ili zglobovi) zahvaćen OA. Simptomi se definiraju kao subjektivni doživljaj bolesnika, dok su znakovi objektivni pokazatelj određene bolesti. Simptome OA prezentira bolesnik liječniku, a znakove OA uočava liječnik prilikom pregleda bolesnika s OA pojedinog zgloba (ili zglobova).



Najčešći simptomi bolesti vezani uz pojavu OA su bol u području zahvaćenog zgloba, jutarnja ukočenost zgloba koja traje do 30 minuta, instabilitet ili deformitet zgloba te ograničena funkcija ili gubitak funkcije zgloba (274).

Najčešći znakovi bolesti vezani uz pojavu OA u području zahvaćenog zgloba su koštana izbočenja, ograničena ili blokirana pokretljivost, krepitacije i/ili bolnost prilikom kretanja te poremećaj usmjerenja i/ili deformitet zgloba (274).

## **1.7 Dijagnostika osteoartritisa**

Dijagnoza osteoartritisa postavlja se na temelju anamneze, kliničke slike i radiološke obrade bolesnika. Sve bolesnike s OA pojedinog zgloba (ili zglobova) možemo svrstati u dvije skupine: bolesnici s radiološki dokazanim OA koji su asimptomatski te se otkrivaju slučajno radiološkom obradom zahvaćenog zgloba(ova) i bolesnici sa simptomatskim OA koje liječniku dovodi prisutnost najčešćih simptoma i znakova bolesti vezanih za pojavu OA kao što su bol, ograničena pokretljivost i reduciranje ili gubitak funkcije zahvaćenog zgloba(ova). Simptomatski OA, kao što je već navedeno (poglavlje 1.4.1) se općenito definira prisutnošću boli i ograničene pokretljivosti zahvaćenog zgloba(ova) uz pojedine radiološke karakteristike (suženje zglobne pukotine, osteofiti, subhondralne ciste i skleroza subhondralne kosti) u ovisnosti o stupnju uznapredovalosti OA (15).

Najčešće korišteni klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze OA koljena jesu kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA koljena (13) (Tablica 6).

**Tablica 6.** Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) koljena.

(Modificirano iz: Altman R, Asch E, Bloch D i sur. *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum 1986;29(8):1039-49.*)

<b>Tradicionalni kriteriji</b>
Bol u koljenu i prisutnost osteofita na rendgenogramu koljena uz prisutnost jednog od slijedećih kriterija: - dob bolesnika iznad 50. godine života - jutarnja ukočenost koja traje do 30 minuta - krepitacije prilikom izvođenja kretnji u koljenu
<b>Kriteriji prema klasifikacijskom stablu</b>
Bol u koljenu i prisutnost osteofita na rendgenogramu koljena ili Bol u koljenu u bolesnika životne dobi od 40 godina ili više, jutarnja ukočenost koja traje do 30 minuta i krepitacije prilikom izvođenja kretnji u koljenu

Najčešće korišteni klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze OA kuka jesu kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA kuka (18) (Tablica 7).

**Tablica 7.** Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) kuka.

(Modificirano iz: Altman R, Alarcón G, Appelrouth D i sur. *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. Arthritis Rheum 1991;34(5):505-14.*)

<b>Tradicionalni kriteriji</b>
Bol u kuku uz prisutnost jednog od slijedećih kriterija: - sedimentacija eritrocita (SE) manja od 20 mm po satu - prisutnost osteofita u području proksimalnog dijela bedrene kosti i acetabuluma na rendgenogramu kuka - suženje zglobne pukotine na rendgenogramu kuka
<b>Kriteriji prema klasifikacijskom stablu</b>
Bol u kuku uz prisutnost osteofita u području proksimalnog dijela bedrene kosti i acetabuluma na rendgenogramu kuka ili Bol u kuku uz suženje zglobne pukotine na rendgenogramu kuka i SE manja od 20 mm po satu

Najčešće korišteni radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze OA koljena i kuka je Kellgren-Lawrence ljestvica za radiološku procjenu OA koljena ili OA kuka (17) (Tablica 8).

**Tablica 8.** Radiološki kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) koljena i kuka.

(Modificirano iz: Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957;16(4):494–502.)

Radiografski stupanj	0	I	II	III	IV
Klasifikacija	Normalan zglob	Nesigurni znaci OA	Početni OA	Umjereni OA	Teški OA
Opis	- ne vide se radiološke karakteristike OA	- minimalni osteofiti - nesigurni znaci suženja zglobne pukotine	- prisutni osteofiti - početno suženje zglobne pukotine	- umjereno suženje zglobne pukotine	- značajno suženje zglobne pukotine - subhondralna skleroza

## 1.8 Liječenje osteoartritisa

Trenutni modaliteti liječenja osteoartritisa, kao što su neoperativno (nefarmakološko i farmakološko) ili operativno liječenje ne utječu na uzrok već na posljedice OA (kao što su bol i gubitak funkcije) (275). Do sada su u literaturi opisane brojne smjernice za liječenje OA. U Tablici 9 prikazana je sinteza posljednjih objavljenih smjernica neoperativnog (nefarmakološkog i farmakološkog) i operativnog liječenja OA koljena (276-279) i OA kuka (277-280) Europske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR - The European League Against Rheumatism), Međunarodnog društva za istraživanje osteoartritisa (OARSI - The Osteoarthritis Research Society International), Američkog

koledža za reumatologiju (ACR - American College of Rheumatology) i Hrvatskog reumatološkog društva (HRD).

**Tablica 9.** Smjernice neoperativnog (nefarmakološkog i farmakološkog) i operativnog liječenja osteoartritisa (OA) koljena i kuka.

OA koljena	OA kuka
<b>Nefarmakološko liječenje</b>	
<p><u>Preporuča se da bolesnici učine slijedeće:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kardiovaskularne (aerobne) i/ili vježbe otpora</li> <li>- vježbe u vodi</li> <li>- reduciranje tjelesne težine (za pretile)</li> </ul> <p><u>Uvjetno se preporuča da bolesnici učine slijedeće:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- sudjelovanje u programima samoliječenja</li> <li>- MT u kombinaciji s nadziranim vježbama</li> <li>- psihosocijalna podrška</li> <li>- KT ivera usmjerenog prema medijalno</li> <li>- uporaba OU s klinom medijalno kod OA lateralnog odjeljka koljena</li> <li>- uporaba OU s klinom lateralno uz subtalarni povez kod OA medijalnog odjeljka koljena</li> <li>- uputiti bolesnika o primjeni lokalne topline</li> <li>- korištenje pomagala pri hodu (ako su potrebna)</li> <li>- sudjelovanje u tai chi programima</li> <li>- liječenje akupunkturom</li> <li>- uputiti bolesnika o primjeni TENS</li> </ul> <p><u>Nema preporuka glede slijedećeg:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- sudjelovanje u vježbama balansa ili u kombiniranim vježbama balansa i snage</li> <li>- uporaba OU s klinom lateralno</li> <li>- primjena MT kao jedine terapije</li> <li>- uporaba ortoza za koljeno</li> <li>- KT ivera usmjerenog prema lateralno</li> </ul>	<p><u>Preporuča se da bolesnici učine slijedeće:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kardiovaskularne (aerobne) i/ili vježbe otpora</li> <li>- vježbe u vodi</li> <li>- reduciranje tjelesne težine (za pretile)</li> </ul> <p><u>Uvjetno se preporuča da bolesnici učine slijedeće:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- sudjelovanje u programima samoliječenja</li> <li>- MT u kombinaciji s nadziranim vježbama</li> <li>- psihosocijalna podrška</li> <li>- uputiti bolesnika o primjeni lokalne topline</li> <li>- korištenje pomagala pri hodu (ako su potrebna)</li> </ul> <p><u>Nema preporuka glede slijedećeg:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- sudjelovanje u vježbama balansa ili u kombiniranim vježbama balansa i snage</li> <li>- sudjelovanje u tai chi programima</li> <li>- primjena MT kao jedine terapije</li> </ul>
<b>Farmakološko liječenje</b>	
<p><u>Uvjetno se preporuča uporaba jednog od navedenih lijekova:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- paracetamol</li> <li>- oralni NSAIL</li> <li>- topički NSAIL</li> <li>- tramadol</li> <li>- IA primjena kortikosteroida</li> </ul> <p><u>Uvjetno se preporuča da se ne uporabljaju navedeni lijekovi:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kondroitin sulfat</li> <li>- glukozamin</li> <li>- topički kapsaicin</li> </ul> <p><u>Nema preporuka glede slijedećeg:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- IA primjena hijaluronata, duloksetina i opioidnih analgetika</li> </ul>	<p><u>Uvjetno se preporuča uporaba jednog od navedenih lijekova:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- paracetamol</li> <li>- oralni NSAIL</li> <li>- tramadol</li> <li>- IA primjena kortikosteroida</li> </ul> <p><u>Uvjetno se preporuča da se ne uporabljaju navedeni lijekovi:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kondroitin sulfat</li> <li>- glukozamin</li> </ul> <p><u>Nema preporuka glede slijedećeg:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- topički NSAIL</li> <li>- IA primjena hijaluronata</li> <li>- duloksetin</li> <li>- opioidni analgetici</li> </ul>
<b>Operativno liječenje</b>	
<u>U ovisnosti o uznapredovalosti OA:</u>	<u>U ovisnosti o uznapredovalosti OA:</u>

<ul style="list-style-type: none"> <li>- artroskopija i lavaža</li> <li>- tehnike popravka hrskavičnih defekata:             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. tehnike stimulacije koštane srži (abrazija, mikrofrakture)</li> <li>2. tehnike nadomještanja (mozaikplastika, TOHA)</li> <li>3. kombinirane tehnike (TPF, IAH i AMIC)</li> </ol> </li> <li>- ostotomije u području koljena</li> <li>- djelomična i totalna artroplastika koljena</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- artroskopija kuka</li> <li>- otvorena toaleta kuka</li> <li>- osteotomije u području kuka (osteotomije zdjelice i/ili proksimalnog dijela bedrene kosti)</li> <li>- aloartroplastika kuka</li> </ul>
<p><i>Legenda:</i> <b>AMIC</b> – Autologna matriks-inducirana hondrogeneza, <b>IA</b> – intraartikularna, <b>IAH</b> – implantacija autolognih hondrocita, <b>IHAM</b> – inducirana hondrogeneza autolognog matriksa, <b>KT</b> – kinesio taping, <b>MT</b> – manualna terapija, <b>NSAIL</b> – nesteroidni antiinflamatorni lijekovi, <b>OH</b> – osteohondralni, <b>OU</b> – ortopedski ulošci, <b>TENS</b> - transkutana električna nervna (živčana) stimulacija, <b>TOHA</b> - transplantacija osteohondralnog alografta, <b>TPF</b> – transplantacija periostalnog flapa (preklopnice).</p>	

## 1.9 Prevencija osteoartritisa

Osteoartritis, kao najčešća bolest mišićno-koštanog sustava današnjice, ima značajan socijalni, ekonomski i medicinski utjecaj na društvo u cjelini (2, 3). Preventivne strategije za smanjenje utjecaja i opterećenja društva osteoartritisom trebaju biti usmjerene na potencijalno promjenjive čimbenike rizika u smislu smanjivanja njihove učestalosti. Smanjenje rizika za nastanak OA je najučinkovitije kada se čimbenici rizika modificiraju u rizičnoj populaciji (42).

Kada se razmatraju preventivne mogućnosti, evaluacija čimbenika rizika za pojavu i napredovanje OA je od velikog značaja. Dob je najjači predskazatelj za razvoj i napredovanje radiološki dokazanog OA. U rizičnu populaciju za nastanak OA ubrajaju se osobe u dobi od 50 godina te one koju su pretile, abnormalne biomehanike zglobova ili s prethodnim oštećenjem zglobova (281).

Preventivne strategije koje se preporučuju kod bolesnika s OA su edukacija, eliminacija nezdravih i promicanje zdravih životnih navika, redukcija tjelesne težine, očuvanje funkcije zahvaćenog(ih) zgloba(ova), psihosocijalna podrška, liječenje

komorbiditeta, rehabilitacijske mjere, smanjenje tegoba samoliječenjem (farmakološka intervencija) te pravodobno upućivanje na kirurške intervencije (282) (Tablica 10).

**Tablica 10.** Pregled preventivnih strategija kod osteoartritisa (OA).

Napredovanje OA				
	→			
Stadij OA	Zdrava populacija	Rizična populacija	Populacija s dijagnosticiranim OA	Populacija s kontroliranim OA
Stupanj prevencije	Primarna prevencija	Sekundarna prevencija/rana detekcija	Liječenje bolesti i tercijarna prevencija	
Cilj	Prevencija nastupa bolesti	Prevencija progresije prema dijagnosticiranom OA	Prevencija ponovnih akutnih epizoda OA ili prijema u bolnicu te prevencija ili odgađanje komplikacija	Optimizacija kvalitete života povezane sa zdravljem
Priroda intervencije	Promicanje potrebe za kontrolom tjelesne težine i ozljeda zglobova (sport, rekreacija, zanimanje)	Zdravstveni djelatnici Promocija kontrole tjelesne težine Prevencija ozljede zglobova Edukacijski programi	Liječenje komorbiditeta Pravodobno upućivanje bolesnika na operativni zahvat Promicanje zdravih životnih navika	Podržavanje samoliječenja u tijeku Optimizacija smanjenja tegoba Očuvanje funkcije zahvaćenog(ih) zgloba(ova) Osiguranje psihosocijalne podrške
Odgovorni sektori	Javno zdravstvo PZZ	PZZ Javno zdravstvo	PZZ SZZ	PZZ Skrb zajednice
Promocija kvalitete života povezane sa zdravljem	Ostali sektori Promocija zdravlja	Skrb zajednice Promocija zdravlja	TZZ Promocija zdravlja	Promocija zdravlja
<i>Legenda: PZZ – primarna zdravstvena zaštita, SZZ – sekundarna zdravstvena zaštita, TZZ – tercijarna zdravstvena zaštita</i>				

## 1.10 Prikaz problema

U osteoartritičnoj hrskavici, hondrociti (hrskavične stanice) snažno izražavaju proupalne citokine i inducibilnu sintazu dušičnog oksida (iNOS), enzima odgovornog za stvaranje dušičnog oksida (NO). Proupalni citokini i NO inhibiraju sintezu molekula hrskavičnog matriksa i pojačavaju aktivnost matriks metaloproteinaza (MMP) (283). Matriks metaloproteinaze, posebice kolagenaza 3 (matriks metalopeptidaza 13; MMP-13), su snažni proteolitički enzimi koji imaju važnu ulogu u razgradnji kolagena tipa II (283). Iako su proupalni citokini ključni u započinjanju i razvoju OA, poremećaj ravnoteže između proupalnih i protuupalnih citokina pridonosi gubitku integriteta zglobne hrskavice (284). Od proupalnih citokina, značajnu ulogu u OA imaju interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (od engl. *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  – *TNF- $\alpha$* ). Ovi citokini potiču proizvodnju ostalih citokina kao što su IL-8, IL-6, LIF, ali potiču i svoju proizvodnju, što pridonosi ubrzanju oštećenja zglobnog tkiva (284). IL-17 je nedavno karakterizirani citokin (IL-17A i IL-17F), lučen od posebnog tipa pomoćničkih T limfocita (Th17). On izaziva regrutaciju neutrofila, stimulira enzim iNOS (a time i stvaranje NO) i kolagenazu (a time i moguće razaranje hrskavice) te je općenito njegovo djelovanje i proupalno budući da stimulira lučenje IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 od strane imunoloških, vezivnih i epitelnih stanica (186).

Studije na životinjskim modelima su pokazale da proces razaranja hrskavice primarno uzrokuje IL-1 $\beta$ , dok je TNF- $\alpha$  prisutan u ranijim stadijima upale (285). Brojni citokini, kao što su IL-4, interleukin-10 (IL-10) i interleukin-13 (IL-13) inhibiraju aktivnost proupalnih citokina (286), dok interleukin-23 (IL-23) stimulira razvoj Th17 tipa limfocita T te je time induktor takvog tipa proupalnih reakcija (287).

Mnoge studije koje su istraživale predispoziciju za nastanak OA u pojedinim obiteljima predložile su kompleksni (poligenski) nasljedni utjecaj na predispoziciju za nastanak primarnog OA (14, 275). Na individualni rizik za nastanak primarnog OA posebice utječu dvije vrste gena: geni specifični za spol i geni specifični za pojedinu anatomsku lokalizaciju (41). Naime, primarni OA je bolest s visokom učestalošću i velikom kliničkom heterogenošću u općoj populaciji. Međutim, nije poznato u kojem se stupnju klinička heterogenost ove bolesti odražava na njenu genetsku heterogenost (212). No, neke su epidemiološke studije pokazale potencijalnu razliku u stupnju nasljeđa primarnog OA između različitih anatomskih lokalizacija (tj. pojedinih zglobova), kao i između spolova (147, 148, 288). Rezultati prethodno navedenih studija poduprli su pristup raščlanjivanja (stratifikacije) nasljeđa primarnog OA s obzirom na anatomsku lokalizaciju i pojedini spol u identifikaciji gena s predispozicijom za nastanak primarnog OA. Upravo takvom stratifikacijskom analizom u studiji genske povezanosti, Loughlin i sur. (164) su identificirali genske lokuse koji su više povezani s nastankom primarnog OA u pojedinim zglobovima ili su ograničeni samo na jedan spol. Nadalje, poznato je da kompleksne genetske bolesti mogu biti uzrokovane različitim genima u različitim populacijama. Do danas je identificirano nekoliko lokusa na različitim kromosomima povezanih s primarnim OA za koje se pretpostavlja da modificiraju rizik za nastanak OA. Četiri genske studije koje su istraživale većinu gena unutar genoma različitih osoba humane populacije otkrile su nekoliko kromosomskih lokusa povezanih s ovom bolesti (14). Jedan od tih lokusa je i IL1 genski lokus na granici između 13 i 14 citogenetske pruge (od engl. *band*) dugog kraka kromosoma 2 (2q13). Dužine je otprilike 12Mb i kodira sintezu 9 članova IL-1 obitelji, koja funkcionalno pripada skupini proupalnih citokina (IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6) (212). Od njih 9, kao geni suspekti za nastanak OA analizirani su IL1A (kodira sintezu IL-1 $\alpha$ ), IL1B



(kodira sintezu IL-1 $\beta$ ), i IL1RN (kodira sintezu antagonista IL-1 receptora, IL-1Ra). Nekoliko stotina Mb u blizini IL1 genskog lokusa nalaze se i geni koji kodiraju sintezu IL-1 receptora, a potonji funkcionalno modificiraju akciju IL-1 citokina te su stoga također analizirani u studijama povezanosti s rizikom za OA (289). Takvo istraživanje identificiralo je pojedine gene koji kodiraju članove IL-1 obitelji proupalnih citokina kao kandidate koji mijenjaju rizik za nastanak OA. To se čini i logičnim s obzirom na činjenicu da je IL-1 citokin koji utječe na oštećenje zglobova posredstvom poticanja proizvodnje proteaza koje mogu razgraditi proteine vanstaničnog matriksa hrskavice (61).

Istraživanjima u nekim etničkim populacijama pokazana je povezanost IL-1 obitelji gena s nastankom primarnog OA koljena (187, 212, 290, 291) i primarnog OA kuka (184, 290, 292-294), ali su rezultati kontroverzni, vjerojatno zbog poligeniskog odnosno kompleksnog nasljeđivanja predispozicije. Tako je u jednoj od prvih analiza ovog lokusa pronađena povezanost haplotipa IL-1 obitelji gena C-C-2 [“IL1B+3954 C/T”, “IL1B-511C/T” i “IL1RN VNTR 2”] s OA koljena, ali zanimljivo, ne i s OA kuka u populaciji Ujedinjenog Kraljevstva (212).

Nasuprot tome, studija Moos i sur. (Berlin, Njemačka) (290), analizirajući zasebno IL1B +3954 i IL1RN VNTR u bolesnika s totalnom endoprotezom (TEP) kuka je pokazala udruženost rizika za razvoj OA kuka u oba slučaja. U istoj studiji, autori također nalaze i povećan rizik za razvoj OA koljena (kod ispitanika s TEP koljena). Nadalje, Meulenbelt i sur. (Leiden, Nizozemska) (184) potvrđuju rezultate studije Moos. i sur. (290), ali ih i proširuju nalazeći da je haplotip C-C-2 (s istim SNP-ovima) također udružen s OA kuka u bolesnika s radiološki dijagnosticiranim OA kuka, ali ne i s OA koljena. Zatim, Smith i sur. (Bristol, Ujedinjeno Kraljevstvo) (291) su pokazali, koristeći dodatne polimorfne genetske markere unutar IL-1 obitelji gena, da je određeni

prošireni haplotip (navedeni C-C-2 i 4 do 5 dodatnih SNP-ova između IL1A i IL1RN gena) povezan s OA kuka i to s 23 puta većim rizikom. Isti je povezan s OA koljena, ali samo s oko 2-4 puta većim rizikom. Kasnije, Meulenbelt i sur. (293) pokazuju da haplotip IL1 regije sa 7 markera povećava rizik od 3 puta (s tri markera) na preko 7 puta (sa sedam markera) za OA kuka. Nadalje, Moxely i sur. (SAD) (294) pokazuju da isti prošireni haplotip sa 7-8 markera IL-1 obitelji gena nosi umjereno povećani rizik (oko 2 puta) i za OA šake.

