

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Debora F. Mišić

POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA  
RECEPTORE SLIČNE TOLL-U,  
NJIHOVIH REGULATORNIH MIKRO RNK I  
RETINOIDNOG RECEPTORA (RXR)  
SA RIZIKOM ZA NASTANAK I KLINIČKIM  
PARAMETRIMA OSTEOARTRITISA

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Debora F. Mišić

ASSOCIATION OF  
TOLL-LIKE RECEPTOR GENE VARIANTS,  
THEIR REGULATORY MICRO RNAS AND  
RETINOID RECEPTOR (RXR)  
WITH THE RISK AND CLINICAL  
PARAMETERS OF OSTEOARTHRITIS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

## MENTORI

dr Gordana Šupić, redovni profesor

Univerzitet odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

## KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

dr Aleksandra Petković Ćurčin, docent

Univerzitet odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

dr Tanja Lunić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ana Obradović, naučni saradnik

Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## *Zahvalnica*

*Najsrdajnije se zahvaljujem Profesorki Gordani Šupić na nesebično ukazanom poverenju, velikodušnoj pomoći, strpljenju i razumevanju. Zahvalna sam što imam priliku da učim od Vas i razvijam se u profesionalnom smislu.*

*Neizmerno sam zahvalna profesorki Biljani Božić Nedejković. Hvala Vam što ste uvek tu za mene i što ste mi davali snagu da istrajem. Vaša predanost i deljenje znanja i iskustva su moja inspiracija.*

*Zahvaljujem se i članovima komisije, koleginicama dr Tanji Lunić, dr Ani Obradović i dr Aleksandri Petković Ćurčin na izdvojenom vremenu, savetima i posvećenosti. Divno je bilo saradivati sa vama.*

*Veliku zahvalnost dugujem i profesoru Danilu Vojvodiću čije mi je razumevanje, podrška i verovanje u mene neizmerno značilo.*

*Zahvaljujem se svim kolegama Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Nemanji i Bojani veliko hvala na drugarstvu, smehu i beskrajnoj podršci.*

*Zahvaljujem se mom tati, mojoj porodici i prijateljima na ljubavi koja ne zna za granice i bez čije podrške ja ne bih bila to što jesam danas.*

*Moji Lena, Vladeta i Vukašin su moja snaga. Voli vas vaša Dada najviše na svetu.*

*Posebno sam zahvalna mom Milošu koji je svemu dao smisao i čija me ljubav vodi kroz život.*

*Rad posvećujem svojoj mami*

Ova doktorska disertacija je realizovana u laboratoriji za Molekulsku genetiku Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Biološki uzorci korišćeni za izradu doktorske disertacije su obezbeđeni u saradnji sa Klinikom za ortopediju i traumatologiju Vojnomedicinske akademije.

# POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA RECEPTORE SLIČNE TOLL-U, NJIHOVIH REGULATORNIH MIKRO RNK I RETINOIDNOG RECEPTORA (RXR) SA RIZIKOM ZA NASTANAK I KLINIČKIM PARAMETRIMA OSTEOARTRITISA

## SAŽETAK

Osteoarthritis (OA) je progresivna degenerativna bolest svih struktura zlobnog aparata. U razvoju i progresiji OA značajnu ulogu imaju nasledni faktori i faktori životne sredine. Zapaljenska reakcija i imunski posredovani mehanizmi su osnova patogeneze bolesti. Geni koji su povezani sa zapaljenskim procesom, uključujući gene za receptore slične Toll-u (TLR), su strogo kontrolisani od strane nekoliko mikro RNK. Mikro RNK igraju ključnu ulogu u regulaciji TLR signalizacije u zapaljenskom procesu kontrolom samih TLR, kao i kontrolom adapterskih i regulatornih molekula, faktora transkripcije i citokinske signalizacije. Retinoidni X receptor (RXR), član porodice nuklearnih receptora, je uključen u regulaciju zapaljenskog procesa kao regulator glavnih prokataboličkih medijatora uključenih u zapaljensku reakciju u zglobovima.

Ispitivana je povezanost varijanti gena za TLR, njihovih regulatornim mikro RNK (miR-196a-2, miR-146, miR-155) i RXR $\alpha$  sa kliničkim parametrima, kao i rizikom od OA kod 95 hirurški lečenih pacijenata sa primarnim OA i kontrolnoj grupi od 104 zdrava pojedinca.

Logistička regresiona analiza prilagođena za pol i godine je pokazala da varijante gena za TLR4 rs4986790 i rs4986791 značajno povećavaju rizik od OA ( $p=0,006$ ;  $p=0,00001$ ), kao i varijanta gena za