U nedavno objavljenoj genetskoj studiji slučajeva i kontrola istraživana je povezanost IL-1 obitelji gena s predispozicijom za nastanak OA koljena u kineskoj Han populaciji. Autori ove studije su pokazali da pojedinačni točkasti polimorfizmi (SNP) unutar gena koji kodiraju IL-1 $\beta$  i IL-1Ra nisu udruženi s povećanim rizikom za nastanak OA koljena, međutim oni nisu analizirali haplotipove (295). Jedna od nedavno objavljenih meta-analiza, nastala prikupljanjem podataka svih genetskih studija slučajeva i kontrola europskog podrijetla, pokazala je da povezanost IL-1 genskog lokusa s OA koljena postaje statistički beznačajna ako se ignoriraju etničke razlike za predispoziciju nastanka bolesti (242). Druga meta-analiza je pokazala da zajedničke genetske varijacije u IL-1 regiji nisu povezane s pojavnnošću OA kuka ili koljena, ali su rezultati pokazali da varijante IL1RN gena mogu imati ulogu u uznapredovalosti OA koljena (244).

Čini se logičnim da se subpopulacijske razlike ne smiju zapostaviti u analizi genske sklonosti ka kompleksim bolestima tj. onim s poligenkim naslijeđivanjem (dakle, ne samo u slučaju s OA), jer su umjereni rizici možda različito raspoređeni u ljudskim subpopulacijama (a njih se ne može detektirati s GWA studijama; vidi poglavlje 1.4.3.3). U skladu s takvim razmišljanjem, Frazer i sur. (296) su u svojoj studiji zamijetili da je udruženost točkastih polimorfizama pojedinih gena identificirana

u jednoj populaciji rijetko prenosiva na pripadnike neke druge populacije ukoliko je rizik podijeljen podjednako na alele kompletnog seta alela neke vrste ili populacije (odnosno jednog „genskog bazena“). Također, u prilog tome idu i rezultati naših vlastitih istraživanja (297, 298), u kojima smo istraživali povezanost primarnog OA koljena i kuka s dva polimorfna markera za IL-1 regiju: IL1B (G-511A) i IL1RN (VNTR) u hrvatskoj populaciji. U studije su bili uključeni: a) 238 ispitanika s uznapredovalim oblikom primarnog OA koljena kojima su ugrađene totalne endoproteze (TEP) ili parcijalne endoproteze (PEP) koljena, i b) 259 ispitanika s uznapredovalim oblikom primarnog OA kuka, kojima su ugrađene TEP kuka. Rezultati ovih istraživanja nisu pokazali udruženost haplotipa (C-2) dvaju markera IL-1 genske obitelji s predispozicijom za nastanak OA bilo kuka ili koljena. Međutim, određeni genotipovi sastavljeni od nekih haplotipova IL1B -511 i IL1RN VNTR-a su bili statistički značajno različiti između kontrola i bolesnika s OA te su time ukazali na moguću povezanost IL-1 lokusa s OA kuka, ali ne i s OA koljena. Ta bi se povezanost možda bolje prikazala ukoliko bi se analiziralo više markera, odnosno prošireni haplotip, što je i učinjeno u istraživanju prikazanom u ovom doktorskom radu.

Slijedeći lokus koji bi mogao predisponirati nastanku primarnog OA je pronađen u obiteljima bolesnika s OA kuka u Ujedinjenom Kraljevstvu. Taj se lokus nalazi na 6 kromosomu (6p12.3–q13). Gen za IL-17 se nalazi u blizini tog lokusa. Zbog toga što IL-17 ima proupalni učinak bio je zanimljiv za analizu, a to su Southam i sur. (186) učinili analizirajući nekoliko SNP-ova IL17 gena u studiji populacije s OA kuka iz Ujedinjenog Kraljevstva, međutim nisu našli povezanost s bolešću. Budući da smo našli da se naši rezultati s IL-1 lokusom već razlikuju od subpopulacije u Ujedinjenom Kraljevstvu, smatrali smo opravdanim izvršiti analizu i IL-17 lokusa u našoj populaciji

na bolesnicima s OA kuka te proširiti analizu i na ispitanike s OA koljena, što je također učinjeno u ovom istraživanju.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja istraživanja pokazuju kontroverznu povezanost proupalnih citokina IL-1 i IL-17 s nastankom primarnog OA koljena i kuka. IL-1 i IL-17, koji su dio prirodene imunosti, mogu utjecati na stvaranje patoloških promjena u zglobovima. Naša pretpostavka je da polimorfne varijante IL-1 i IL-17 gena predstavljaju rizik za razvoj primarnog OA. OA je bolest s kompleksnom genetskom komponentom nasljeđivanja, na što upućuje varijabilnost rizika pojavnosti OA u različitim etničkim skupinama.

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti ulogu pojedinih proupalnih citokina u bolesnika sa uznapredovalim oblikom primarnog OA koljena i kuka iz hrvatske populacije istražujući polimorfizme njihovih gena.

Specifično, ciljevi ovog istraživanja bili su slijedeći:

- Utvrditi polimorfizme gena IL-1 i IL-17 u bolesnika s uznapredovalim oblikom primarnog OA koljena i kuka kojima je ugrađena TEP kuka, odnosno TEP ili PEP koljena i usporediti s kontrolnom skupinom ispitanika iz hrvatske populacije dobrovoljnih darivatelja krvi.
- Istražiti značaj povezanosti rizika za razvoj primarnog OA koljena i kuka i frekvencija dodatnih polimorfnih markera za:
  1. IL-1 regiju: IL1A (rs1800587, C-889T) i IL1B (rs1143634, C+3954T);
  2. IL-17: IL-17A (rs2275913, G-197A).
- Ispitati da li su frekvencije slijedećih genskih polimorfizma: IL1A (rs1800587, C-889T), IL1B (rs1143634, C+3954T) i IL-17A (rs2275913, G-197A) udružene s povećanim rizikom za nastanak primarnog OA koljena i kuka.
- Proširiti ispitivanja uvođenjem rezultata prethodnog istraživanja s dva polimorfna markera za IL1 regiju: IL1B (rs16944, G-511A) i IL1RN (VNTR)

kako bi se definirao prošireni haplotip (IL1A C-889T, IL1B C+3954T, IL1B G-511A i IL1RN VNTR) i usporedio s predispozicijom za bolest(i).

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1 Ispitanici**

Kako je broj ispitanika i kontrola različit za istraživanje udruženosti polimorfizama IL-1 genskog lokusa [IL1A (-889, C>T, rs1800587) i IL1B (+3594, C>T, rs1143634)] s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena u hrvatskoj populaciji od broja ispitanika i kontrola uključenih u istraživanje udruženosti IL17A -197 (G>A) genskog polimorfizma s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena u istoj populaciji, karakteristike ispitivane i kontrolne skupine za ova dva istraživanja prikazane su zasebno.

3.1.1 Ispitanici uključeni u istraživanje udruženosti polimorfizama IL-1 genskog lokusa [IL1A (-889, C>T, rs1800587) i IL1B (+3594, C>T, rs1143634)] s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena

Istraživanje udruženost polimorfizama IL-1 genskog lokusa [IL1A (-889, C>T, rs1800587) i IL1B (+3594, C>T, rs1143634)] s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena je provedeno na uzorcima DNA izoliranih iz periferne venske krvi 500 ispitanika (240 ispitanika s uznapredovalim OA koljena i 260 ispitanika s uznapredovalim OA kuka) iz hrvatske populacije s prethodno potvrđenom kliničkom i radiološkom dijagnozom isključivo uznapredovalog oblika primarnog OA koljena i kuka, a hospitaliziranih u Klinici za ortopediju Lovran u periodu od 17.01. – 28.11.2008.g. zbog ugradnje TEP ili PEP koljena, odnosno TEP kuka. Pritom se je svakog ispitanika, nakon pročitane „Obavijesti za ispitanika“, tražila njegova suglasnost

i potpisivanje informiranog pristanka da se, uslijed dijagnostičkih ili terapijskih postupaka, uzeta periferna venska krv može koristiti u znanstvene svrhe.

Od 240 ispitanika s OA koljena, 174 ispitanika (72,5%) je ženskog (Ž) spola, a 66 ispitanika (27,5%) je muškog (M) spola. Prosječna dob ispitanika s OA koljena je 69.74 godine, standardna devijacija (SD) = 7.24, a raspon 47 – 86 godina. Prosječna dob ispitanika Ž spola s OA koljena je 69.68 godina, a raspon 47 – 86 godina. Prosječna dob ispitanika M spola s OA koljena je 69.91 godine, a raspon 52 – 82 godine.

Od 260 ispitanika s OA kuka, 175 ispitanika (67,3%) je ženskog (Ž), a 85 ispitanika (32,7%) je muškog (M) spola. Prosječna dob ispitanika s OA kuka je 67.82 godine, SD = 9.61, a raspon 31 – 90 godina. Prosječna dob ispitanika Ž spola s OA kuka je 68.90 godina, a raspon 46 – 87 godina. Prosječna dob ispitanika M spola s OA kuka je 65.63 godine, a raspon 31 – 90 godina.

Kontrolnu skupinu predstavlja 531 zdrava osoba, od kojih su većina dobrovoljni davatelji krvi (DDK) [133 (25%) osoba Ž spola i 398 (75%) osoba M spola, prosječne dobi 42.3 godina, SD = 11.9, raspon 19-91 godine) bez kliničke manifestacije OA kuka ili koljena (izostanak kronične boli, otekline, napetosti i ograničene pokretljivosti) i eventualne prethodne medicinske evidencije kao bolesnika s OA kuka ili koljena, a ostatak su neki djelatnici Kliničkog bolničkog centra Rijeka ili članovi kućanstva nekih bolesnika kako je spomenuto u našim prethodnim studijama (297, 298, 303). Kukovi i koljena osoba iz kontrolne skupine nisu bili podvrgnuti radiološkoj analizi zbog etičkih i financijskih ograničenja. Uzorci periferne venske krvi svih osoba iz kontrolne skupine prikupljeni su u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka prilikom dobrovoljnog darivanja krvi, a nakon kliničke evaluacije i potpisanog informiranog pristanka o doniranju krvi za potrebe ovog istraživanja.



Analiza ispitanika i kontrola prisposobljenih po dobi i spolu učinjena je zasebno i to odabirom 480 bolesnika s uznapreovalim oblikom OA (233 bolesnika s uznapreovalim oblikom OA koljena i 247 bolesnika s uznapreovalim oblikom OA kuka) i 130 kontrola od prethodno analiziranih skupina sa svim uzorcima. Kriteriji odabira su bili slijedeći: a) izjednačavanje postotka osoba Ž spola za obje skupine (od 480 ispitanika s uznapreovalim oblikom OA, 333 (69,4%) su Ž, a 147 su M spola, dok je od 130 kontrola 96 (70,4%) njih Ž, a 33 M spola) i b) dobivanje razlike u dobi unutar razlike jedne standarde devijacije što je rezultiralo dobivanjem nove prosječne dobi za ispitanike od 68,3 godine (SD = 7.99) i 51.4 godine (SD = 9.5) za kontrole. Prosječni indeks tjelesne mase (ITM ± SD) ispitivane i kontrolne skupine bili su slični: ispitanici su imali ITM  $29,4 \pm 4,5$ , dok su kontrole imale ITM  $28,1 \pm 4,2$ .

Razlog odabira teže forme primarnog OA i usporedbe s kontrolnom skupinom (koja ima većinom DDK) jest pretpostavka da teža forma bolesti (a time i ranija pojava njenih simptoma tijekom života) možda ima upliva na povećanje rizika obolijevanja.

Ovo znanstveno istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Klinike za ortopediju Lovran, Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Povjerenstva za etička pitanja Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

### 3.1.2 Ispitanici uključeni u istraživanje udruženost IL17A -197 (G>A) genskog polimorfizma s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena

Istraživanje udruženosti IL17A -197 (G>A) genskog polimorfizma s rizikom za nastanak osteoartritisa kuka i koljena je provedeno na uzorcima DNA izoliranih iz periferne venske krvi 358 ispitanika (186 ispitanika s uznapreovalim OA koljena i 172 ispitanika s uznapreovalim OA kuka) iz hrvatske populacije s prethodno potvrđenom

kliničkom i radiološkom dijagnozom isključivo uznapredovanog oblika primarnog OA koljena i kuka, a hospitaliziranih u Klinici za ortopediju Lovran u periodu od 17.01. – 28.11.2008.g. zbog ugradnje TEP ili PEP koljena, odnosno TEP kuka. Pritom se je svakog ispitanika, nakon pročitane „Obavijesti za ispitanika“, tražila njegova suglasnost i potpisivanje informiranog pristanka da se, uslijed dijagnostičkih ili terapijskih postupaka, uzeta periferna venska krv može koristiti u znanstvene svrhe.

Od 186 ispitanika s OA koljena, 129 (69,35%) ispitanika je Ž spola i 57 (30,65%) ispitanika M spola. Prosječna dob ispitanika s OA koljena je 69.64 god, SD = 8,07, raspon 47-84 godina. Od 172 ispitanika s OA kuka, 119 (69,19%) ispitanika je Ž spola i 53 (30,81%) ispitanika M spola. Prosječna dob ispitanika s OA kuka je 68.54 godina, SD = 8,22, raspon 36-90). Sveukupno, u ovu studiju bilo je uključeno 248 (70%) ispitanika Ž spola i 110 ispitanika M spola.

Kontrolnu skupinu činilo je 136 zdrava DDK [94 (69%) osobe Ž spola i 42 osobe M spola, prosječne dobi 51.94 god, SD = 10,65, raspon: 27–79 godina] bez kliničke manifestacije OA kuka ili koljena (izostanak kronične boli, otekline, napetosti i ograničene pokretljivosti) i eventualne prethodne medicinske evidencije kao bolesnika s OA kuka ili koljena. Kukovi i koljena osoba iz kontrolne skupine nisu bili podvrgnuti radiološkoj analizi zbog etičkih i financijskih ograničenja. Uzorci periferne venske krvi svih osoba iz kontrolne skupine prikupljeni su u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka prilikom dobrovoljnog darivanja krvi, a nakon kliničke evaluacije i potpisanog informiranog pristanka o doniranju krvi za potrebe ovog istraživanja.

Prosječni indeks tjelesne mase (ITM  $\pm$  SD) ispitanika i kontrola bili su slični: ispitanici su imali ITM  $29.2 \pm 4.4$  , dok su kontrole imale ITM  $28.1 \pm 4.2$  .

Razlog odabira teže forme primarnog OA i usporedbe s kontrolnom skupinom (uglavnom DDK) jest pretpostavka da teža forma bolesti (a time i ranija pojava njenih simptoma tijekom života) možda ima upliva na povećanje rizika obolijevanja od ove bolesti.

Ovo znanstveno istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Klinike za ortopediju Lovran, Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Povjerenstva za etička pitanja Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

### **3.2 Kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka**

Za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka u ovom istraživanju korišteni su specifični klinički i radiološki kriteriji.

#### **3.2.1 Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka**

Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze OA koljena i kuka korišteni u ovom istraživanju bili su sljedeći:

- kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA koljena (13);
- kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA kuka (18);
- Western Ontario and McMaster Universities' Osteoarthritis (WOMAC) indeks za procjenu boli, funkcionalne aktivnosti i ukočenosti zglobova u osoba s OA koljena ili OA kuka (299).

### 3.2.2 Radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka

Radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze OA koljena i kuka korišten u ovom istraživanju bio je slijedeći:

- Kellgren-Lawrence ljestvica za radiološku procjenu OA koljena ili OA kuka (17).

### 3.3 Kriteriji uključivanja i isključivanja u istraživanje

#### 3.3.1 Kriteriji uključivanja u istraživanje

Kriteriji uključivanja u istraživanje bili su slijedeći:

- potvrđena klinička i radiološka dijagnoza primarnog OA koljena ili OA kuka prema prethodno navedenim kliničkim i radiološkim kriterijima za postavljanje njihove dijagnoze;
- indikacije za ugradnju TEP koljena (za bolesnike s uznapredovalim oblikom OA koljena) sukladne smjernicama konsenzusa Nacionalnog instituta za zdravlje (od engl. *National Institutes of Health - NIH*) o indikacijama za ugradnju TEP koljena, a koje uključuju: bol u zglobu koljena, funkcionalno ograničenje (u našem slučaju: raspon uznapredovalosti 51-72, prosjek 62) te radiološki dokaz uznapredovalosti OA koljena (u našem slučaju: svi bolesnici s OA koljena su imali K/L ocjenu > 2, dok je 90% bolesnika s OA koljena imalo K/L ocjenu 3 ili 4) (300). Indikacije za ugradnju PEP koljena korištene u našem istraživanju bile su slijedeće: starost preko 55 godina, indeks tjelesne mase (ITM) do 25, radiološki dokaz o unikompartmentalnom OA koljena (zahvaćenost samo

medijalnog ili lateralnog odjeljka koljena) bez značajnijih degenerativnih promjena u drugim odjeljcima koljena (medijalnom, lateralnom ili patelofemoralnom), očuvana prednja ukrižena sveza, varus deformacija manja od 15°, valgus deformacija manja od 20°, fleksijska kontraktura manja od 15° i fleksija koljena od 110° (301). Indikacije za ugradnju TEP kuka koje smo koristili u našem istraživanju bile su sukladne smjernicama konsenzusa Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) o indikacijama za ugradnju TEP kuka, a koje uključuju: bol u zglobu kuka, funkcionalna ograničenja (u našem slučaju: raspon uznapređovalosti 55-75, prosjek 66) te radiološki dokaz uznapređovalosti OA kuka (u našem slučaju: svi bolesnici s OA kuka su imali K/L ocjenu > 2, dok je 90% bolesnika s OA kuka imalo K/L ocjenu 3 ili 4) (302);

- potpisan informirani pristanak da se, uslijed dijagnostičkih ili terapijskih postupaka, uzeta periferna venska krv može koristiti u znanstvene svrhe, tj. u svrhu ovog istraživanja.

### 3.3.2 Kriteriji isključivanja iz istraživanja

Kriteriji isključivanja iz istraživanja bili su slijedeći:

- početni ili uznapređovali oblik primarnog OA koljena ili OA kuka kod kojeg nije indicirana ugradnja TEP ili PEP koljena, odnosno TEP kuka;
- uznapređovali oblik primarnog OA koljena ili OA kuka kod kojeg je indicirana ugradnja TEP ili PEP koljena, odnosno TEP kuka, a prethodno od strane bolesnika nije potpisan informirani pristanak za korištenjem dobivene periferne venske krvi u svrhu ovog istraživanja;
- svi sekundarni oblici OA koljena ili OA kuka;

- reumatoidni artritis (RA) zgloba koljena ili kuka.

### **3.4 Metode**

#### 3.4.1 Skupljanje uzoraka periferne venske krvi ispitanika

Od svakog bolesnika s uznapredovalim oblikom primarnog OA koljena ili kuka uključenog u ovo istraživanje, a nakon potpisivanja informiranog pristanka, venepunkcijom je uzeto 10 ml periferne venske krvi tijekom izvođenja indiciranih operacijskih zahvata. Uzorci periferne venske krvi pohranjeni su u 2 epruvete s EDTA u volumenu od 5 ml periferne venske krvi u svakoj epruveti. Nakon uzimanja uzoraka krvi od svakog bolesnika, epruvete su označene šifriranim brojem prethodno određenim za svakog bolesnika koji je uključen u ovo istraživanje (šifarnik i šifre pod kojima se vodi svaki bolesnik uključen u istraživanje poznati su samo istraživačima uključenim u ovo istraživanje) i potom pohranjene u ledenicu na temperaturi do -86 °C u Klinici za ortopediju Lovran. Nakon što bi svaki put skupili uzorke krvi od 100 bolesnika, uzorke bi transportirali na Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci gdje je učinjena izolacija genomske DNA. U suradnji s Imunogenetskim odjelom (od 2012.g.: Molekularno-genetski odjel) Zavoda za oralnu biologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu analizirani su točkasti polimorfizmi gena.

#### 3.4.2 Izolacija genomske DNA iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze

Uzorci periferne venske krvi bolesnika s OA kuka ili koljena su uzeti tijekom ugradnje PEP ili TEP koljena, odnosno TEP kuka. Izolirana je genomska DNA kao što je

prethodno opisano (297, 298). Genomska DNA zdravih davatelja krvi izolirana je metodom isoljavanja (od engl. *salting out*) pomoću komercijalno dostupnog kita (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), kako je prethodno i opisano (303).

### 3.4.3 Genetska analiza izolirane genomske DNA i lančana reakcija polimeraze

Nakon izolacije genomske DNA iz periferne venske krvi bolesnika s uznapredovalim oblikom primarnog OA kuka i koljena, učinjena je genetska analiza izoliranih DNA. Genetske analize korištene u ovom istraživanju bile su slijedeće:

1. detekcija SNP-ova u navedenim genima (IL1A C-889T, rs18000587; IL1B C+3954T, rs1143634; IL1B G-511A, rs16944; te IL17 G-197A, rs2275913) s Taqman metodom (direktna detekcija alela),
2. detekcija IL1RN VNTR nakon amplifikacije specifičnim početnicama za taj lokus te analize elektroforezom u agaroznom gelu radi određivanja broja repetitivnih sekvenci.

Taqman analiza se sastoji od amplifikacije s dodatnom hibridizacijom sa specifičnim sondama (karakterističnim za određeni alel) kako bi se dokazala prisutnost takvog alela u uzorku. Ukoliko su oba alela prisutna, tada je rezultat dvostruko pozitivan i dokaz je heterozigotnosti. Budući da su navedeni točkasti polimorfizmi već istraženi u ljudskoj populaciji, poznate su njihove normalne frekvencije i odnos heterozigota i homozigota u nekim etničkim populacijama. Također je poznato da se ljudski genski bazen sastoji samo od dva alela u svim navedenim SNP-ovima predloženim za istraživanje.

Lančana reakcija polimeraze (od engl. *Polymerase chain reaction - PCR*) je učinjena po Taqman metodi prema uputama proizvođača (Applied Biosystems, San

Jose, CA, USA). Ukratko, učinjeno je slijedeće: testovi diskriminacije alela provedeni su Taqman PCR metodom (Applied Biosystems, San Jose, CA, USA) koristeći se qPCR uređajem u realnom vremenu MX3005P s njegovom programskom potporom (Agilent, Stratagene, CA, USA). Aleli IL1A na -889 (C>T, rs1800587) i IL1B na +3954 (C>T, rs1143634) su detektirani Taqman metodom koristeći početnice i sonde na način kako je to prethodno opisano (294) (Tablica 11), a koji su sintetizirani pri Zavodu za biokemiju, Istraživački park Oslo, Sveučilište u Oslu, za ovu namjenu.

**Tablica 11.** Sekvence za sve početnice i sonde korištene u vlastitim istraživanjima.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. Scand J Immunol 2012;77(2):151-61.)

Gen	Polimorfizam	Početnice i sonde
<b>IL1A</b>	-889 C>T (rs1800587)	Fw: 5' CACAGGAATTATAAAAAGCTGAGAAATTC 3' Rv: 5' GGAGAAAGGAAGGCATGGATT 3' FAM: 5' CCAGGCAACACCATTGAAGGCTCATATG 3' HEX: 5' CCAGGCAACATCATTGAAGGCTCATAG 3'
<b>IL1B</b>	-511 C>T (rs16944)	Fw: 5' TTG AGG GTG TGG GTC TCT ACC T 3' Rv: 5' TCC TCA GAG GCT CCT GCA A 3' FAM: 5'TGTTCTCTGCCTCAGGAGCTCTCTGTCA 3' HEX: 5' TGCTGTTCTCTGCCTCGGGAGCTC 3'
<b>IL1B</b>	+3954 C>T (rs1143634)	Fw: 5' GGCCTGCCCTTCTGATTTTATA 3' Rv: 5' TCGTGCACATAAGCCTCGTTA 3' FAM: 5' TTCAGAACCTATCTTCTTCGACACATGG 3' HEX: 5' TTCAGAACCTATCTTCTTTGACACATGG 3'
<b>IL1RN</b>	VNTR	Fw: 5' CCCCTCAGCAACACTCCTAT 3' Rv: 5' GGTCAGAAGGGCAGAGA 3'
<b>FAM</b> - 6-karboksifluoroscin-obilježena sonda, <b>HEX</b> - Heksakloro-6-karboksifluoroscin-obilježena		



sonda, **Fw** - Forward početnica , **Rv** - Reverse početnica.

Sonde su obilježene na svom 5' kraju FAM fluorescentnom bojom za C alele te HEX fluorescentnom bojom za T alele, dok su na svom 3' kraju obilježene zero-quencherom. IL1B (-511, rs16944) SNP je analiziran na način kako je to prethodno opisano (297, 298). Količina FAM i/ili HEX boja u uzorku detektira se nakon svakog ciklusa, a porast je izravno proporcionalan količini kopija DNA molekula s dotičnim alelima u uzorku. Nedostatak jedne boje tumači se homozigotnošću za drugi alel (zbog toga što ih ima samo dva u populaciji).

Prethodno objavljeni IL1RN VNTR polimorfizam (242, 294) analiziran je pomoću nove kombinacije forward (Fw) i reverse (Rv) početnica, i to Fw: 5'-CCCCTCAGCAACACTCCTAT-3' i Rv: 5'-GGTCAGAAGGGCAGAGA-3'. Fw početnica sadrži tri dodatna nukleotida (ccc) na svom 5' kraju u odnosu na prethodno objavljenu F1 početnicu (ctcagcaacactcctat) (304, 305). Rv početnica se nešto razlikuje od one prethodno objavljene (304, 306) te sadrži samo dio R2 početnice (gtcagaaggcagagaggtctcatc) koju su prethodno opisali Tseng i sur. (305). Fw/Rv par početnica detektira 2, 3, 4 ili više ponavljanja od 86 parova baza (86-bp) u intronu 2 IL1RN gena, slično kako je to i prethodno opisano (304), ali „izbjegavajući“ SNP u R1 početnici što inače može dovesti do pogreške u tipiziranju (305). PCR reakcija je imala konačni volumen od 10 mikrolitara po jednom uzorku, 40 ciklusa amplifikacije uzorka i sastojala se (u konačnim koncentracijama) od 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2μM početnica (svaka), 1,2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM deoksiribonukleotida, 0.025 jedinica/μl Taq DNA polimeraze (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i 0.5-2 ng/μl kalupa (DNA). Nakon početne inkubacije na 95°C u trajanju od 60 s, svaki ciklus uključuje denaturaciju na 95°C u trajanju od 10 s, sparivanje na 59°C u trajanju

od 20 s i elongaciju na 72°C u trajanju od 90 s. Analiza IL1RN VNTR alela je učinjena elektroforezom dobivenih PCR uzoraka u agaroznom gelu (2 – 2.5%-tnom) i usporedbe uzoraka s kontrolnim markerima DNA. Aleli IL1RN VNTR su se razlikovali s duljinom migracije u gelu, tako da je alel 1 (najčešći, s 4 ponovljenih 86 bp) je imao sporiju migraciju u gelu (na razini od oko 400-500 bp) od onog samo dvije repetitivne sekvence (alel 2, drugi najčešći alel u populaciji). Rjeđi je bio alel s 5 ponavljanja (alel 3), a najrjeđi onaj s 3 repetitivna slijeda (alel 4). Ponovna analiza IL1RN VNTR je potvrdila i proširila prethodne rezultate vlastitih istraživanja (potpoglavlje 4.1.1 Analiza frekvencije pojedinog alela i genotipova IL-1 genskog lokusa, Tablica 13, str. 86) (307).

Važno je spomenuti da pokusi s 4 polimorfizma (IL1A rs1800587, IL1B rs16944, IL1B rs1143634, i IL1RN VNTR) nisu uspjeli tipizirati sve uzorke, što ima za posljedicu varijabilnost u broju alela, haplotipova i genotipova u tabličnim prikazima rezultata.

Genotipizacija IL17A na -197G>A (rs2275913) je također izvedena pomoću TaqMan® SNP genotipizacijskog testa (ABI: Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Odabrane početnice i sonde za otkrivanje rs2275913 SNP sintetizirane su od istog proizvođača. Analize su provedene prema protokolu proizvođača. Detekcija signala fluorescencije sonde učinjena je korištenjem Mx3005P Real-Time PCR sustava (Stratagene, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) slično kao i za IL1A i IL1B točkaste polimorfizme.

Nadalje, važnost odabira IL1RN VNTR-a za našu analizu leži u slijedećem. VNTR u IL1RN genu je marker koji povezuje cijelu regiju IL-1 citokinskog lokusa. Naime, između IL1RN i IL1B gena postoji još 6 gena sličnih IL-1 citokinu, koji su također proupalni, malo se zna o njima, a neki su preimenovani nedavno u IL36 i IL37. Prema tome, ako se u našim rezultatima utvrdi da neki haplotip (ili kombinacija nekog

od repetitivnih alela VNTR-a udruženog s određenim alelima u IL1B i IL1A lokusima) bude povezan s bolešću, on onda može predstavljati i dodatni marker za neki skriveni gen (npr. jedan od navedenih alela između njih), koji možda nosi dio predispozicije za OA. Dakle, predispozicija za OA ne mora biti izravno prisutna u IL-1 genima, već je možda lokalizirana i pored njih, ili čak u regulacijskim strukturama DNA određenog haplotipa (koji možda mogu regulirati ekspresiju nekih još nepoznatih gena).

Dosad, u našem uzorku od oko 1000 ispitanika nismo našli odstupanja od objavljenih frekvencija alela iz grupe IL1 lokusa (IL1B G-511A), uključujući i frekvencije IL1RN VNTR-a. Predviđanje haplotipova (koji uključuju susjedne polimorfizme počevši od IL1A C-889T, IL1B C+3954T, IL1B G-511A do IL1RN VNTR-a) i usporedba njihovih frekvencija između ispitanika i kontrola omogućila je analizu moguće povezanosti šireg IL-1 lokusa s bolešću.

Gen koji kodira dodatni proupalni citokin IL-17 i njegovu moguću povezanost s OA će se zasebno izanalizirati upotrebljavajući samo jedan SNP (G-197A).

### **3.5 Statistička obrada podataka**

Za uspoređivanje frekvencija alela, haplotipova i genotipova polimorfnih markera IL-1 genskog lokusa između ispitivane i kontrolne skupine korištene su analiza tablica kontingencije ([statpages.org/ctab2x2.html](http://statpages.org/ctab2x2.html)) i hi-kvadrat test (StatCalc program, AcaStat Software). Za testiranje razlike u spolu i dobi između ispitivane i kontrolne skupine korišten je Mann-Whitney *U* test (308). Kretanje trendova je testirano Cochran-Armitage testom pomoću pLINK programa (309). Kombinacija i predviđanje haplotipova za IL-1 obitelj gena je učinjena pomoću programa "Phase" (310, 311) koristeći većinu ispitanika i kontrola. Neravnoteža povezanosti i Hardy-Weinberg

ravnoteža za te lokuse analizirana je Arlequin programom v3.5 (Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland). Neravnoteža povezanosti (od engl. *linkage disequilibrium*) pronađena je između susjednih lokusa IL1A (C-889T) i IL1B (C+3954T) kao i između IL1B (G-511A) i IL1B (C+3954T), ali ne i između susjednih IL1B (G-511A) i IL1RN te ne-susjednih IL1A (C-889T) i IL1RN. Svi lokusi su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Što se tiče korekcija za višestruke usporedbe (*Bonferroni*), naši tipizirani markeri su u uskoj neravnoteži povezanosti pa će testiranje jednog markera u neravnoteži povezanosti s drugim biti isto kao i testiranje drugog. Dakle, striktna *Bonferroni* korekcija po broju markera ne bi se činila razumnom. Iz tog razloga, *p*-vrijednosti iskazane ovdje nisu korigirane za broj usporedbi. Ipak, kako bi se naglasila relevantnost *p*-vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju, povremeno su primijenjene konzervativne korekcije za dobivene *p*-vrijednosti omogućavajući množenje s dva (s obzirom na činjenicu da nije bilo uske neravnoteže povezanosti između dvaju ne-susjednih lokusa), a povremeno i vrlo konzervativne korekcije dobivene *p*-vrijednosti množenjem s četiri jer su u ovom istraživanju ispitivana 4 polimorfizma IL-1 genskog lokusa.

Alelne i genotipske razlike IL17A SNP (-197G>A) između ispitivane i kontrolne skupine analizirane su pomoću hi-kvadrat testa (StatCalc program, AcaStat Software). Učinjena je analiza 358 bolesnika s OA kao ispitivane skupine i 136 zdrava ispitanika (uglavnom DDK) kao kontrolne skupine koji su prisposobljeni po dobi i spolu. Kriteriji za odabir bili su slijedeći: a) što sličniji postotak osoba ženskog spola za obje skupine: od 358 OA slučajeva, 248 (70%) su bile ženskog, a 110 muškog spola, dok je kod 136 kontrola 94 (69%) osobe bile ženskog, a 42 muškog spola, odnosno b) razlike u dobi između ispitivane i kontrolne skupine su bile unutar jedne standardne

devijacije: prosječna dob ispitivane skupine bila je 69.64 godina (SD = 8.07), dok je u slučaju kontrolne skupine dob bila 51.94 godina (SD = 10.65).

Statistički značajnim smatrani svi rezultati s vrijednostima  $p < 0.05$ , a trendom povezanosti i značajnom povezanosti kod ispitanika smatrani su oni rezultati kada se statistički značajna razlika približava vrijednosti 0.05 (0.1 – 0.05) ili kada je  $p < 0.05$ , ali granica 95% intervala pouzdanosti prelazi vrijednosti koje su veće od 1.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Interleukin-1 (IL-1)

#### 4.1.1 Analiza frekvencije pojedinog alela i genotipova IL-1 genskog lokusa

Kako bi se analizirao haplotip proširenog rizika IL-1 obitelji gena u hrvatskoj populaciji, određene su frekvencije alela i genotipova četiri polimorfna markera IL-1 genske regije u bolesnika s unapređivalim oblikom OA (OA koljena i OA kuka), koje su zatim uspoređene s njihovim frekvencijama iz kontrolne skupine. Polimorfizmi sadrže tri SNP IL1A i IL1B gena te VNTR IL1 receptor antagonist gena (IL1RN). Uspoređene frekvencije SNP IL1A (-889) i IL1B (+3954) prikazane su u tablici 12, s obzirom na činjenicu da su frekvencije alela i genotipova za preostala dva markera (IL1B -511, IL1RN VNTR) prethodno objavljene (297, 298). Razlike u frekvencijama alela za IL1A (-889) i IL1B (+3954) nisu bile statistički značajne, iako su one za prethodni SNP, između bolesnika s OA koljena i kontrola, pokazale trend ( $p < 0.07$ ) prema statističkoj značajnosti za češći (major) alel (Tablica 12). Kada su uspoređene frekvencije genotipova jednog IL1A (-889) i IL1B (+3954) alela, sve razlike su bile statistički beznačajne (Tablica 12), osim onih za populaciju bolesnika s OA koljena. Potonji su pokazali dvije značajne razlike u frekvencijama genotipova prema kontrolama u IL1A (-889) SNP (Tablica 12). Homozigotni češći/rjeđi alelni 1/1 (C/C) genotip je povezan s protekcijom za nastanak OA koljena, dok je heterozigotni češći/rjeđi alelni 1/2 (C/T) genotip povezan s predispozicijom za nastanak bolesti (Tablica 12).

**Tablica 12.** Analiza povezanosti IL1A i IL1B SNP u bolesnika s osteoartritisom (OA) kuka ili koljena u hrvatskoj populaciji.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

		Frekvencije alela <sup>1</sup>				<i>P</i>		<i>P</i>	
		OA kuka (B)	OA koljena (B)	K		[OA kuka (B) vs K	OR (95%CI)	(OA koljen a (B) vs K)	OR (95%CI)
<b>IL1A<sup>2</sup></b>	SNP - 889 rs180 0587	N=520	N=470	N=1048					
<b>1</b>	C	0.700 (364)	0.662 (311)	0.705 (739)	0.83	(0.77- 1.24)	0.98	0.09	(0.64- 1.04)
<b>2</b>	T	0.300 (156)	0.338 (159)	0.295 (309)	0.83	(0.81- 1.30)	1.02	0.09	1.22 (0.96- 1.55)
<b>IL1B<sup>2</sup></b>	SNP 3954 rs114 3634	N=518	N=480	N=1062					
<b>1</b>	C	0.757 (392)	0.760 (365)	0.741 (787)	0.5	(0.85- 1.40)	1.09	0.42	1.11 (0.86- 1.44)
<b>2</b>	T	0.243 (126)	0.240 (115)	0.259 (275)	0.5	(0.72- 1.18)	0.92	0.42	0.90 (0.70- 1.17)
		Frekvencije genotipova <sup>1</sup>				<i>P</i>		<i>P</i>	
		OA kuka (B)	OA koljena (B)	K		[OA kuka (B) vs K	OR (95%CI )	(OA koljen a (B) vs K)	OR (95%CI)
<b>IL1A<sup>3</sup></b>	SNP - 889 rs180 0587	n=260	n=235	n=524					
<b>1/1</b>	C/C	0.485 (126)	0.430 (101)	0.513 (269)	0.45	(0.65- 1.21)	0.89	0.033 <sup>4</sup>	0.71 (0.52- 0.99)

<b>1/2</b>	C/T	0.431 (112)	0.464 (109)	0.384 (201)	0.2	1.22 (0.89- 1.66)	0.038 <sup>5</sup>	1.39 (1.01- 1.92)
<b>2/2</b>	T/T	0.085 (22)	0.101 (25)	0.103 (54)	0.41	0.80 (0.46- 1.39)	0.89	1.04 (0.61- 1.76)
<b>IL1B<sup>2</sup></b>	SNP 3954 rs114 3634	n=259	n=240	n=531				
<b>1/1</b>	C/C	0.568 (147)	0.575 (138)	0.550 (292)	0.64	1.07 (0.79- 1.47)	0.52	1.11 (0.80- 1.52)
<b>1/2</b>	C/T	0.378 (98)	0.371 (89)	0.382 (203)	0.92	0.98 (0.72- 1.35)	0.76	0.95 (0.69- 1.32)
<b>2/2</b>	T/T	0.054 (14)	0.054 (13)	0.068 (36)	0.46	0.79 (0.40- 1.54)	0.47	0.79 (0.39- 1.57)
<b>B</b> – Bolesnici, <b>K</b> – Kontrole, <b>n</b> – Broj individua, <b>N</b> – Broj alela, <b>OA</b> – Osteoartritis. <sup>1</sup> Frekvencija (broj) <sup>2</sup> Oznake alela (1 - češći alel, 2 - rjeđi alel) <sup>3</sup> Oznake genotipova <sup>4</sup> Pcorr < 0.07 <sup>5</sup> Pcorr < 0.08								

Nadalje, ponovno je tipiziran IL1RN VNTR polimorfizam ispitivane i kontrolne skupine (Tablica 13). Time su prošireni rezultati prethodnih vlastitih istraživanja (297, 298). Potvrđujući prethodno objavljeno, razlike između frekvencija alela i genotipova su ostale nepromijenjene te su shodno tome i dalje ostale statistički ne značajne. Ponovno tipiziranje IL1RN VNTR polimorfizma je korišteno kao jedna od baza za predviđanje haplotipova u narednom koraku.



**Tablica 13.** Analiza povezanosti IL1RN VNTR s osteoartritisom koljena i kuka u hrvatskoj populaciji.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

		Frekvencije alela <sup>1</sup>				
		OA koljena	OA kuka	K	P	P
		(B)	(B)		K vs OA	K vs OA
<b>IL1RN<sup>2</sup></b>	VNTR	n=434	n=464	n=1032	koljena (B)	kuka (B)
<b>1</b>	(4)	0.678 (294)	0.694 (322)	0.709 (732)	0.22	0.55
<b>2</b>	(2)	0.304 (132)	0.282 (131)	0.267 (276)	0.15	0.55
<b>3</b>	(5)	0.018 (8)	0.024 (11)	0.022 (23)	0.64	0.87
<b>4</b>	(3)	0	0	0.001 (1)	1	1
		Frekvencije genotipova <sup>1</sup>				
		OA koljena	OA kuka	K	P	P
		(B)	(B)		K vs OA	K vs OA
<b>IL1RN<sup>3</sup></b>	VNTR	n=217	n=232	n=516	koljena (B)	kuka (B)
<b>1/1</b>	(4/4)	0.465 (101)	0.509 (118)	0.517 (267)	0.20	0.82
<b>1/2</b>	(4/2)	0.392 (85)	0.336 (78)	0.353 (182)	0.32	0.66
<b>1/3</b>	(4/5)	0.032 (7)	0.035 (8)	0.029 (15)	0.82	0.69
<b>1/4</b>	(4/3)	0	0	0.002 (1)	1	1
<b>2/2</b>	(2/2)	0.106 (23)	0.108 (25)	0.087 (45)	0.42	0.37
<b>2/3</b>	(2/5)	0.005 (1)	0.013 (3)	0.008 (4)	1	1

3/3	(5/5)	0	0	0.004 (2)	1	1
<p><b>B</b> – Bolesnici, <b>K</b> – Kontrole, <b>n</b> – Broj individua, <b>OA</b> – Osteoartritis, / - označava da aleli na kromosomu 2 potiču od dva različita (otac - majka) kromosoma.</p> <p><sup>1</sup>Frekvencije (broj)</p> <p><sup>2</sup>Oznake alela. Brojevi kopija <i>IL1RN</i> VNTR ponavljanja su navedeni u zagradama</p> <p><sup>3</sup>Oznake genotipova. Brojevi kopija <i>IL1RN</i> VNTR ponavljanja su navedeni u zagradama</p>						

#### 4.1.2 Analiza haplotipova

Potom je pristupljeno udruživanju haplotipova za obje grupe bolesnika (bolesnici s uznapredovalim OA koljena i bolesnici s uznapredovalim OA kuka) kombiniranjem podataka dobivenih ovim istraživanjem s prethodnim vlastitim objavljenim podacima (297, 298) te je učinjena analiza povezanosti haplotipova. U prethodnim vlastitim istraživanjima je pokazano da su razlike u genotipovima *IL1RN* VNTR lokusa bile značajno povezane s predispozicijom za nastanak OA kuka (297), ali ne i za OA koljena (298). Također, analiziran je promotor SNP *IL1B* gena na poziciji -511 i nije pronađena povezanost na razini jednog markera. Nadalje, rezultati vlastitih prethodnih istraživanja su pokazali, da haplotip *IL1B* (-511) - *IL1RN* VNTR ne pokazuje povezanost s nastankom OA koljena ili OA kuka (297, 298). Ali, s obzirom na činjenicu da je pristup u prethodna dva istraživanja bio je vrlo konzervativan, ostala je mogućnost da ipak postoji povezanost s bolešću ako se ponovo analiziraju uzorci s modernijim pristupom, npr. proširenjem haplotipske analize uvođenjem novih markera iste genske regije.

Haplotipovi *IL1* genskog lokusa predviđeni su kombiniranjem novih rezultata ovog doktorskog rada - *IL1A* (-889) i *IL1B* (3954) SNPs (Tablica 11) - s prethodno objavljenima (297, 298) za *IL1B* (-511) SNP i *IL1RN* VNTR (Tablica 11). Ova četiri markera obuhvaćaju 345,2 kbp DNA na kromosomu 2 koji sadrži devet gena. Tako,

pojedini haplotip može predstavljati utjecaj bilo kojeg od prisutnih alela. Uspoređene su frekvencije haplotipova 4 markera IL-1 genskog lokusa između ispitivane skupine (bolesnici su uznapredovalim OA kuka i koljena) s kontrolnom skupinom (Tablice 14 i 15). Bolesnici s OA koljena (n = 238, Tablica 14A) nešto su rjeđe nosioci haplotipa 1-2-1-1 u usporedbi s kontrolama. Ta razlika je statistički značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.05$ ) te sugerira da je 1-2-1-1 haplotip povezan s oko 3 puta manjim rizikom za nastanak OA koljena (OR: 0.31; 95% CI: 0.11 – 0.84).

**Tablica 14A.** Procijenjene frekvencije haplotipova u bolesnika s osteoartritisom koljena u hrvatskoj populaciji.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

Oznake haplotipova <sup>1</sup>		K (n=1008)		OA koljena (B) (n=476)			P	OR (95%CI)	Povezanost s OA koljena
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	N	F	N	F				
1-1-1-1	C-C-G-4	327	0.324	140	0.294	0.36	1.39 (0.87- 2.22)	protekcija <sup>4</sup>	
1-1-1-2	C-C-G-2	52	0.052	35	0.074	0.14			
1-1-1-3	C-C-G-5	16	0.016	8	0.017	0.79			
1-1-2-1	C-C-A-4	108	0.107	48	0.101	0.74			
1-1-2-2	C-C-A-2	167	0.166	80	0.168	0.9	0.31 (0.11- 0.84)		
1-2-1-1	C-T-G-4	34	0.034	5	0.011	1			
2-1-1-1	T-C-G-4	16	0.016	12	0.025	0.39			
2-1-2-1	T-C-A-4	34	0.034	22	0.046	0.44	1.96 (0.97- 3.94)		
2-1-2-2	T-C-A-2	19	0.019	15	0.032	0.04			
2-2-1-1	T-T-G-4	186	0.185	93	0.195	0.51			

2-2-1-2	T-T-G-2	13	0.013	7	0.015	0.85
2-2-2-1	T-T-A-4	17	0.017	6	0.013	0.75

**B** – Bolesnici, **F** – Frekvencija, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **N** – Broj, **OA** - Osteoartritis

<sup>1</sup>Haplotipovi su navedeni istim redoslijedom u tablicama 14A i 14B

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR) oznaka zajedničkog haplotipa

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>Haplotip 1-2-1-1; *P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ):  $P < 0.05$

Osim toga, ta razlika postaje statistički vrlo značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.001$ ) prilikom usporedbe ispitivane i kontrolne skupine koje su prisposobljene po spolu i dobi, dodatno prepolovljujući (6 puta manji) rizik za nastanak OA koljena u (do 6%) zdravih pojedinaca (Tablica 14B).

**Tablica 14B.** Studija slučajeva i kontrola s osteoartritisom koljena s najboljom mogućom prisposobom po dobi i spolu: broj procijenjenih haplotipova.

(Iz: *Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. Scand J Immunol 2012;77(2):151-61.*)

Oznake haplotipova <sup>1</sup>		K (n=260)		OA koljena (B) (n=460)			P	OR (95% CI)	Povezanost s OA koljena
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	N	F	N	F				
1-1-1-1	C-C-G-4	83	0.319	135	0.293	0.47			
1-1-1-2	C-C-G-2	12	0.046	34	0.074	0.14			
1-1-1-3	C-C-G-5	3	0.012	8	0.017	0.75			
1-1-2-1	C-C-A-4	30	0.115	44	0.096	0.40			
1-1-2-2	C-C-A-2	42	0.162	80	0.174	0.67			
							0.14 (0.04-		
1-2-1-1	C-T-G-4	15	0.058	4	0.009	0.00007	0.47)	protekcija <sup>4</sup>	
2-1-1-1	T-C-G-4	4	0.015	12	0.026	0.44			
2-1-2-1	T-C-A-4	7	0.027	20	0.043	0.26			
2-1-2-2	T-C-A-2	3	0.012	14	0.030	0.13			
2-2-1-1	T-T-G-4	51	0.196	91	0.198	0.96			

2-2-1-2	T-T-G-2	2	0.008	7	0.015	0.50
2-2-2-1	T-T-A-4	4	0.015	6	0.013	0.75

**B** – Bolesnici, **F** – Frekvencija, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **N** – Broj, **OA** - Osteoartritis

<sup>1</sup>Haplotipovi su navedeni istim redoslijedom u tablicama 14A i 14B

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR) oznaka zajedničkog haplotipa

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>Haplotip 1-2-1-1; *P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ):  $P < 0.001$

Tablica 14A također pokazuje i trend prema predispoziciji za nastanak OA koljena u nositelja haplotipa 2-1-2-2 ( $p < 0.04$ ; OR: 1.96, 95% CI: 0.97-3.94;  $p_{\text{corr}} < 0.08$ ).

S druge strane, u bolesnika s OA kuka ( $n = 259$ , Tablica 15A), haplotip 1-1-1-2 je češće zastupljen nego u kontrolnoj skupini, a razlika je statistički značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.028$ ; OR: 1.75, 95% CI: 1.13-2.7), što sugerira da bi ovaj haplotip mogao biti udružen (povezan) sa 75% većim rizikom za nastanak OA kuka.

**Tablica 15A.** Procijenjene frekvencije haplotipova u bolesnika s osteoartritisom kuka u hrvatskoj populaciji.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

Oznake haplotipova <sup>1</sup>		K (n=1008)		OA kuka (B) (n=518)			OR (95%CI)	Povezanost s OA kuka
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	N	F	N	F	<i>P</i>		
1-1-1-1	C-C-G-4	315	0.313	157	0.303	0.7	1.75 (1.13-2.7) predispozicija <sup>4</sup>	
1-1-1-2	C-C-G-2	52	0.052	45	0.087	0.007		
1-1-1-3	C-C-G-5	15	0.015	8	0.015	0.9		
1-1-2-1	C-C-A-4	108	0.107	44	0.085	0.2		
1-1-2-2	C-C-A-2	179	0.178	90	0.174	0.8		
1-2-1-1	C-T-G-4	33	0.033	11	0.021	0.2		

2-1-1-1	T-C-G-4	28	0.028	26	0.050	0.02	1.85
						5	(1.04-3.29)
2-1-2-1	T-C-A-4	34	0.034	14	0.027	0.5	
2-1-2-2	T-C-A-2	7	0.007	4	0.008	1	
2-2-1-1	T-T-G-4	188	0.187	97	0.187	1	
2-2-1-2	T-T-G-2	13	0.013	4	0.008	0.4	
2-2-2-1	T-T-A-4	15	0.015	8	0.015	0.9	

**B** – Bolesnici, **F** – Frekvencija, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **N** – Broj, **OA** - Osteoartritis

<sup>1</sup>Haplotipovi su navedeni istim redoslijedom u tablicama 15A i 15B

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR) oznaka zajedničkog haplotipa

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>Haplotip 1-1-1-2; *P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.028

Ova statistički značajna razlika prilikom usporedbe ispitivane i kontrolne skupine također je zamijećena i u analizi grupa ispitanika koje su prisposobljene po spolu i dobi (Tablica 15B) ( $p_{\text{corr}} < 0.033$ , OR: 2.02, 95% CI: 1.01-4.12). Nadalje, analiza ispitivane i kontrolne skupine prisposobljene po spolu i dobi pokazala je povezanost 1-2-1-1 haplotipa ( $p_{\text{corr}} < 0.044$ ; OR: 0.37, 95% CI: 0.16- 0.87) s oko tri puta manjim rizikom za nastanak OA kuka (Tablica 15B).

**Tablica 15B.** Studija slučajeva i kontrola s osteoartritisom kuka s najboljom mogućom prisposobom po dobi i spolu: broj procijenjenih haplotipova.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

Oznake haplotipova <sup>1</sup>		K (n=260)		OA kuka (B) (n=494)			OR (95%CI)	Povezanost s OA kuka
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	N	F	N	F	<i>P</i>		
1-1-1-1	C-C-G-4	80	0.308	152	0.308	1		
1-1-1-2	C-C-G-2	12	0.046	44	0.089	0.033	2.02 (1.01-4.12)	predispozicija <sup>4</sup>

1-1-1-3	C-C-G-5	3	0.012	8	0.016	0.76		
1-1-2-1	C-C-A-4	30	0.115	41	0.083	0.15		
1-1-2-2	C-C-A-2	45	0.173	85	0.172	1		
1-2-1-1	C-T-G-4	15	0.058	11	0.022	0.011	0.37 (0.16-0.87)	protekcija <sup>5</sup>
2-1-1-1	T-C-G-4	7	0.027	24	0.049	0.16		
2-1-2-1	T-C-A-4	7	0.027	14	0.028	0.91		
2-1-2-2	T-C-A-2	0	0.000	4	0.008	0.30		
2-2-1-1	T-T-G-4	51	0.196	92	0.186	0.74		
2-2-1-2	T-T-G-2	2	0.008	4	0.008	1		
2-2-2-1	T-T-A-4	4	0.015	6	0.012	0.74		

**B** – Bolesnici, **F** – Frekvencija, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **N** – Broj, **OA** - Osteoartritis

<sup>1</sup>Haplotipovi su navedeni istim redoslijedom u tablicama 15A i 15B

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR) oznaka zajedničkog haplotipa

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>Haplotip 1-1-1-2; *P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.13

<sup>5</sup>Haplotip 1-2-1-1; *P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.044

Zanimljivo, kada su spolne razlike u potpunosti uzete u obzir (Tablica 16), žene (ali ne i muškarci) imaju šest puta manji rizik ( $p_{\text{corr}} < 0.004$ ; OR: 0.14, 95% CI: 0.03-0.54) za nastanak OA koljena ako su nosioci 1-2-1-1 haplotipa. Žene također imaju više od dva i pol puta veći rizik za nastanak OA kuka (OR: 2.56, 95% CI: 1.10-6.19) pod uvjetom da su nosioci 1-1-1-2 haplotipa, ali ta razlika nije statistički značajna nakon vrlo konzervativne korekcije za korištenje više testova (*Bonferroni*) ( $p_{\text{corr}} < 0.08$ ). Nadalje, kod žena postoje dvije razlike u frekvencijama 1-1-2-1 i 1-2-1-1 haplotipova između bolesnica s OA kuka i kontrola (Tablica 16), ali *p*-vrijednost nije ostala značajna nakon *Bonferroni* korekcije.

S druge strane, analiza haplotipova kod muškarca je pokazala da nema razlika u osoba s OA koljena i OA kuka (Tablica 16), izuzev za 2-1-1-1 haplotip koji je statistički značajno povezan s 3.6 puta povećanim rizikom za nastanak OA koljena ( $p = 0.011$ ,  $p_{\text{corr}} = 0.044$ ). Međutim, frekvencija ovog haplotipa je nereproducibilna. Naime, *Phase* program je predvidio dva različita ishoda za istu kontrolnu skupinu, a koji se uglavnom

odnosi na analize u muškim podgrupama. Tako haplotip 2-1-1-1 ima predviđenu frekvenciju od 1.3% u kontrolnoj skupini muškaraca analiziranih zajedno s oboljelima od OA koljena. Međutim, kada se analiziraju bolesnici s OA kuka, tada se predviđene frekvencije više nego udvostruče (2.9%). Zbog ove nedosljednosti, pretpostavljeno je da je razlika u frekvenciji 2-1-1-1 haplotipa između muških bolesnika s OA koljena i muških kontrola beznačajna.

**Tablica 16.** Spolne razlike u haplotipovima IL-1 genskog lokusa za osteoartritis koljena i kuka u hrvatskoj populaciji.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

Oznake haplotipova <sup>1</sup>		OA koljena						OA koljena					
		Žene						Muškarci					
		K (n=224)		B (n=344)				K (n=690)		B (n=132)			
Br.	Ostale	N	F	N	F	P	OR (95% CI)	N	F	N	F	P	OR (95% CI)
1-1-1-2	C-C-G-2	8	0.036	22	0.064	0.14		38	0.055	13	0.098	0.06	
1-1-2-1	C-C-A-4	31	0.138	37	0.108	0.27		73	0.106	11	0.083	0.43	
1-2-1-1	C-T-G-4	13	0.058	3	0.009	0.001 <sup>2</sup>	0.14 (0.03- 0.54)	20	0.029	2	0.015	0.56	
2-1-1-1	T-C-G-4	4	0.018	6	0.017	1		9	0.013	6	0.045	0.011	3.6 (1.12- 11.3)
		Žene				OA kuka		Muškarci				OA kuka	
		K		B				K		B			



		(n=224)		(n=346)				(n=690)		(n=166)			
1-1-1-2	C-C-G-2	8	0.036	30	0.087	0.017	2.56 (1.10-6.19)	38	0.055	15	0.090	0.09	
1-1-2-1	C-C-A-4	31	0.138	28	0.081	0.028	0.55 (0.31-0.97)	73	0.106	16	0.096	0.72	
1-2-1-1	C-T-G-4	13	0.058	9	0.026	0.053	0.43 (0.17-1.11)	19	0.028	2	0.012	0.40	
2-1-1-1	T-C-G-4	5	0.022	20	0.058	0.06		20	0.029	5	0.030	1	

**B** – Bolesnici, **Br.** – Brojčane, **F** –Frekvencija, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **N** – Broj, **OA** – Osteoartritis.

<sup>1</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR) oznaka zajedničkog haplotipa

<sup>2</sup>Haplotip 1-2-1-1; *P* s najkonzervativnijom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha = 0.004$ )

#### 4.1.3 Analiza genotipova

Nakon učinjene analize haplotipova, učinjena je analiza frekvencije genotipova između ispitivane i kontrolne skupine. Ukupni broj mogućih genotipova je funkcija broja predviđenih haplotipova. Program *Phase* je predvidio različit broj mogućih haplotipova za analizu između bolesnika s OA koljena i kontrola te između bolesnika s OA kuka i kontrola. U prvoj sparenoj grupi (bolesnici s OA koljena – kontrole) je bilo 25 haplotipova, dok je u drugoj sparenoj grupi (bolesnici s OA kuka – kontrole) bilo 28 haplotipova. U tablicama 14A, 14B, 15A i 15B je navedeno 12 haplotipova s frekvencijama iznad 0.015 od svake skupine. Analizirane su sve moguće genotip-haplotip kombinacije, ali su u tablicama navedene samo one s *p*-vrijednostima ispod 0.2 (Tablice 17 i 18). Genotipovi su grupirani fokusirajući se na pojedini haplotip, a potom je analizirana takva grupna povezanost s bolestima.

U bolesnika s OA koljena (Tablica 17) našli smo 3 genotipa s razlikama između ispitanika i kontrola koji su imali statistički značajnu  $p$ -vrijednost. Naime, analiza genotipova bolesnika s OA koljena (Tablica 17) pokazala je da skup genotipova koji uključuju 1-2-1-1 haplotip značajno povezan s manjim rizikom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} = 0.032$ ; OR: 0.30 i 95% CI: 0.10-0.81). U ostala dva genotipa nije uočena povezanost sa zaštitom, s obzirom na činjenicu da su njihove korigirane  $p$ -vrijednosti bile iznad 0,05 nakon *Bonferroni* korekcije (Tablica 17), a njihove odgovarajuće komponente haplotipa nisu bile povezane s bolešću (Tablice 14A i 14B). Tako je za prošireni haplotip 1-2-1-1 IL-1 genskog lokusa pronađena povezanost sa zaštitom od nastanka OA koljena i na razini haplotipa kao i na razini genotipa.

**Tablica 17.** Analiza povezanosti genotipova IL-1 genskog lokusa s osteoartritisom koljena u hrvatskoj populaciji<sup>1</sup>.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.)

Oznake genotipova		K	OA koljena (B)	$P$	OR (95%CI)	Moguća povezanost
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	n=504	n=238			
1-1-1-1 / 1-1-2-1	C-C-G-4 / C-C-A-4	48	11	0.021	0.46 (0.22-0.94)	(protekcija) <sup>4</sup>
1-1-1-1 / 1-2-1-1	C-C-G-4 / C-T-G-4	11	0	0.022	0.09 (0.00-1.20)	
1-1-1-2 / 2-1-2-2	C-C-G-2 / T-C-A-2	0	2	0.03	11.1 (0.6-7x10e6)	
1-1-2-2 / 1-2-1-1	C-C-A-2 / C-T-G-4	9	0	0.035	0.11 (0.00-1.42)	
1-1-2-2 / 2-2-1-1	T-C-A-4 / T-T-A-2	32	24	0.07		
2-2-1-1 / 2-2-1-1	T-T-G-4 / T-T-G-4	10	8	0.25		
2-2-1-1 / 2-2-2-2	T-T-G-4 / T-T-A-2	5	0	0.18		
1-1-1-2 / svi	C-C-G-2 / svi	49	33	0.09		
1-2-1-1 / svi	C-T-G-4 / svi	34	5	0.008	0.30 (0.10-0.81)	protekcija <sup>5</sup>

**B** – Bolesnici, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **OA** – Osteoartritis.

<sup>1</sup>Navedeni su samo oni genotipovi s  $p \leq 0.2$

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(+3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR)

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>*P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.084

<sup>5</sup>*P* s konzervativnom *Bonferroni* korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.032

Naprotiv, analiza genotipova bolesnika s OA kuka (Tablica 18) je pokazala da skup genotipova koji uključuju 1-1-1-2 haplotip nije statistički značajno povezana s povećanim rizikom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} < 0.07$ ; OR: 1.70, 95% CI: 1.06-2.72). Zanimljivo, kompletni set genotipova koji uključuju 1-1-1-2 prošireni haplotip za OA kuka (Tablice 15A i 15B) kao zajednički nazivnik (1-1-1-2 / svi) nije značajno povezan s predispozicijom za nastanak bolesti nakon najkonzervativnije *Bonferroni* korekcije (Tablica 18). Nadalje, analiza je pokazala dva statistički značajna genotipa povezanih s predispozicijom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} < 0.008$ ; 1-1-1-1 / 2-1-1-1) i protekcije od nastanka OA kuka ( $p < 0.017$ ; 1-1-1-1 / 1-1-2-1) (Tablica 18). Postoji mogućnost da je rizik za predispoziciju za nastanak OA kuka na razini genotipa u našoj analizi izbalansiran zbog slučajne povezanosti predisponirajućeg (1-1-1-2) haplotipa s onima koji su protektivni. Međutim, daljnjom analizom smo otkrili i da bolesnici s OA koljena i OA kuka koji imaju isti genotip (1-1-1-1 / 1-1-2-1), a koji je statistički značajno različit između ispitanika i kontrola i povezan s protekcijom za nastanak OA koljena i OA kuka (Tablice 17 i 18), gubi svoju statističku značajnost nakon najkonzervativnije *Bonferroni* korekcije ( $p_{\text{corr}} = 0.084$  i 0.08). Budući da se radi o graničnim *p*-vrijednostima, možemo ustvrditi da najmanje postoji trend ka protekciji na genotipskoj razini (koja dodatno potvrđuje postojanje značajne udruženosti s protekcijom na haplotipskoj razini).

**Tablica 18.** Analiza povezanosti genotipova IL-1 genskog lokusa s osteoartritisom kuka u hrvatskoj populaciji<sup>1</sup>.

(Iz: Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. Scand J Immunol 2012;77(2):151-61.)

Oznake genotipova		K	OA kuka (B)		P	OR (95%CI)	Moguća povezanost
Brojčane <sup>2</sup>	Ostale <sup>3</sup>	n=504	n=259				
1-1-1-1 / 1-1-2-1	C-C-G-4 / C-C-A-4	48	12	0.017	0.46 (0.23-0.92)	(protekcija) <sup>4</sup>	
1-1-1-1 / 2-1-1-1	C-C-G-4 / T-C-G-4	3	10	0.002	6.71 (1.69-30.98)	predispozicija <sup>5</sup>	
1-1-1-2 / 1-1-1-2	C-C-G-2 / C-C-G-2	3	5	0.13			
1-1-1-2 / 2-1-1-1	C-C-G-2 / T-C-G-4	2	4	0.19			
1-1-1-2 / 2-1-2-2	C-C-G-2 / T-C-A-2	0	3	0.013	13.77 (0.84-8x10e6)		
1-1-2-2 / 1-1-2-2	C-C-A-2 / C-C-A-2	17	4	0.17			
1-1-2-2 / 1-1-2-1	C-C-A-2 / C-C-A-4	8	8	0.17			
1-1-2-2 / 1-2-1-1	C-C-A-2 / C-T-G-4	9	1	0.18			
2-2-1-1 / 2-2-2-2	T-T-G-4 / T-T-A-2	5	0	0.17			
1-1-1-2 / svi	C-C-G-2 / svi	49	40	0.020	1.70 (1.06-2.72)	(predispozicija) <sup>4</sup>	
1-2-1-1 / svi	C-T-G-4 / svi	33	11	0.20			

**B** – Bolesnici, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **OA** – Osteoartritis.

<sup>1</sup>Navedeni su samo oni genotipovi s  $p \leq 0.2$

<sup>2</sup>IL1A(-889)-IL1B(3954)-IL1B(-511)-IL1RN(VNTR)

<sup>3</sup>Oznake nukleotida navedenih SNP alela<sup>2</sup> i brojeva kopija VNTR

<sup>4</sup>P s konzervativnom Bonferroni korekcijom ( $\alpha$ ) < 0.08 / < 0.07

<sup>5</sup>P s konzervativnom Bonferroni korekcijom ( $\alpha$ ) = 0.008

## 4.2 Interleukin-17 (IL-17)

### 4.2.1 Analiza frekvencije pojedinog alela i genotipova

Frekvencije alela i genotipova IL17A SNP (-197G>A) bolesnika s OA koljena i kuka iz hrvatske populacije su navedene u Tablici 19.

**Tablica 19.** Analiza povezanosti IL17A SNP s osteoartritisom kuka i koljena u hrvatskoj populaciji.

		Frekvencije alela <sup>1</sup>					Frekvencije genotipova <sup>1</sup>			
		OA kuka (B)	K	<i>P</i> (OR)			OA kuka (B)	K	<i>P</i>	OR (95% CI)
IL17A <sup>2</sup>	SNP -197	n=344	n=272		IL17A <sup>3</sup>	SNP -197	n=172	n=136		
1	G	0.660 (227)	0.632 (172)	0.48 (1.13)	1/1	G/G	0.453 (78)	0.397 (54)	0.53	1.14 (0.74-1.76)
2	A	0.340 (117)	0.368 (100)		1/2	G/A	0.413 (71)	0.471 (64)	0.53	0.88 (0.57-1.34)
					2/2	A/A	0.134 (23)	0.132 (18)		
		Frekvencije alela <sup>1</sup>					Frekvencije genotipova <sup>1</sup>			
		OA koljena (B)	K	<i>P</i> (OR)			OA koljena (B)	K	<i>P</i>	OR (95% CI)
IL17A <sup>2</sup>	SNP -197	n=372	n=272		IL17A <sup>3</sup>	SNP -197	n=186	n=136		
1	G	0.637 (237)	0.632 (172)	0.90 (1.02)	1/1	G/G	0.409 (76)	0.397 (54)	0.89	1.03 (0.67-1.59)
2	A	0.363 (135)	0.368 (100)		1/2	G/A	0.457 (85)	0.471 (64)	0.88	0.97 (0.64-1.47)
					2/2	A/A	0.134 (25)	0.132 (18)		

**B** – Bolesnici, **K** – Kontrole, **n** – Broj individua, **OA** – Osteoartritis.

<sup>1</sup>Frekvencije (broj)

<sup>2</sup>Oznake alela

<sup>2</sup>Oznake genotipa

Statistička analiza učinjena je usporedbom frekvencija alela i genotipova bolesnika s OA koljena i kuka iz hrvatske populacije kojima je ugrađena PEP ili TEP koljena, odnosno TEP kuka, s onima u zdravih dobrovoljnih davatelja krvi kao kontrolne skupine. Alelne razlike IL17A SNP (-197G>A) nisu statistički značajno različite između ispitanika i kontrola (Tablica 19). Također, iz Tablice 19 je razvidno da se ni frekvencije alela i genotipova IL17A statistički značajno ne razlikuju između bolesnika i kontrola.

## 5. RASPRAVA

Poznata je činjenica da je prekomjerna ekspresija IL-1 $\beta$  citokina povezana s razvojem artritisa, jer ista može dovesti do oštećenja zglobnih tkiva *in vitro* (312) kao i uzrokovati nastanak artritisa kod animalnih modela (kunić) (313). Kako se IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  citokini funkcionalno ne razlikuju, a mogu biti modulirani od strane antagonista IL-1 receptora, nekoliko je studija istraživalo polimorfizme IL-1 genskog lokusa povezanih s nastankom osteoartritisa (14, 160, 162, 173, 200, 314-317). Ove studije su pokazale da su razlike u frekvencijama alela i genotipova polimorfizama IL-1 genskog lokusa složene, jer ovise o aspektima kao što su lokalizacija bolesti i etnička pripadnost.

U ovom istraživanju smo proučavali povezanost između polimorfizama IL-1 genskog lokusa i predispozicije za nastanak osteoartritisa velikih zglobova u hrvatskoj populaciji. Usporedili smo frekvencije alela, haplotipova i genotipova četiri polimorfizama unutar lokusa (odnosno unutar IL1A, IL1B i IL1RN gena) između ispitivane (bolesnici s OA koljena i kuka) i kontrolne skupine. Rezultati prethodnih objavljenih vlastitih istraživanja (analiza rs16944 IL1B i VNTR polimorfizma IL1RN te haplotipova 2 markera IL-1 genskog lokusa) pokazali su da nema značajne povezanosti s OA koljena i kuka u hrvatskoj populaciji (297, 298). Ovim istraživanjem proširena je analiza na četiri polimorfizma: IL1A (rs1800587) - IL1B (rs1143634) - IL1B (rs16944) - IL1RN (VNTR), ali su dodatno i analizirane razlike među spolovima.

Rezultati ovog istraživanja, a koji se odnose na usporedbu frekvencije alela između ispitivane i kontrolne skupine, su pokazali da razlike u frekvencijama alela za IL1A (-889) i IL1B (+3954) između ispitivane i kontrolne skupine nisu bile statistički značajne, iako su one za prethodni SNP, između bolesnika s OA koljena i kontrola, pokazale trend ( $p < 0.07$ ) prema statističkoj značajnosti za češći (major) alel (Tablica

12). Dosad, u našem uzorku od oko 1000 ispitanika nismo našli odstupanja od objavljenih frekvencija alela iz grupe IL1 lokusa (IL1B G-511A), uključujući i frekvencije IL1RN VNTR-a. Nadalje, usporedbom frekvencije alela ispitivane i kontrolne skupine pokazano je da alelne razlike IL17A SNP (-197G>A) također nisu statistički značajno različite između ispitanika i kontrola (Tablica 19).

Zanimljivo, pronađene su dvije povezanosti s bolešću, ali samo kod osoba ženskog spola. Prva takva povezanost je novi haplotip 1-2-1-1 povezan sa 6 puta manjim rizikom za nastanak OA koljena. Druga povezanost je prethodno objavljeni "haplotip proširenog rizika" 1-1-1-2, koji je u našoj studiji bio povezan s više od dva i pol puta (> 2,5 puta) većom predispozicijom za nastanak OA kuka. Međutim, potonji haplotip (1-1-1-2) je i novi po tome što je u ovom istraživanju pokazano da je specifičan za ženski spol, s obzirom da ova povezanost s bolešću nije pronađena u muškaraca.

Čimbenike koje treba razmotriti kao nepovoljne, jer su možda mogli negativno utjecati na dobivene rezultate (tj. na pouzdanost rezultata) u našem istraživanju, su suboptimalno usklađena ispitivana i kontrolna skupina po dobi i spolu te relativno mali broj ispitanika. Što se tiče prisposode ispitivane i kontrolne skupine po dobi i spolu, prethodno navedeni čimbenici nastojali su se korigirati izračunavanjem veličine uzorka koji je potreban za otkrivanje razlike od 5% u frekvencijama haplotipova (s OR u rasponu od 0,2 do 0,4) između ispitivane i kontrolne skupine i to sa snagom studije od 80%. Za takvu analizu bilo bi dostatno barem 230 ispitanika i 130 kontrola, koji su potom i odabrani za striktniju analizu ispitivane i kontrolne skupine prisposobljene po dobi i spolu (tablice 2B i 3B). Ovi rezultati sugeriraju da bi relativno mali postotak (3-6%) od normalne populacije mogao imati do 3- ili 6-puta manji rizik za nastanak OA kuka ili koljena, ukoliko su nosioci 1-2-1-1 haplotipa IL1 genskog lokusa. Ipak, moguće je da tijekom ovog istraživanja nisu detektirane važne asocijacije, tj. povezanosti s



bolesti te bi možda tipiziranje više markera u više ispitanika u budućem istraživanju mogao riješiti ovaj problem. Što se tiče drugog čimbenika kojeg treba razmotriti, a to je relativno mali broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje, ova studija je jedna od najvećih do sada objavljenih u svijetu (isključujući meta-analize). Za ilustraciju, na slici 10 možemo usporediti broj ispitanika između objavljenih studija o genetskom utjecaju IL1 lokusa na nastanak OA. No, to ne znači da je ispitivani broj bolesnika i kontrola dostatan da se otkriju svi čimbenici rizika za OA i dokažu povezanosti u ovoj populaciji. Trebalo bi nastaviti prikupljati uzorke (i bolesnika i kontrola) te bi se sa oko 500 do tisuću uzoraka po skupini približilo svjetskim standardima u studijama s najčešćim poligenetskim bolestima današnjice.

Nadalje, što se tiče povećanog rizika za nastanak OA kuka, rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate objavljenog istraživanja za IL1RN VNTR u njemačkoj populaciji (290), a također potvrđuju i rezultate nizozemske studije Meulenbelt i sur. (184) kao i studije za populaciju Ujedinjenog Kraljevstva Smith i sur. (292) u kojima je potvrđeno da je haplotip 1-1-1-2 povezan s predispozicijom za nastanak OA kuka. Nasuprot tome, rezultati ovog istraživanja su u suprotnosti s rezultatima kasnije studije za populaciju Ujedinjenog Kraljevstva (UK) (318), u kojoj nije bilo povezanosti s predispozicijom za nastanak OA kuka u osoba s 1-1-1-2 haplotipom (Slika 10). To je možda zbog toga što je broj ispitanika muškog spola s OA kuka u njihovoj studiji bio nepoznat pa bi stoga takva povezanost mogla biti zapravo prikrivena. Razina povećanog rizika za nastanak OA kuka (mjereno s OR) koju imaju nosioci 1-1-1-2 haplotipa bila je relativno blaga (1.75-2.56) u odnosu na prethodno objavljene studije za druge bjelačke populacije (Slika 10). Da je u ovom istraživanju analizirano 7-8 markera prilikom analize haplotipova, možda bi se pronašla povezanost s većim rizikom. U prilog tome govori i studija Smith i sur. (292) koji su otkrili 23-puta povećan rizik za nastanak OA

kuka prilikom analize haplotipa proširenog rizika s 8 markera za haplotip 2-1-1-1-1-2-2-1 (identičan našem 1-1-1-2). Međutim, ta razlika također može biti posljedica nejednakosti između studija u pogledu etničke pripadnosti, a možda spola i dobi kontrola.

Što se tiče predispozicije za nastanak OA koljena, rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate istraživanja nizozemske studije (184) u kojoj također nije pronađena povezanost s predispozicijom za nastanak OA koljena, ali su u suprotnosti s rezultatima studije za populaciju UK (212, 292) i njemačke studije (290) kod kojih je pronađena povezanost IL1 genskog lokusa s predispozicijom za nastanak OA koljena (Slika 10). U studiji Smith i sur. (292) pronađen je 2 - 4 puta povišen rizik za nastanak OA koljena u osoba koje nose haplotip 2-1-1-1-1-1-1-1 (identičan našem 1-1-1-1; Slika 10).

S obzirom na manji rizik za nastanak OA koljena, protektivni 1-2-1-1 haplotip u ovom istraživanju do sada nije opažen. Smith i sur. opisali su protektivni haplotip 1-2-2-1-1-1 (identičan našem X-1-2-1) za nastanak OA koljena (292), a Attur i sur. (319) opisali su sličan rezultat u nosioca dva različita polimorfizma oko IL1RN gena (Slika 10).



PEP – Parcijalna endoproteza, ROA – Radiološki dokazan OA, SAD – Sjedinjene Američke Države, SNP - Polomorfizam jednog nukleotida, TEP – Totalna endoproteza, UK – Ujedinjeno Kraljevstvo, VNTR – Varijabilni broj tandemskih ponavljanja.

<sup>1</sup>M>m, major (M) – češći i minor (m) - rjeđi SNP aleli (ispod, 1 predstavlja M, a 2 predstavlja m alel za sve SNP lokuse; navedeni VNTR aleli imaju: 1 – četiri ponavljanja, 2 – dva ponavljanja, 3 – pet ponavljanja i 4 – tri ponavljanja).

<sup>2</sup>U studiji Attura i sur. (319), ROA koljena je analiziran kod slučajeva bez usporedbe sa zdravim kontrolama uspoređujući 2 skupine: jednu, s Kellgren – Lawrence stupnjem 1 do 2 (K/L-1/2), uspoređujući s drugom u kojoj je K/L stupanj bio 3 do 4 (KL-3/4).

<sup>3</sup>Aleli u zagradama označavaju dodatne SNP blizu onih koji su prikazani, ali nisu pozicionirani na mapi zbog manjka prostora. U redu koji počinje s referencijom *Chapman (318)*, prikazan je susjedni SNP alel umjesto IL1RN VNTR zbog uske neravnoteže povezanosti između njih. Tako, je marker za IL1RN VNTR alel 2 označen kao (2). Omjer izgleda (OR) nalazi se na desnoj strani od haplotipskog ili lokusnog paralelograma označavajući moguću povezanost ili s predispozicijom (ukoliko je veći od 1) ili s protekcijom (ukoliko je manji od 1). Kako bi se lakše razlikovalo, predispozicija za nastanak OA je označena manje zasjenjenim paralelogramom, protektivni haplotipovi više zasjenjenim paralelogramom, dok haplotipovi (ili lokusi) između ovih krajnosti predstavljaju one haplotipove koji nisu statistički značajni. Uz OR nalazi se 95% interval pouzdanosti (95% CI) kako bi se bolje prikazala prijašanja i sadašnje vlastito istraživanje.

(\*) – Označava da 95% CI nije naveden;

n – Označava broj osoba u studiji.

Na temelju svega prethodno navedenog, postavlja se pitanje kako interpretirati kontradiktorne rezultate ovih studija udruženosti s OA (Slika 10)? Prvo (1), varijacije između ovog istraživanja i objavljenih studija (184, 212, 290, 292) vjerojatno odražavaju razlike u varijabilnosti složenosti nasljeđa te izloženosti okolišu u različitim populacijama. Drugo (2), određeni nevezani (za IL-1) faktor rizika može doprinijeti predispoziciji za nastanak OA bilo u IL-1 genskoj obitelji ili u njegovoj blizini, kao, na primjer, u drugim genima (IL36G, IL36A, IL36B, IL36RN, IL1F10 i IL37), mikroRNA ili CpG metilacijskim mjestima (Slika 10). Treće (3), genetski rizik za nastanak OA može uključivati više čimbenika unutar ili izvan IL-1 genskog lokusa, uključujući i kombinaciju dvaju prethodno navedenih objašnjenja.

Koji su argumenti za i protiv navedenih mogućnosti? U pogledu prvog objašnjenja, fenotipski je možda bolest identična, ali genetski heterogena (takve razlike je teško detektirati pri dijagnozi jer manjka etiopatologija). Tada bi i predisponirajući geni možda bili rasprostranjeni različito u ljudskim populacijama. Nadalje, čak i ako je bolest genetski homogena, varijacije gena u pojedinim populacijama ili genetski otklon (od engl. *genetic drift*) mogu učiniti zajedničke polimorfizme rijetkima. Takve genetske markere moglo bi biti teško identificirati, s obzirom da konzervativna procjena genetskog rizika zahtijeva dokumentiranu značajnu povezanost pojedinog markera u jednoj etničkoj populaciji i potvrdu takvog ishoda u drugoj nesrodnoj populaciji. Takav zahtjev može isključiti potencijalno korisne informacije pogotovo za bolesti sa složenim nasljeđem. Sličan problem prisutan je i kod studija udruženosti cijelog genoma (GWAS), a taj je da one mogu otkriti samo one genetske čimbenike koji nose vrlo visok (ili vrlo nizak) rizik za nastanak neke bolesti. Isto tako, sličnim slabostima mogu biti sklone i meta-analize. Jedna od takvih meta-analiza je i nedavno objavljena velika meta-analiza genetskih studija slučajeva s OA kuka i koljena i kontrola Kerkhova i sur. (244),

koja je samo povećala postojeće nejasnoće. Naime, meta-analize mogu pronaći genetske markere povezane s visokim rizikom za nastanak pojedine bolesti, ali, nažalost, i isključiti za bolest lokus-specifičnu povezanost niskog rizika (ili pri genetskoj heterogenosti). Ovakva pogreška svojstvena je samoj metodi; naime, metoda meta-analize balansira razlike unutar populacija i tako se lako može previdjeti povezanost s funkcionalnom genetskom grupom, odnosno ona otkriva samo zajedničke polimorfizme koji bi mogli biti ili rijetki ili ne postoje. Međutim, nameće se pitanje zašto ne bi postojali takvi zajednički polimorfizmi? Dakle, kako bi se adekvatno procijenio mali i srednje izraženi genetski rizik za nastanak OA, važno je istražiti različite etničke i rasne subpopulacije u potrazi za varijacijama unutar funkcionalnih grupa. Naime, razmotrimo prvu hipotezu, a ta je da se nizak genetski rizik za nastanak OA može distribuirati preko pojedinih funkcionalnih grupa. Čimbenici koji uzrokuju upalu upravo predstavljaju takvu grupu, uključujući IL-1 citokin. Djelovanje IL-1 ovisi o genima koji kodiraju agoniste, antagoniste, receptore, signalne pretvornike (od engl. *signal transducers*) i proteine koji reguliraju biologiju IL-1 citokina, kao i ne-proteinske epigenetske regulatore (kao npr. mikroRNA i CpG otoci). Svi oni bi mogli imati alelne varijante koje bi mogle predstavljati rizik za nastanak OA. Aleli bi mogli biti distribuirani među različitim ljudskim populacijama na takav način da svaka subpopulacija posjeduje samo jedan čimbenik rizika (ili, u najboljem slučaju, nekoliko njih). Dakle, moglo bi se rijetko (ili možda uopće ne) prepoznati isti čimbenik rizika u više od jedne subpopulacije. Stoga, kako bi se procijenili svi genetski čimbenici koji predisponiraju nastanku OA, važno je u budućnosti dokumentirati genetske rizike u što više ljudskih subpopulacija.

Što se tiče drugog tumačenja, malo je vjerojatno da je rizik za nastanak OA povezan s drugim genom ili genetskim elementom u susjedstvu IL-1 genskog lokusa, jer

nema mikroRNA (miRNA) molekula u IL-1 genskom lokusu (one najbliže su udaljene oko 1Mb) prema miRBase-19 bazi podataka (320). Dakle, teoretski, postoji mogućnost utjecaja alela do sada još neidentificirane miRNA molekule ili CpG otoka.

Treće tumačenje je također manje vjerojatno objašnjenje zbog istog razloga, odnosno nedostatka dokaza. Ipak, višestruki čimbenici rizika usko vezani za IL-1 lokus mogu bolje pojasniti kontroverzu oko rizika za nastanak OA u različitim subpopulacijama. Pretpostavimo da postoje dva čimbenika rizika povezana u određenom haplotipu IL-1 lokusa. Prvi čimbenik je hipotetska miRNA koji predisponira nastanku OA reguliranjem ciljnog gena na drugom kromosomu, a drugi čimbenik hipotetski može mijenjati rizik putem upale (i nalazi se unutar IL-1 genskog lokusa). MiRNA će pokazati povezanost s bolešću samo onda kada određeni kromosomi (u ovom slučaju najmanje dva: jedan s miRNA i jedan s možebitnim čimbenikom nastanka OA kojeg miRNA modulira) budu prisutni u genomu bolesnika. Ovakav ili sličan scenarij bi se pojavio u analizama kao varijacija u povezanosti različitih haplotipova i genotipova s predispozicijom za nastanak bolesti u ovisnosti o ispitivanoj populaciji. Time se može objasniti kako smo pronašli dodatne značajne povezanosti pojedinih genotipova s OA kuka u ovom (Tablica 18) i prethodnom istraživanju (297). Međutim, potvrda ove hipoteze zahtijeva daljnja istraživanja.

U daljnjem istraživanju ispitali smo i povezanost SNP rs2275913 (-197G>A) u području promotora gena IL17 s predispozicijom za nastanak OA koljena i kuka u hrvatskoj populaciji. Nismo pronašli povezanost s ovom bolesti. Ova studija predstavlja prvu analizu ove vrste za hrvatsku populaciju, drugu (u svijetu) analizu moguće povezanosti IL17 gena s predispozicijom za nastanak OA kuka, i prvu analizu mogućeg povezanosti istog gena s predispozicijom za nastanak OA koljena, uopće.

IL-17 predstavlja grupu citokina koja se pretežito sastoji od 2 proteina: IL-17A i IL-17F, a oba su proupalni citokini. Oni imaju važnu ulogu u upalnom procesu te su uključeni u patofiziologiji autoimunih bolesti i reakciji odbacivanja transplantata (321). Prema Liu i sur. (322), proksimalni promotor IL17A sadrži nekoliko veznih mjesta za transkripcijske čimbenike, uključujući i vezna mjesta za transkripcijski čimbenik nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (NFATC). NFATC je transkripcijski čimbenik važan za regulaciju T stanicama posredovane IL17A genske transkripcije (322). SNP - 197(G>A, rs2275913) se nalazi u promotorskoj regiji neposredno uz NFATC vezna mjesta (321). Ovi rezultati ukazuju na funkcionalnu ulogu rs2275913 SNP u promotorskoj aktivnosti IL17A gena kroz utjecaj na NFATC transkripcijsku aktivnost, čime utječe na proizvodnju IL-17A od strane T stanica (321). S obzirom na činjenicu da je 197A alel značajno povezan s povećanom proizvodnjom IL-17A (320), genotipizacija G197A se može koristiti za predviđanje predispozicije i težine IL-17-srodnih bolesti kao što su RA, parodontna bolest, multipla skleroza, alergijski rinitis, psorijaza, upalna bolest crijeva i reakcija odbacivanja transplantata (323).

Iako se za IL-17 pretpostavlja da ima ulogu u patofiziologiji OA, njegova uloga još nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, istraživanje Southama i sur. ne podupire tezu da IL17A ili IL17F kodiraju predispoziciju za nastanak OA kuka u populaciji Ujedinjenog Kraljevstva, a koja je prethodno identificirana na kromosomu 6 (182, 186). Ipak, prethodno objavljena studija Nordanga i sur. (324) je pokazala da je SNP u promotorskoj regiji gena IL17A (rs2275913, G-197>A) povezan s predispozicijom za nastanak RA. Nadalje, nedavna je studija pokazala da povećana ekspresija IL-17A nije samo ograničena na sinovijalna tkiva bolesnika oboljelih od RA, već je prisutna i kod drugih oblika upalnog artritisa, kao što je primjerice OA (325).



Uzimajući u obzir prethodno navedeno, kao i činjenicu da se naši rezultati (297, 298) s IL-1 lokusom razlikuju od britanske populacije (212), proveli smo analizu IL17A lokusa u bolesnika s OA kuka, ali smo i proširili tu analizu na bolesnike s OA koljena u našoj populaciji. Unatoč negativnim rezultatima dobivenim u dosada provedenim analizama za hrvatsku, ali i populaciju Ujedinjenog Kraljevstva, neke buduće studije morati će biti usmjerene na utvrđivanje pretpostavke da li je uistinu IL-17 protein uključen u patofiziologiji OA, kao što to tvrde Kapoor M i sur. (252). U budućnosti planiramo proširiti naše istraživanje dodavanjem jednog ili više novih polimorfnih markera za analizu haplotipa.

## 6. ZAKLJUČCI

Kako je navedeno u 3. poglavlju ovog Doktorskog rada, cilj istraživanja bio je proučiti ulogu proupalnih citokina IL-1 i IL-17 u populaciji bolesnika s uznapređovalim oblikom primarnog OA koljena i kuka istražujući polimorfizme njihovih gena. Na temelju postavljenih specifičnih ciljeva ovog istraživanja, mogu se donijeti slijedeći zaključci:

- Ovim istraživanjem utvrđeni su polimorfizmi IL1A (rs1800587, C-889T), IL1B (rs1143634, C+3954T) i IL-17A (rs2275913, G-197A) u bolesnika s uznapređovalim oblikom primarnog OA koljena i kuka kojima je ugrađena TEP kuka, odnosno TEP ili PEP koljena i uspoređeni s kontrolnom skupinom ispitanika iz hrvatske populacije dobrovoljnih darivatelja krvi, ali su nađene i povezanosti s bolešću.
- Analiza frekvencije alela za IL1A (rs1800587, C-889T) i IL1B (rs1143634, C+3954T) je pokazala da razlike u frekvencijama alela za IL1A (-889) i IL1B (+3954) nisu bile statistički značajne, iako su one za prethodni SNP, između bolesnika s OA koljena i kontrola, pokazale trend ( $p < 0.07$ ) prema statističkoj značajnosti za češći (major) alel. Kada su uspoređene frekvencije genotipova jednog IL1A (-889) i IL1B (+3954) alela, sve razlike su bile statistički beznačajne, osim onih za populaciju bolesnika s OA koljena. Nadalje, frekvencije alela i genotipova IL17A SNP (-197G>A) nisu statistički značajno različite između bolesnika i kontrola.
- Analizom frekvencije genotipova u populaciji bolesnika s OA koljena uočene su dvije značajne razlike u frekvencijama genotipova prema kontrolama u IL1A (-889) SNP. Homozigotni češći/rjeđi alelni 1/1 (C/C) genotip je povezan s

protekcijom za nastanak OA koljena, dok je heterozigotni češći/rjeđi alelni 1/2 (C/T) genotip povezan s predispozicijom za nastanak bolesti.

- Proširivanjem ovog ispitivanja uvođenjem rezultata prethodnog istraživanja s dva polimorfna markera za IL1 regiju: IL1B (rs16944, G-511A) i IL1RN (VNTR), a kako bi se definirao prošireni haplotip (IL1A C-889T, IL1B C+3954T, IL1B G-511A i IL1RN VNTR), dokazano je slijedeće:

1. Bolesnici s OA koljena ( $n = 238$ ) nešto su rjeđe nosioci haplotipa 1-2-1-1 u usporedbi s kontrolama. Ta razlika je statistički značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.05$ ) te sugerira da je 1-2-1-1 haplotip povezan s oko 3 puta manjim rizikom za nastanak OA koljena (OR: 0.31; 95% CI: 0.11 – 0.84). Ta razlika postaje statistički vrlo značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.001$ ) prilikom usporedbe ispitivane i kontrolne skupine koje su prisposobljene po spolu i dobi, dodatno prepolovljujući (6 puta manji) rizik za nastanak OA koljena u (do 6%) zdravih pojedinaca. Također, uočen je i trend prema predispoziciji za nastanak OA koljena u nositelja haplotipa 2-1-2-2 ( $p < 0.04$ ; OR: 1.96, 95% CI: 0.97-3.94;  $p_{\text{corr}} < 0.08$ ).

2. U bolesnika s OA kuka ( $n = 259$ ), haplotip 1-1-1-2 je češće zastupljen nego u kontrolnoj skupini, a razlika je statistički značajna ( $p_{\text{corr}} < 0.028$ ; OR: 1.75, 95% CI: 1.13-2.7), što sugerira da bi ovaj haplotip mogao biti udružen (povezan) sa 75% većim rizikom za nastanak OA kuka. Ova statistički značajna razlika prilikom usporedbe ispitivane i kontrolne skupine također je zamijećena i u analizi grupa ispitanika koje su prisposobljene po spolu i dobi ( $p_{\text{corr}} < 0.033$ , OR: 2.02, 95% CI: 1.01-4.12). Nadalje, analiza ispitivane i kontrolne skupine prisposobljene po spolu i dobi pokazala je povezanost 1-2-1-1 haplotipa ( $p_{\text{corr}} < 0.044$ ; OR: 0.37, 95% CI: 0.16- 0.87) s oko tri puta manjim rizikom za nastanak OA kuka.

3. Kada su spolne razlike u potpunosti uzete u obzir, žene (ali ne i muškarci) imaju šest puta manji rizik ( $p_{\text{corr}} < 0.004$ ; OR: 0.14, 95% CI: 0.03-0.54) za nastanak OA koljena ako su nosioci 1-2-1-1 haplotipa. Žene također imaju više od dva i pol puta veći rizik za nastanak OA kuka (OR: 2.56, 95% CI: 1.10-6.19) pod uvjetom da su nosioci 1-1-1-2 haplotipa, ali ta razlika nije statistički značajna nakon vrlo konzervativne korekcije za korištenje više testova (*Bonferroni*) ( $p_{\text{corr}} < 0.08$ ). Nadalje, kod žena postoje dvije razlike u frekvencijama 1-1-2-1 i 1-2-1-1 haplotipova između bolesnika s OA kuka i kontrola, ali  $p$ -vrijednost nije ostala značajna nakon *Bonferroni* korekcije.
4. Analiza haplotipova kod muškarca je pokazala da nema razlika u osoba s OA koljena i OA kuka, izuzev za 2-1-1-1 haplotip koji je statistički značajno povezan s 3.6 puta povećanim rizikom za nastanak OA koljena ( $p = 0.011$ ,  $p_{\text{corr}} = 0.044$ ). Međutim, frekvencija ovog haplotipa je nereproducibilna.
5. Analizom genotipova u bolesnika s OA koljena pronađena su 3 genotipa s razlikama između ispitanika i kontrola koji su imali statistički značajnu  $p$ -vrijednost. Naime, analiza genotipova bolesnika s OA koljena pokazala je da skup genotipova koji uključuju 1-2-1-1 haplotip značajno povezan s manjim rizikom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} = 0.032$ ; OR: 0.30 i 95% CI: 0.10-0.81). U ostala dva genotipa nije uočena povezanost sa zaštitom, s obzirom na činjenicu da su njihove korigirane  $p$ -vrijednosti bile iznad 0,05 nakon *Bonferroni* korekcije, a njihove odgovarajuće komponente haplotipa nisu bile povezane s bolešću. Tako je za prošireni haplotip 1-2-1-1 IL-1 genskog lokusa pronađena povezanost sa zaštitom od nastanka OA koljena i na razini haplotipa kao i na razini genotipa.

6. Analiza genotipova bolesnika s OA kuka je pokazala da skup genotipova koji uključuju 1-1-1-2 haplotip nije statistički značajno povezan s povećanim rizikom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} < 0.07$ ; OR: 1.70, 95% CI: 1.06-2.72). Nadalje, kompletni set genotipova koji uključuju 1-1-1-2 prošireni haplotip za OA kuka kao zajednički nazivnik (1-1-1-2 / svi) nije značajno povezan s predispozicijom za nastanak bolesti nakon najkonzervativnije *Bonferroni* korekcije. Ova analiza je pokazala i dva statistički značajna genotipa povezana s predispozicijom za nastanak bolesti ( $p_{\text{corr}} < 0.008$ ; 1-1-1-1 / 2-1-1-1) i protekcijom od nastanka OA kuka ( $p < 0.017$ ; 1-1-1-1 / 1-1-2-1). Međutim, daljnjom analizom smo otkrili i da bolesnici s OA koljena i OA kuka koji imaju isti genotip (1-1-1-1 / 1-1-2-1), a koji je statistički značajno različit između ispitanika i kontrola i povezan s protekcijom za nastanak OA koljena i OA kuka, gubi svoju statističku značajnost nakon najkonzervativnije *Bonferroni* korekcije ( $p_{\text{corr}} = 0.084$  i  $0.08$ ). Budući da se radi o graničnim  $p$ -vrijednostima, možemo ustvrditi da najmanje postoji trend ka protekciji na genotipskoj razini (koja dodatno potvrđuje postojanje značajne udruženosti s protekcijom na haplotipskoj razini).

Rezultati ovog istraživanja govore po prvi puta o važnosti spola u kombinaciji s proupalnim citokinima na povećanje ili smanjenje genetskog rizika za nastanak osteoartritisa. Prvo, pronađena je nova povezanost 1-2-1-1 haplotipa IL-1 genskog lokusa s protekcijom za nastanak OA koljena u žena u promatranoj populaciji. Drugo, potvrđen je zaključak da 1-1-1-2 haplotip IL1 genskog lokusa može biti povezan s predispozicijom za nastanak OA kuka. Međutim, ovim istraživanjem je po prvi puta pokazano da je samo ženska populacija ta koja ima povećan rizik za nastanak OA kuka. Iako se ne mogu isključiti drugi genetski ili epigenetski čimbenici koji pridonose prethodno navedenim korelacijama, rezultati ovog istraživanja se mogu najjednostavnije

protumačiti na način da su čimbenici, kao što su proupalni citokin IL-1 u „suradnji“ s nekim nepoznatim spolno-specifičnim utjecajima, uključeni u patogenezu primarnog osteoartritisa i koljena i kuka. Nadalje, naše istraživanje pokazuje i da IL17A SNP rs2275913 nije povezan s predispozicijom za nastanak OA kuka (koja je prethodno identificirana na kromosomu 6 u populaciji Ujedinjenog Kraljevstva), kao i s predispozicijom za nastanak OA koljena u hrvatskoj populaciji.

## 7. LITERATURA

1. Martel Pelletier J, Lajeunesse D, Fahmi H, Tardif G, Pelletier JP. New thoughts on the pathophysiology of osteoarthritis: one more step toward new therapeutic targets. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8(1):30-6.
2. Cicuttini FM, Spector TD. Genetics of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:665-76.
3. Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidence-based review. *Drugs Aging* 2012;29(5):343-58.
4. Driban JB, Sitler MR, Barbe MF, Balasubramanian E. Is osteoarthritis a heterogeneous disease that can be stratified into subsets? *Clin Rheumatol* 2010;29(2):123-31.
5. Kuettner KE, Goldberg VM. Introduction. In: Kuettner KE, Goldberg VM, editors. *Osteoarthritic disorders*. Rosemont (IL): American Academy of Orthopaedic surgeons; 1995, str. 21-5.
6. Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH i sur. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* 2006;55(3):493-500.
7. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(1):5-18.
8. Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(1):1-4.
9. Medical information for patients. 26.09.2010. Medinfo. 20.01.2013. <<http://www.medinfo.co.uk/conditions/osteoarthritis.html>>.

10. Michle W. Arthrosis or osteoarthritis: do these terms imply therapy with pure analgesics or non-steroidal antirheumatic agents? *Scand J Rheumatol Suppl* 1987;65:123-30.
11. Pećina M. Degenerativne bolesti zglobova. U: Pećina M i sur. *Ortopedija*. 3. izmijenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Naklada Ljevak, 2004; str. 99-104.
12. Amin AR. A need for a 'whole-istic functional genomics' approach in complex human diseases: arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):76-9.
13. Altman R, Asch E, Bloch D i sur. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29(8):1039-49.
14. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2005;11(4):186-91.
15. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010;26(3):355-69.
16. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA i sur. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(1):13-29.
17. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957;16(4):494–502.
18. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D i sur. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1991;34(5):505-14.
19. Ahlbäck S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1968:Suppl 277:7-72.



20. Recht MP, Kramer J, Marcelis S i sur. Abnormalities of articular cartilage in the knee: analysis of available MR techniques. *Radiology* 1993;187(2):473-8.
21. Jewell FM, Watt I, Doherty M. Plain radiographic features of osteoarthritis. U: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, ur. *Osteoarthritis*. New York: Oxford University Press; 1998, str. 217-37.
22. Hunter DJ. Advanced imaging in osteoarthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008;66(3):251-60.
23. Altman RD, Gold GE. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15 Suppl A:A1-56.
24. Brandt KD, Mazzuca SA, Conrozier T i sur. Which is the best radiographic protocol for a clinical trial of a structure modifying drug in patients with knee osteoarthritis? *J Rheumatol* 2002;29(6):1308-20.
25. Altman RD, Bloch DA, Dougados M i sur. Measurement of structural progression in osteoarthritis of the hip: the Barcelona consensus group. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(7):515-24.
26. Hernborg JS, Nilsson BE. The natural course of untreated osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1977;(123):130-7.
27. Hannan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 2000;27(6):1513-7.
28. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989;48(4):271-80.

29. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 1995;38(8):1134-41.
30. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003;81(9):646-56.
31. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(11):1270-85.
32. Hochberg MC, Yerges-Armstrong L, Mitchell BD. Osteoarthritis susceptibility genes continue trickling in. *Lancet* 2012;380(9844):785-7.
33. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT i sur. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1995;38(10):1500-5.
34. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB i sur. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 2007;34(1):172-80.
35. Dillon CF, Rasch EK, Gu Q, Hirsch R. Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94. *J Rheumatol* 2006;33(11):2271-9.
36. Nevitt MC, Lane NE, Scott JC i sur. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 1995;38(7):907-16.
37. Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20(3 Suppl 1):42-50.

38. Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG i sur. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;59(9):1207-13.
39. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA i sur. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000;133(8):635-46.
40. Felson DT. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 1988;10:1-28.
41. Loughlin J. Genome studies and linkage in primary osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28(1):95-109.
42. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41(8):1343-55.
43. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG i sur. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 2008;58(1):26-35.
44. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(9):769-81.
45. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Kannel WB. Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1990;33(4):525-32.
46. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE i sur. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1996;156(18):2073-80.
47. Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas* 2000;35(3):183-99.

48. Nevitt MC, Felson DT, Williams EN, Grady D. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2001;44(4):811-8.
49. Cirillo DJ, Wallace RB, Wu L, Yood RA. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum* 2006;54(10):3194-204.
50. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC i sur. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 2001;44(9):2065-71.
51. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC i sur. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 2003;48(4):1034-40.
52. Nelson AE, Braga L, Renner JB i sur. Characterization of individual radiographic features of hip osteoarthritis in African American and White women and men: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62(2):190-7.
53. Braga L, Renner JB, Schwartz TA i sur. Differences in radiographic features of knee osteoarthritis in African-Americans and Caucasians: the Johnston county osteoarthritis project. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(12):1554-61.
54. Lane NE, Lin P, Christiansen L i sur. Association of mild acetabular dysplasia with an increased risk of incident hip osteoarthritis in elderly white women: the study of osteoporotic fractures. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):400-4.

55. Lynch JA, Parimi N, Chaganti RK, Nevitt MC, Lane NE. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. The association of proximal femoral shape and incident radiographic hip OA in elderly women. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(10):1313-8.
56. Palotie A, Väisänen P, Ott J i sur. Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene. *Lancet* 1989;1(8644):924-7.
57. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 1996;312(7036):940-3.
58. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE i sur. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998;41(6):1064-71.
59. Kujala UM, Leppävuori J, Kaprio J, Kinnunen J, Peltonen L, Koskenvuo M. Joint-specific twin and familial aggregation of recalled physician diagnosed osteoarthritis. *Twin Res* 1999;2(3):196-202.
60. Bijkerk C, Houwing-Duistermaat JJ, Valkenburg HA i sur. Heritabilities of radiologic osteoarthritis in peripheral joints and of disc degeneration of the spine. *Arthritis Rheum* 1999;42(8):1729-35.
61. MacGregor AJ, Antoniadou L, Matson M, Andrew T, Spector TD. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: results of a classic twin study. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2410-6.
62. Kerkhof HJ, Lories RJ, Meulenbelt I i sur. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis Rheum* 2010;62(2):499-510.

63. Dolan AL, Hart DJ, Doyle DV, Grahame R, Spector TD. The relationship of joint hypermobility, bone mineral density, and osteoarthritis in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol* 2003;30(4):799-803.
64. Chen HC, Shah SH, Li YJ, Stabler TV, Jordan JM, Kraus VB. Inverse association of general joint hypermobility with hand and knee osteoarthritis and serum cartilage oligomeric matrix protein levels. *Arthritis Rheum* 2008;58(12):3854-64.
65. Murray RO. The aetiology of primary osteoarthritis of the hip. *Br J Radiol* 1965;38(455):810-24.
66. Stulberg SD, Cooperman DR, Wallensten R. The natural history of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63(7):1095-108.
67. Harris WH. Etiology of osteoarthritis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(213):20-33.
68. Croft P, Cooper C, Wickham C, Coggon D. Osteoarthritis of the hip and acetabular dysplasia. *Ann Rheum Dis* 1991;50(5):308-10.
69. Smith RW, Egger P, Coggon D, Cawley MI, Cooper C. Osteoarthritis of the hip joint and acetabular dysplasia in women. *Ann Rheum Dis* 1995;54(3):179-81.
70. Lau EM, Lin F, Lam D, Silman A, Croft P. Hip osteoarthritis and dysplasia in Chinese men. *Ann Rheum Dis* 1995;54(12):965-9.
71. Lane NE, Nevitt MC, Cooper C, Pressman A, Gore R, Hochberg M. Acetabular dysplasia and osteoarthritis of the hip in elderly white women. *Ann Rheum Dis* 1997;56(10):627-30.
72. McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y i sur. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1996;125(5):353-9.

73. Lane NE, Gore LR, Cummings SR i sur. Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):854-60.
74. Felson DT, Niu J, Clancy M i sur. Low levels of vitamin D and worsening of knee osteoarthritis: results of two longitudinal studies. *Arthritis Rheum* 2007;56(1):129-36.
75. McAlindon T, LaValley M, Schneider E i sur. Effect of vitamin D supplementation on progression of knee pain and cartilage volume loss in patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2013;309(2):155-62.
76. McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y i sur. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum* 1996;39(4):648-56.
77. Jordan JM, De Roos AJ, Renner JB i sur. A case-control study of serum tocopherol levels and the alpha- to gamma-tocopherol ratio in radiographic knee osteoarthritis: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Am J Epidemiol* 2004;159(10):968-77.
78. Wluka AE, Stuckey S, Brand C, Cicuttini FM. Supplementary vitamin E does not affect the loss of cartilage volume in knee osteoarthritis: a 2 year double blind randomized placebo controlled study. *J Rheumatol* 2002;29(12):2585-91.
79. Jordan JM, Fang F, Arab L i sur. Low selenium levels are associated with increased risk for osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2005;52:s455.
80. Engstrom G, De Verdier MG, Nilsson PM i sur. Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to dietary intake of antioxidants beta-carotene, vitamin C, vitamin E and selenium: a population-based prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2009;60:s235–s236.

81. Neogi T, Booth SL, Zhang YQ i sur. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1255-61.
82. Oka H, Akune T, Muraki S i sur. Association of low dietary vitamin K intake with radiographic knee osteoarthritis in the Japanese elderly population: dietary survey in a population-based cohort of the ROAD study. *J Orthop Sci* 2009;14(6):687-92.
83. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992;116(7):535-9.
84. Messier SP, Loeser RF, Miller GD i sur. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1501-10.
85. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(4):433-9.
86. Tepper S, Hochberg MC. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I). *Am J Epidemiol* 1993;137(10):1081-8.
87. van Saase JL, Vandenbroucke JP, van Romunde LK, Valkenburg HA. Osteoarthritis and obesity in the general population. A relationship calling for an explanation. *J Rheumatol* 1988;15(7):1152-8.
88. Heliövaara M, Mäkelä M, Impivaara O, Knekt P, Aromaa A, Sievers K. Association of overweight, trauma and workload with coxarthrosis. A health survey of 7,217 persons. *Acta Orthop Scand* 1993;64(5):513-8.



89. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Sangha O, Liang MH, Grodstein F. Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. *Am J Med* 2003;114(2):93-8.
90. Roos EM, Ostenberg A, Roos H, Ekdahl C, Lohmander LS. Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(4):316-24.
91. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2004;50(10):3145-52.
92. Englund M, Guermazi A, Gale D i sur. Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *N Engl J Med* 2008;359(11):1108-15.
93. Croft P, Cooper C, Wickham C, Coggon D. Osteoarthritis of the hip and occupational activity. *Scand J Work Environ Health* 1992;18(1):59-63.
94. Lawrence JS. Rheumatism in cotton operatives. *Br J Industr Med* 1961;18:270–276.
95. Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR i sur. Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis Rheum* 1978;21(2):210-20.
96. Felson DT, Hannan MT, Naimark A i sur. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol* 1991;18(10):1587-92.
97. Coggon D, Croft P, Kellingray S, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2000;43(7):1443-9.

98. Puranen J, Ala-Ketola L, Peltokallio P, Saarela J. Running and primary osteoarthritis of the hip. *Br Med J* 1975;2(5968):424-5.
99. Kujala UM, Kettunen J, Paananen H i sur. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum* 1995;38(4):539-46.
100. Spector TD, Harris PA, Hart DJ i sur. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum* 1996;39(6):988-95.
101. Roos H, Lindberg H, Gärdsell P, Lohmander LS, Wingstrand H. The prevalence of gonarthrosis and its relation to meniscectomy in former soccer players. *Am J Sports Med* 1994;22(2):219-22.
102. McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med* 1999;106(2):151-7.
103. Lane NE, Hochberg MC, Pressman A, Scott JC, Nevitt MC. Recreational physical activity and the risk of osteoarthritis of the hip in elderly women. *J Rheumatol* 1999;26(4):849-54.
104. Lane NE, Michel B, Bjorkengren A i sur. The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol* 1993;20(3):461-8.
105. Newton PM, Mow VC, Gardner TR, Buckwalter JA, Albright JP. Winner of the 1996 Cabaud Award. The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. *Am J Sports Med* 1997;25(3):282-7.
106. Slemenda C, Brandt KD, Heilman DK i sur. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med* 1997;127(2):97-104.

107. Baker KR, Xu L, Zhang Y i sur. Quadriceps weakness and its relationship to tibiofemoral and patellofemoral knee osteoarthritis in Chinese: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1815-21.
108. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD i sur. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* 1998;41(11):1951-9.
109. Brandt KD, Heilman DK, Slemenda C i sur. Quadriceps strength in women with radiographically progressive osteoarthritis of the knee and those with stable radiographic changes. *J Rheumatol* 1999;26(11):2431-7.
110. Sharma L, Dunlop DD, Cahue S, Song J, Hayes KW. Quadriceps strength and osteoarthritis progression in malaligned and lax knees. *Ann Intern Med* 2003;138(8):613-9.
111. Dominick KL, Jordan JM, Renner JB, Kraus VB. Relationship of radiographic and clinical variables to pinch and grip strength among individuals with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1424-30.
112. Chaisson CE, Zhang Y, Sharma L, Kannel W, Felson DT. Grip strength and the risk of developing radiographic hand osteoarthritis: results from the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1999;42(1):33-8.
113. Sharma L, Song J, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA* 2001;286(2):188-95.
114. Cerejo R, Dunlop DD, Cahue S, Channin D, Song J, Sharma L. The influence of alignment on risk of knee osteoarthritis progression according to baseline stage of disease. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2632-6.

115. Felson DT, McLaughlin S, Goggins J i sur. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2003;139(5 Pt 1):330-6.
116. Brouwer GM, van Tol AW, Bergink AP i sur. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1204-11.
117. Hunter DJ, Niu J, Felson DT i sur. Knee alignment does not predict incident osteoarthritis: the Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1212-8.
118. Sharma L, Lou C, Felson DT i sur. Laxity in healthy and osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):861-70.
119. Wada M, Imura S, Baba H, Shimada S. Knee laxity in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996;35(6):560-3.
120. Brage ME, Draganich LF, Pottenger LA, Curran JJ. Knee laxity in symptomatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(304):184-9.
121. Golightly YM, Allen KD, Renner JB, Helmick CG, Salazar A, Jordan JM. Relationship of limb length inequality with radiographic knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(7):824-9.
122. Harvey WF, Yang M, Cooke TD i sur. Association of leg-length inequality with knee osteoarthritis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010;152(5):287-95.
123. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1987;30(8):914-8.
124. Maetzel A, Mäkelä M, Hawker G, Bombardier C. Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure--a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol* 1997;24(8):1599-607.

125. Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Cho SA, Hauck WW. The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol* 1989;130(2):278-88.
126. Neogi T, Felson D, Niu J i sur. Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: results from two cohort studies. *BMJ* 2009;339:b2844.
127. Felson DT, Chaisson CE, Hill CL i sur. The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2001;134(7):541-9.
128. Felson DT, Niu J, Guermazi A i sur. Correlation of the development of knee pain with enlarging bone marrow lesions on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2007;56(9):2986-92.
129. Hill CL, Gale DG, Chaisson CE i sur. Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2001;28(6):1330-7.
130. Hill CL, Hunter DJ, Niu J i sur. Synovitis detected on magnetic resonance imaging and its relation to pain and cartilage loss in knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(12):1599-603.
131. Hill CL, Gale DR, Chaisson CE i sur. Periarticular lesions detected on magnetic resonance imaging: prevalence in knees with and without symptoms. *Arthritis Rheum* 2003;48(10):2836-44.
132. Link TM, Steinbach LS, Ghosh S i sur. Osteoarthritis: MR imaging findings in different stages of disease and correlation with clinical findings. *Radiology* 2003;226(2):373-81.
133. Gooberman-Hill R, Woolhead G, Mackichan F, Ayis S, Williams S, Dieppe P. Assessing chronic joint pain: lessons from a focus group study. *Arthritis Rheum* 2007;57(4):666-71.

134. Hutchings A, Calloway M, Choy E i sur. The Longitudinal Examination of Arthritis Pain (LEAP) study: relationships between weekly fluctuations in patient-rated joint pain and other health outcomes. *J Rheumatol* 2007;34(11):2291-300.
135. Stein CM, Elston RC. Finding genes underlying human disease. *Clin Genet* 2009;75(2):101-6.
136. Valdes AM, Spector TD. The genetic epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22(2):139-43.
137. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851–861.
138. Stecher RM. Heberden's nodes: heredity in hypertrophic arthritis of the finger joints. *Am J Med Sci* 1941;210:801–809.
139. Stecher RM, Hersh AH. Heberden's nodes: the mechanism of inheritance in hypertrophic arthritis of the fingers. *J Clin Invest* 1944;23(5):699-704.
140. Kellgren JH, Moore R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *Br Med J* 1952;1(4751):181-7.
141. Allison AC, Blumberg BS. Familial osteoarthropathy of the fingers. *J Bone Joint Surg Br* 1958;40-B(3):538-45.
142. Kellgren JH, Lawrence JS, Bier F. Genetic factors in generalized osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1963;22:237-55.
143. Nuki G. Osteoarthritis: Some genetic approaches. *J Rheumatol Suppl* 1983; 10(Suppl 9):29–31.
144. Lawrence JS, Gelsthorpe K, Morell G. Heberden's nodes and HLA markers in generalized osteoarthritis. *J Rheumatol* 1983;10(Suppl 9):32–3.

- 145.Hirsch R, Lethbridge-Cejku M, Hanson R i sur. Familial aggregation of osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1227-32.
- 146.Lindberg H. Prevalence of primary coxarthrosis in siblings of patients with primary coxarthrosis. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(203):273-5.
- 147.Chitnavis J, Sinsheimer JS, Clipsham K i sur. Genetic influences in end-stage osteoarthritis. Sibling risks of hip and knee replacement for idiopathic osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79(4):660-4.
- 148.Lanyon P, Muir K, Doherty S, Doherty M. Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *BMJ* 2000;321(7270):1179-83.
- 149.Ingvarsson T, Stefánsson SE, Hallgrímsdóttir IB i sur. The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis Rheum* 2000;43(12):2785-92.
- 150.Varlotta GP, Brown MD, Kelsey JL, Golden AL. Familial predisposition for herniation of a lumbar disc in patients who are less than twenty-one years old. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73(1):124-8.
- 151.Matsui H, Terahata N, Tsuji H, Hirano N, Naruse Y. Familial predisposition and clustering for juvenile lumbar disc herniation. *Spine (Phila Pa 1976)* 1992;17(11):1323-8.
- 152.Scapinelli R. Lumbar disc herniation in eight siblings with a positive family history for disc disease. *Acta Orthop Belg* 1993;59(4):371-6.
- 153.Yoo K, Origitano TC. Familial cervical spondylosis. Case report. *J Neurosurg* 1998;89(1):139-41.
- 154.Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 1999;42(2):366-72.

- 155.Zhai G, Ding C, Stankovich J, Cicuttini F, Jones G. The genetic contribution to longitudinal changes in knee structure and muscle strength: a sibpair study. *Arthritis Rheum* 2005;52(9):2830-4.
- 156.Zhai G, Hart DJ, Kato BS, MacGregor A, Spector TD. Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(2):222-5.
- 157.Doherty M. How important are genetic factors in osteoarthritis? *J Rheumatol Suppl* 2004;70:22–7.
- 158.Loughlin J. Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(5):629–33.
- 159.Ikegawa S. New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going? *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(5):429–34.
- 160.Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34(3):581-603.
- 161.Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. *Med Clin North Am* 2009;93(1):45-66, x.
- 162.Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(1):23-32.
- 163.Chapman K, Mustafa Z, Irven C i sur. Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage. *Am J Hum Genet* 1999;65(1):167–74.
- 164.Loughlin J, Mustafa Z, Irven C i sur. Stratification analysis of an osteoarthritis genome screen-suggestive linkage to chromosomes 4, 6, and 16. *Am J Hum Genet* 1999;65(6):1795–8.



- 165.Livshits G, Kato BS, Zhai G i sur. Genomewide linkage scan of hand osteoarthritis in female twin pairs showing replication of quantitative trait loci on chromosomes 2 and 19. *Ann Rheum Dis* 2007;66(5):623-7.
- 166.Leppavuori J, Kujala U, Kinnunen J i sur. Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q. *Am J Hum Genet* 1999;65(4):1060-7.
- 167.Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T i sur. Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet* 2003;72(6):1448-59.
- 168.Ingvarsson T, Stefánsson SE, Gulcher JR i sur. A large Icelandic family with early osteoarthritis of the hip associated with a susceptibility locus on chromosome 16p. *Arthritis Rheum* 2001;44(11):2548-55.
- 169.Demissie S, Cupples LA, Myers R, Aliabadi P, Levy D, Felson DT. Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 2002;46(4):946-52.
- 170.Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA, Aliabadi P, Felson DT. A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 2004;50(8):2489-96.
- 171.Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Osteoarthritis susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis. *Rheumatol Int* 2006;26(11):996-1000.
- 172.Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics* 2008;9(8):542-7.
- 173.Sandell LJ. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(2):77-89.

174. Ryder JJ, Garrison K, Song F, et al. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2008;67(5):584-91.
175. Holden P, Canty EG, Mortier GR, et al. Identification of novel pro-alpha2(I) collagen gene mutations in two families with distinctive oligo-epiphyseal forms of multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999;65(1):31-8.
176. Richards AJ, Yates JR, Williams R, et al. A family with Stickler syndrome type 2 has a mutation in the COL11A1 gene resulting in the substitution of glycine 97 by valine in alpha 1 (XI) collagen. *Hum Mol Genet* 1996;5(9):1339-43.
177. Vikkula M, Mariman EC, Lui VC, et al. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell* 1995;80(3):431-7.
178. Loughlin J, Irven C, Fergusson C, Sykes B. Sibling pair analysis shows no linkage of generalized osteoarthritis to the loci encoding type II collagen, cartilage link protein or cartilage matrix protein. *Br J Rheumatol* 1994;33(12):1103-6.
179. Zhai G, Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism, collagen type II alpha1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis* 2004;63(5):544-8.
180. Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, et al. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2007;56(1):137-46.
181. Mustafa Z, Chapman K, Irven C, et al. Linkage analysis of candidate genes as susceptibility loci for osteoarthritis-suggestive linkage of COL9A1 to female hip osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(3):299-306.

- 182.Loughlin J, Mustafa Z, Dowling B i sur. Finer linkage mapping of a primary hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6. *Eur J Hum Genet* 2002;10(9):562-8.
- 183.Loughlin J, Irven C, Mustafa Z i sur. Identification of five novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S10-7.
- 184.Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 2004;50(4):1179-86.
- 185.Pola E, Papaleo P, Pola R i sur. Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(11):1025-8.
- 186.Southam L, Heath O, Chapman K, Loughlin J. Association analysis of the interleukin 17 genes IL17A and IL17F as potential osteoarthritis susceptibility loci. *Ann Rheum Dis* 2006;65(4):556-7.
- 187.Forster T, Chapman K, Loughlin J. Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis. *Hum Genet* 2004;114(4):391-5.
- 188.Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J i sur. Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1913-22.
- 189.Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003;70(4):257-62.

- 190.Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q i sur. Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest* 1997;100(2):259-63.
- 191.Uitterlinden AG, Burger H, van Duijn CM i sur. Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2000;43(7):1456-64.
- 192.Solovieva S, Hirvonen A, Siivola P i sur. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in Finnish women. *Arthritis Res Ther* 2006;8(1):R20.
- 193.Loughlin J, Dowling B, Chapman K i sur. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9757-62.
- 194.Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Further evidence of the role of frizzled-related protein gene polymorphisms in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1052-5.
- 195.Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D. Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem* 2001;276(15):12201-11.
- 196.Kizawa H, Kou I, Iida A i sur. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2005;37(2):138-44.
- 197.Aigner T, Dudhia J. Genomics of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(5):634-40.

198. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* 1989;260(2):543-8.
199. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ i sur. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 2006;54(2):533-9.
200. Loughlin J. Osteoarthritis linkage scan: more loci for the geneticists to investigate. *Ann Rheum Dis* 2006;65(10):1265-6.
201. Spector TD, Reneland RH, Mah S i sur. Association between a variation in LRCH1 and knee osteoarthritis: a genome-wide single-nucleotide polymorphism association study using DNA pooling. *Arthritis Rheum* 2006;54(2):524-32.
202. Cicutini FM, Spector TD. The genetics of osteoarthritis. *J Clin Pathol* 1996;49(8):617-8.
203. Näkki A, Videman T, Kujala UM i sur. Candidate gene association study of magnetic resonance imaging-based hip osteoarthritis (OA): evidence for COL9A2 gene as a common predisposing factor for hip OA and lumbar disc degeneration. *J Rheumatol* 2011;38(4):747-52.
204. Lian K, Zmuda JM, Nevitt MC i sur. Type I collagen alpha1 Sp1 transcription factor binding site polymorphism is associated with reduced risk of hip osteoarthritis defined by severe joint space narrowing in elderly women. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1431-6.
205. Lotz M, Blanco FJ, von Kempis J i sur. Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol Suppl* 1995;43:104-8.

206. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44(6):1237-47.
207. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3(2):107-13.
208. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(3):602-11.
209. Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(2):409-24.
210. Blanco Garcia FJ. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(3):308-9.
211. Blanco FJ, Lotz M. Citoquinas, condrocitos y artrosis. *Rev Esp Reumatol* 1995;22:27-31.
212. Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z, Chapman K. Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1519-27.
213. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ i sur. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis* 2011;70(5):873-5.
214. Khan IM, Redman SN, Williams R, Dowthwaite GP, Oldfield SF, Archer CW. The development of synovial joints. *Curr Top Dev Biol* 2007;79:1-36.
215. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D i sur. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2007;39(4):529-33.

216. Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM i sur. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum Mol Genet* 2007;16(18):2226-32.
217. Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I i sur. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet* 2008;17(10):1497-504.
218. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I i sur. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1710-21.
219. Reynard LN, Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas* 2012;71(3):200-4.
220. What are genome-wide association studies? 17.01.2013. Genetics Home Reference. A service of the U.S. National Library of Medicine. 22.01.2013. <  
<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/gwastudies> >.
221. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. 22.01.2013. National Human Genome Research Institute. National Institutes of Health. 22.01.2013. <  
<http://www.genome.gov/GWASudies/> >.
222. Mototani H, Mabuchi A, Saito S i sur. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 2005;14(8):1009-17.
223. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M i sur. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet* 2008;40(8):994-8.

224. Valdes AM, Loughlin J, Timms KM i sur. Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2008;82(6):1231-40.
225. Zhai G, van Meurs JB, Livshits G i sur. A genome-wide association study suggests that a locus within the ataxin 2 binding protein 1 gene is associated with hand osteoarthritis: the Treat-OA consortium. *J Med Genet* 2009;46(9):614-6.
226. Nakajima M, Takahashi A, Kou I i sur. New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One* 2010;5(3):e9723.
227. Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott KS i sur. Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study. *Ann Rheum Dis* 2011;70(5):864-7.
228. Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K i sur. A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2011;89(3):446-50.
229. Castaño Betancourt MC, Cailotto F, Kerkhof HJ i sur. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(21):8218-23.
230. arcOGEN Consortium, arcOGEN Collaborators. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* 2012;380(9844):815-23.
231. van Meurs JB, Uitterlinden AG. Osteoarthritis year 2012 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(12):1470-6.
232. Manning AK, Hivert MF, Scott RA i sur. A genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycaemic traits and insulin resistance. *Nat Genet* 2012;44(6):659-69.



233. Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;43(4):339-44.
234. Schunkert H, König IR, Kathiresan S i sur. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;43(4):333-8.
235. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G i sur. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* 2010;467(7317):832-8.
236. Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Akune T i sur. Recommendations for standardization and phenotype definitions in genetic studies of osteoarthritis: the TREAT-OA consortium. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(3):254-64.
237. What is Meta Analysis? 2011. Statistical Solutions. 22.01.2013. <  
<http://www.statistical-solutions-software.com/what-is-meta-analysis/>>.
238. Ioannidis JP, Trikalinos TA, Khoury MJ. Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases. *Am J Epidemiol* 2006;164(7):609-14.
239. Nakamura T, Shi D, Tzetzis M i sur. Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 2007;16(14):1676-81.
240. Meulenbelt I, Chapman K, Dieguez-Gonzalez R i sur. Large replication study and meta-analyses of DVWA as an osteoarthritis susceptibility locus in European and Asian populations. *Hum Mol Genet* 2009;18(8):1518-23.
241. Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Carr A i sur. Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. *BMC Med Genet* 2010;11:164.

- 242.Moxley G, Meulenbelt I, Chapman K i sur. Interleukin-1 region meta-analysis with osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(2):200-7.
- 243.Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ i sur. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis* 2011;70(2):349-55.
- 244.Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK i sur. Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(3):265-71.
- 245.Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Med Clin North Am* 2009;93(1):1-24, xv.
- 246.Abramson S, Krasnokutsky S. Biomarkers in osteoarthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006;64(1-2):77-81.
- 247.Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006;54(5):1357-60.
- 248.Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schünke M. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* 2005;187(5-6):473-85.
- 249.Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2006;354(8):841-8.
- 250.Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(5):361-7.
- 251.Pozgan U, Caglic D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in

- synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem* 2010;391(5):571-9.
- 252.Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(1):33-42.
- 253.Chadjichristos C, Ghayor C, Kypriotou M i sur. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003;278(41):39762-72.
- 254.Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasher A. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1beta-induced inhibition of collagen type II and beta1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study. *Ann Anat* 2005;187(5-6):487-97.
- 255.Stöve J, Huch K, Günther KP, Scharf HP. Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 2000;68(3):144-9.
- 256.Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1052(3):366-78.
- 257.Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996;97(9):2011-9.
- 258.Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* 1990;144(2):499-505.

259. Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. *J Immunol* 1992;148(2):466-73.
260. Villiger PM, Terkeltaub R, Lotz M. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human articular cartilage. Induction by peptide regulatory factors and differential effects of dexamethasone and retinoic acid. *J Clin Invest* 1992;90(2):488-96.
261. Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M. Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2001;44(7):1633-43.
262. Saklatvala J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986;322(6079):547-9.
263. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6(2):71-9.
264. Cawston TE, Curry VA, Summers CA i sur. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1998;41(10):1760-71.
265. Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD i sur. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum* 2001;44(7):1620-32.
266. Porée B, Kypriotou M, Chadjichristos C i sur. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J Biol Chem* 2008;283(8):4850-65.

267. Ishii H, Tanaka H, Katoh K, Nakamura H, Nagashima M, Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(4):277-81.
268. Alsalameh S, Mollenhauer J, Hain N, Stock KP, Kalden JR, Burmester GR. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 1990;33(10):1477-86.
269. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 1999;42(11):2399-409.
270. Pacquelet S, Presle N, Boileau C i sur. Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis. *J Rheumatol* 2002;29(12):2602-10.
271. Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP i sur. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *J Rheumatol* 2002;29(6):1262-72.
272. Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, van den Gersselaar LA, van den Berg WB. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 2000;43(6):1300-6.

- 273.Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(10):799-807.
- 274.Osteoarthritis: Current Concepts in Diagnosis and Management. 15.03.2000. American Academy of Family Physicians. 22.01.2013. <  
<http://www.aafp.org/afp/2000/0315/p1795.html> >.
- 275.Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ* 2006;332(7542):639-42.
- 276.Jordan KM, Arden NK, Doherty M i sur. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2003;62(12):1145-55.
- 277.Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW i sur. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(4):476-99.
- 278.Hochberg MC, Altman RD, April KT i sur. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(4):465-74.
- 279.Grazio S, Curkovic B, Babic-Nagic D i sur. Guidelines of the Croatian Society for Rheumatology for the treatment of knee and hip osteoarthritis. *Reumatizam* 2010;57(1):36-47.
- 280.Zhang W, Doherty M, Arden N i sur. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing

- Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).  
Ann Rheum Dis 2005;64(5):669-81.
281. Bijlsma JW, Knahr K. Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. Best Pract Res Clin Rheumatol 2007;21(1):59-76.
282. National Public Health Partnership group framework, 2001. 24.07.2006. National Public Health Partnership. 23.01.2013. <  
[http://www.nphp.gov.au/publications/a\\_z.htm](http://www.nphp.gov.au/publications/a_z.htm) >.
283. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM i sur. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest 1996;97(3):761-8.
284. Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. Front Biosci 1999;4:D694-703.
285. Leppävuori J, Kujala U, Kinnunen J i sur. Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q. Am J Hum Genet 1999;65(4):1060-7.
286. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW i sur. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. Lancet 1997;349(9046):170-3.
287. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest 2006;116(5):1218-22.
288. MacGregor AJ, Spector TD. Twins and the genetic architecture of osteoarthritis. Rheumatology (Oxford) 1999;38(7):583-8.
289. Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. Expert Rev Mol Med 2005;7(9):1-12.

290. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Höhlig K, Sieper J, Müller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2417-22.
291. Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ i sur. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 2004;5(6):451-60.
292. Smith AJ, Elson CJ, Perry MJ, Bidwell JL. Accuracy of haplotype association studies is enhanced by increasing number of polymorphic loci examined: comment on the article by Meulenbelt et al. *Arthritis Rheum* 2005;52(2):675; author reply 675-6.
293. Meulenbelt I, Slagboom PE, van Duijn CM. Reply: accuracy of haplotype association studies is enhanced by increasing number of polymorphic loci examined: comment on the article by Meulenbelt et al. *Arthritis Rheum* 2005;52(2):675-6.
294. Moxley G, Han J, Stern AG, Riley BP. Potential influence of IL1B haplotype and IL1A-IL1B-IL1RN extended haplotype on hand osteoarthritis risk. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1106-12.
295. Ni H, Shi D, Dai J i sur. Genetic polymorphisms of interleukin-1 $\beta$  (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86-bpVNTR) in susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Rheumatol Int* 2009;29(11):1301-5.
296. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10(4):241-51.
297. Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R i sur. Hip osteoarthritis susceptibility is associated with IL1B -511(G>A) and IL1 RN (VNTR) genotypic polymorphisms in Croatian Caucasian population. *J Orthop Res* 2011;29(8):1137-44.



298. Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R i sur. IL1B -511(G>A) and IL1RN (VNTR) allelic polymorphisms and susceptibility to knee osteoarthritis in Croatian population. *Rheumatol Int* 2012;32(7):2135-41.
299. Bellamy N. WOMAC: a 20-year experiential review of a patient-centered self-reported health status questionnaire. *J Rheumatol* 2002;29(12):2473–6.
300. NIH Consensus Statement on total knee replacement. *NIH Consens State Sci Statements* 2003;20(1):1-34.
301. Crockarell JR, Guyton JL. *Arthroplasty of the knee*. U: Canale ST, Beatty JH, ur. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11th ed. Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier, 2007; str. 261.
302. NIH Consensus Conference. Total hip replacement. NIH Consensus Development Panel on Total Hip Replacement. *JAMA* 1995;273(24):1950–6.
303. Fraser DA, Bulat-Kardum L, Knezevic J i sur. Interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism in tuberculosis patients from Croatia. *Scand J Immunol* 2003;57(5):480-4.
304. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A i sur. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91(4):403-4.
305. Tseng LH, Chen PJ, Lin MT i sur. Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 beta and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens* 2001;57(4):318-24.
306. Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA i sur. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(6):394-402.

307. Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R i sur. Associations of the Interleukin-1 Gene Locus Polymorphisms with Risk to Hip and Knee Osteoarthritis: Gender and Subpopulation Differences. *Scand J Immunol* 2012;77(2):151-61.
308. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other". *Annals of Mathematical Statistics* 1947;18(1):50-60.
309. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K i sur. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559-75.
310. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73(5):1162-9.
311. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):978-89.
312. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996;25(4):254-72.
313. Henderson B, Pettipher ER. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol* 1989;75(2):306-10.
314. Felson DT. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 2004;42(1):1-9, v.
315. Lally EV. Genetic aspects of osteoarthritis. *Med Health R I* 2004;87(7):210-2.
316. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 Suppl A:S39-44.

317. Williams CJ. The genetics of osteoarthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2007;3(4):503-16.
318. Chapman K, Loughlin J. Association of the interleukin-1 gene cluster with osteoarthritis of the hip: comment on the article by Meulenbelt et al and the letter by Smith et al. *Arthritis Rheum* 2006;54(11):3722-3.
319. Attur M, Wang HY, Kraus VB i sur. Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Ann Rheum Dis* 2010;69(5):856-61.
320. miRBase. August 2012. Manchester 1824. 26.01.2013. < <http://www.mirbase.org/> >.
321. Espinoza JL, Takami A, Nakata K i sur. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 2011;6(10):e26229.
322. Liu XK, Lin X, Gaffen SL. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J Biol Chem* 2004;279(50):52762-71.
323. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361(9):888-98.
324. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE i sur. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(4):367-70.
325. Van Baarsen LGM, Lebre MC, Van der Coelen D i sur. Expression Levels of Interleukin-17A, Interleukin-17F and Their Receptors in Synovium of Patients with Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Osteoarthritis: A Target Validation Study. *Arthritis Rheum* 2011;63(Suppl 10):58.

# ŽIVOTOPIS

## **OPĆI PODACI:**

Ime i prezime: ZDRAVKO JOTANOVIĆ

Datum i mjesto rođenja: 14. lipnja 1976., Rijeka

Kućna adresa: Straža 108, 51216 Viškovo

Tel.: +385 51 681 166

Mob.: + 385 98 96 18 540

E-mail: zjotanov@inet.hr

## **ZAPOSLENJE:**

Radno mjesto: specijalist ortoped

Odjel: III

Adresa zaposlenja: Klinika za ortopediju Lovran, Šetalište Maršala Tita 1, 51415 Lovran

Tel.: +385 51 710 271

Mob.: +385 99 21 47 762

Fax.: +385 51 292 098

E-mail.: klinika.lovran@ri.t-com.hr

## **RADNO ISKUSTVO:**

22.09.2003 – 21.09.2004. Pripravnički staž za doktora medicine u Općoj bolnici Ogulin,

17.08.2005. – 31.12.2005. Volonter u Klinici za ortopediju Lovran,

2006. – 2010. Zaposlen kao liječnik specijalizant iz ortopedije u Klinici za ortopediju Lovran,

2011. – Zaposlen kao liječnik specijalist ortoped u Klinici za ortopediju Lovran.

## **ŠKOLOVANJE:**

1983./1984. – 1990./1991. Osnovna škola Sv. Matej u Viškovu,

1991./1992. – 1994./1995. Prva riječka hrvatska gimnazija u Rijeci,

1995./1996. – 2002./2003. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,

2003./2004. – 2006./2007. Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,

23.05.2005. Položen stručni ispit za doktora medicine pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske,

2006. – 2010. Specijalizacija iz ortopedije - Klinike za ortopediju Lovran,

31.01.2011.g. – Položen specijalistički ispit iz ortopedije pri Klinici za ortopediju Lovran.

## **AKADEMSKI NASLOVI:**

2003. Doktor medicine

## **ČLANSTVO I AKTIVNOST U ZNANSTVENIM I STRUKOVNIM UDRUŽENJIMA:**

- Hrvatski liječnički zbor, od 2003.,
- Hrvatska liječnička komora, od 2005.,
- Hrvatsko ortopedsko društvo, od 2006.,
- tajnik i član Upravnog odbora Sekcije za artroskopiju i sportsku traumatologiju Hrvatskog društva za športsku medicinu Hrvatskog liječničkog zbora (SAST HDŠM HLZ), od 2012.,
- Europsko društvo za sportsku traumatologiju, kirurgiju koljena i artroskopiju (European Society of Sports Traumatology Knee Surgery and Arthroscopy - ESSKA), od 2012.,

- Europsko društvo za artroskopiju ručnog zgloba (European Wrist Arthroscopy Society – EWAS), od 2012.

### **STRUČNA USAVRŠAVANJA:**

- AO Course – Principles in Operative Fracture Management, 01.10. – 04.10.2008., Ljubljana, Slovenija,
- AO Course – Advances in Operative Fracture Management, 30.09. - 03.10.2009., Protorož, Slovenija,
- EFORT Fall Travelling Fellowship, 17.10. – 24.10.2010., Švicarska,
- 9<sup>th</sup> Cooperative course – Polytrauma Management – beyond ATLS, 3<sup>rd</sup> - 4<sup>th</sup> December 2010., Aachen, Njemačka,
- AO Course – Orthopaedic and Trauma Foot and Ankle with Anatomical Specimen, 17.03. – 19.03 2011., Ankaran, Slovenija,
- Zimmer Institute Medical Education Course: Masterclass Hip Solutions for Young Patients, 25.03. – 26.03.2011., Varšava, Poljska,
- Hand Symposium „New Treatment Options in Wrist / Radius“, 13.04.2011., Zagreb, Hrvatska,
- Simpozij „Kirurgija šake“, 20.05. – 21.05.2011., KB Dubrava, Zagreb, Hrvatska,
- 2<sup>nd</sup> Wrist and Elbow Course Arthroscopic and Open Surgery, 03.06. – 04.06.2011., Barcelona, Španjolska,
- International Knee Reconstruction Workshop, 9th-10th June 2011., Lovran, Hrvatska,
- EWAS Basic Wrist Arthroscopy Course 2012, Training on Anatomical Specimen, February 24th and 25th - 2012, Strasbourg, Francuska,

- Surgical approaches in traumatology and orthopaedics (with cadaver lab), Department of Anatomy, School of Medicine, University of Rijeka, April 27. – 28., 2012., Rijeka, Hrvatska,
- Prvi Adria-Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije „Artroskopija ruke i šake“, Klinički odjel za plastičnu kirurgiju i opeklone Klinike za kirurgiju KBC Split, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 06.07. – 07.07.2012., Split, Hrvatska,
- Arthrex Hand Course, ArthroLab Hand Workshop, 21st September 2012, ArthroLab, Munich, Njemačka.
- EWAS Advanced Wrist Arthroscopy Course 2012, Training on Anatomical Specimen, November 23rd and 24th - 2012, Strasbourg, Francuska.
- 2nd Arthroscopy Course With Cadaver Lab for Knee and Shoulder Arthroscopy, 14th – 16th March 2013, Rijeka, Croatia – Invited speaker

#### **ZNANSTVENA USAVRŠAVANJA:**

- „Planiranje i pisanje znanstvenog rada” - Croatian Medical Journal (CMJ, IF = 1.796), 09.11. - 10.11.2007., Hrvatski institut za istraživanje mozga, Zagreb, Hrvatska,
- DNA izolacija – ekstrakcija genomske DNA iz periferne venske krvi bolesnika s osteoartritisom (OA) koljena i kuka; 01.11. – 30.11.2008., Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (Prof. Dr. Biserka Mulac - Jeričević), Hrvatska,
- SNP analiza – detekcija polimorfizama pojedinih nukleotida (single nucleotide polymorphisms - SNPs) u IL-1 genima Taqman metodom (direktna detekcija alela) i detekcija polimorfizma u repetitivnim odlomcima DNA u navedenim genetskim regijama (oko navedenih gena, tj. indirektna analiza alela) tehnikom lančane reakcije

polimeraze (PCR - *polymerase chain reaction*); 01.02. – 28.02.2009., Imunološki odjel, Zavod za oralnu biologiju, Stomatološki fakulteta Univerziteta u Oslu (Prof. Dr. Zlatko Dembić), Norveška.

#### **POGLAVLJA U KNJIGAMA:**

- Tudor A, Šestan B i sur. Dječja ortopedija. Sveučilišni udžbenik, 1. izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 2012. Poglavlje Tumori, autori Veljko Šantić i Zdravko Jotanović, str. 45-63.

#### **POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:**

- Mokrovic H, Gulan G, Jotanovic Z, Dragicevic M. Shoulder pain. *Medicina Fluminensis*. 2009;45(4):332-7.
- Gulan G, Sestan B, Jotanovic Z, Madarevic T, Mikacevic M, Ravlic-Gulan J, Rapan S, Jovanović S. Open Total Talar Dislocation with Extrusion (Missing Talus). *Coll Antropol* 2009;33(2):669-72.
- Gulan G, Jotanovic Z, Jurdana H, Sestan B, Ravlic-Gulan J, Brncic N. *Salmonella typhimurium* osteomyelitis of the femur in patient with Crohn's disease. *Wien Klin Wochenschr* 2010;122(13-14):437-40.
- Mihelic R, Jurdana H, Jotanovic Z, Madjarevic T, Tudor A. Long-term results of anterior cruciate ligament reconstruction: a comparison with non-operative treatment with a follow-up of 17-20 years. *Int Orthop* 2011;35(7):1093-7.
- Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R, Kaarvatn MH, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. Hip osteoarthritis susceptibility is associated with IL1B -511(G>A) and IL1 RN (VNTR) genotypic polymorphisms in Croatian caucasian population. *J Orthop Res* 2011;29(8):1137-44.



- Jotanovic Z, Gulan G, Jurdana H, Sestan B, Rapan S, Boschi V. Hemiarthroplasty is an Effective Surgical Method to Manage Unstable Trochanteric Fractures in Elderly People. *Coll Antropol* 2011;35(2):427-31.
- Vukelic L, Sosa I, Cvijanovic O, Madarevic T, Jotanovic Z, Vukelic Sarunic A, Stifter S, Zoricic Cvek S, Dudaric L, Sestan B, Bobinac D. Correlation of endothelin-1 mRNA expression and bone structure in advanced osteoarthritis. *Med Hypotheses* 2011;77(5):927-9.
- Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidence-based review. *Drugs Aging* 2012;29(5):343-58.
- Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R, Kaarvatn MH, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. IL1B -511(G>A) and IL1RN (VNTR) allelic polymorphisms and susceptibility to knee osteoarthritis in Croatian population. *Rheum Int* 2012;32(7):2135-41.
- Gulan G, Jotanovic Z, Jurdana H, Sestan B, Rapan S, Rubinic D, Ravlic-Gulan J. Treatment of infected tibial nonunion with bone defect using central bone grafting technique. *Coll Antropol* 2012;36(2):617–621.
- Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R, Etokebe GE, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. Associations of the interleukin-1 gene locus polymorphisms with risk to hip and knee osteoarthritis: gender and subpopulation differences. *Scand J Immunol* 2013;77(2):151-61.
- Kaarvatn MH, Eftedal RK, Vrbanec J, Jotanovic Z, Etokebe GE, Balen S, Kulic A, Dembic Z. Interleukin-1 gene locus polymorphisms are associated with risk to breast cancer in Croatian population. *Periodicum biologorum*. Accepted for publication.

## **SUDJELOVANJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA:**

- Mihelic R, Jotanovic Z, Hero M, Lopac D. Late results of total knee arthroplasty: 13-15 years follow up. Croatian Orthopaedic Congress with International Participation, 7-9 November 2008, Zagreb. – usmena prezentacija,
- Mikacevic M, Sestan B, Madarevic T, Jotanovic Z. Open total talar dislocation with extrusion (missing talus). Croatian Orthopaedic Congress with International Participation, 7-9 November 2008, Zagreb. – poster prezentacija,
- Jotanovic Z, Sestan B, Sirola L. Gene therapy approach in bone healing process - current concepts and future perspectives. SIROT Orthopaedic Research Workshop with International Participation, June 20th, 2009, Lovran, Croatia. – usmena prezentacija,
- Tudor A, Ruzic L, Sestan B, Sirola L, Prpic T, Jotanovic Z. Flat-footedness is not a disadvantage for athletic performance in children aged 11 to 15 years. EPOS 2010, 7-10 April, 2010., Zagreb, Croatia. Journal of children's orthopaedics 2010;4(1):1-75. – usmena prezentacija,
- Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Etokebe GE, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Dembic Z. Genetic polymorphisms of interleukin-1 $\beta$  (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86-bp VNTR) in susceptibility to hip osteoarthritis in Croatian population – preliminary report. 47th EFORT Congress, 2-5 June 2010., Madrid, Spain. – poster prezentacija,
- Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. Polymorphisms in the Interleukin-1 $\beta$  And IL-1 Receptor Antagonist Genes in Predisposition to Hip and Knee Osteoarthritis in Croatian Population. 39th meeting of Scandinavian Society for Immunology jointly

with the Baltic Immunological Society, June 2-5, 2010, Tallinn, Estonia. Scandinavian Journal of Immunology 2010;71(6), s482. – poster prezentacija,

- Mihelic R, Jotanovic Z, Sestan B, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Dembic Z. Genetic polymorphisms of interleukin-1 $\beta$  (-511G>A) and interleukin-1 receptor antagonist (86-bp VNTR) in susceptibility to knee osteoarthritis in Croatian population – preliminary report. 14th ESSKA Congress, June 9-12, 2010, Oslo, Norway. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2010;18 (Suppl 1):S283. – poster prezentacija,
- Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Etokebe GE, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Mihelic R, Dembic Z. Interleukin-1 genetic region (IL1A, IL1B and IL1RN) in genetic predisposition to hip and knee osteoarthritis in Croatian population. 14th International Congress of Immunology, August 23-27, 2010, Kobe, Japan. International Immunology 2010;22(Suppl 1):iv127. – poster prezentacija,
- Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Etokebe GE; Mihelic R Mulac-Jericevic B, Tijanic T Balen S, Sestan B, Dembic Z. Interleukin-1(IL-1)A, IL-1B and IL-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphisms in Predisposition to Hip and Knee Osteoarthritis in Croatian Population. 40th Meeting of Scandinavian Society for Immunology and the Winter School of Immunology, April 5–8, 2011, Geilo, Norway. Scandinavian Journal of Immunology 2011;73(4), s370-1. – poster prezentacija,
- Jotanović Z, Mihelić R, Šestan B, Dembić Z. Uloga interleukin-1 inhibitora u liječenju osteoartritisa. Kongres Hrvatskog Udruženja Ortopeda i Traumatologa (HUOT) s međunarodnim sudjelovanjem, 12. – 14. travnja 2012., Primošten, Hrvatska. – usmena prezentacija,
- Jotanovic Z, Kaarvatn MH, Etokebe GE, Mihelic R, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. Hip and knee osteoarthritis susceptibility and association with IL1 gene cluster in Croatian population. 2nd International Conference

on Regenerative Orthopaedics and Tissue Engineering, 20 - 22 September 2012, Opatija, Croatia. – poster prezentacija,

- Gulan G, Jurdana H, Mikačević M, Šestan B, Širola L, Mokrović H, Jotanović Z, Mađarević T, Zec A, Jurković H, Bašić M, Josifovski B. Anterolateral minimally invasive approach to the hip in the supine position. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - poster prezentacija,
- Gulan G, Jurdana H, Šestan B, Mikačević M, Jurković H, Širola L, Zec A, Mađarević T, Mokrović H, Jotanović Z, Josifovski B, Bašić M. Crescent shape osteotomy of the first metatarsal in correction of the moderate hallux valgus deformity. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - poster prezentacija,
- Jotanović Z, Mihelić R, Mulac-Jeričević B, Tijanić T, Balen S, Šestan B. Korelacija radiografskog fenotipa i genotipa u bolesnika s uznapredovalim oblikom osteoartritisa kuka u hrvatskoj populaciji. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - poster prezentacija,
- Jotanović Z, Etokebe GE, Mihelić R, Kaarvatn MH, Mulac-Jeričević B, Tijanić T, Balen S, Šestan B, Dembić Z. Polimorfizam IL17A gena na poziciji -197(G>A) i predispozicija za nastanak osteoartritisa kuka i koljena u hrvatskoj populaciji - preliminarni rezultati istraživanja. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - poster prezentacija,
- Mihelić R, Jotanović Z, Baričić M, Kotri I. Extracorporeal shock-wave therapy of calcified supraspinatus tendinitis - randomized study of 56 patients. Hrvatski

ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - poster prezentacija,

- Mihelić R, Hero M, Butorac Ž, Jotanović Z. Preživljavanje zgloba kuka nakon učinjene osteotomije zdjelice po Chiariju do konverzije u totalnu endoprotezu kuka - rezultati dugoročnog perioda praćenja. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - usmena prezentacija,
- Šantić V, Jurdana H, Legović D, Šestan B, Mokrović H, Jotanović Z, Orlić D. Nadoknada koštanih defekata kod tumorskih resekcija kostiju. Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lovran, Hrvatska. - usmena prezentacija,
- Gulan G, Ravlic-Gulan J, Jurdana H, Sestan B, Jotanovic Z, Mokrovic H, Tudor A. Total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. Combined 33rd SICOT & 17th PAOA Orthopaedic World Conference, 28 - 30 November 2012, Dubai, United Arab Emirates. - poster prezentacija.

#### **SUDJELOVANJE U ORGANIZACIJI MEĐUNARODNIH KONGRESA:**

- 3rd International symposium „Sports and medicine“, Clinic for Orthopaedic Surgery Lovran, Opatija, October 12. – 13. 2007., Organizing committee.
- Hrvatski ortopedski i traumatološki kongres 2012. s međunarodnim sudjelovanjem, Klinika za ortopediju Lovran, 16. – 18. studenog 2012., Lokalni organizacijski odbor, tajnik.

## RECENZIJE U ČASOPISIMA:

- Recenzent u časopisu Rheumatology International (2010. Impact Factor – 1.431); recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „IRAK1 rs3027898 C/A polymorphism is associated with risk of rheumatoid arthritis“,
- Recenzent u časopisu Molecular Medicine (2010. Impact Factor – 5.908); recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „Chronic and acute effect of IL1 $\beta$  on sex hormone-binding globulin by decreasing HNF-4alpha via JNK/c-Jun pathway“,
- Recenzent u časopisu Osteoarthritis and Cartilage (2011. Impact Factor – 3.904) – časopis br. 1 u kategoriji Ortopedija prema Thomson Reutersu i Journal Citation Reports 2012; recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „IL-1 receptor antagonist gene as a biomarker of progression of knee osteoarthritis in a population cohort“,
- Recenzent u časopisu Journal of Orthopaedic Research (2010. Impact Factor – 2.976) - recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „Association of the ADAMTS14 gene polymorphism with knee osteoarthritis in Thai population“,
- Recenzent u časopisu Journal of Orthopaedic Research (2011. Impact Factor – 2.811) - recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „Association study of the ADAM12 gene polymorphism rs3740199 with knee osteoarthritis in Thais by high resolution melting (HRM) analysis“,
- Recenzent u časopisu Scandinavian Journal of Immunology (2011. Impact Factor – 2.23) - recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „Cellular events for inflammation-induced hyperalgesia mediated by p38MAPK and IL-6 with changes of spinal mOR“,
- Recenzent u časopisu Scandinavian Journal of Rheumatology (2011. Impact Factor – 2.594) - recenzija izvornog znanstvenog rada pod nazivom: „Expression of human

endogenous retrovirus HERV-K18 is associated with clinical severity in osteoarthritis patients.“.

#### **OSTALA ZNANJA:**

- Engleski jezik, aktivno u govoru i pismu,
- Njemački jezik, pasivno,
- Poznavanje Windows OS, služenje MS Office alatima, Internet.

#### **ADRESE ZA PREPORUKE:**

- Prof. dr. sc. Zlatko Dembić, dr. med., Imunološki odjel, Institut za oralnu biologiju, Stomatološki fakultet Univerziteta u Oslu, Sognsvannsveien 10, boks 1072 Blindern, 0316 Oslo,
- Prof. dr. sc. Branko Šestan, dr. med., spec. ortoped, subspec. dječje ortopedije, Klinika za ortopediju Lovran, Šetalište Maršala Tita 1, 51415 Lovran
- Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević, dipl. ing. biokemije, Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka,
- Prof. dr. sc. Bojan Polić, dr. med., Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka.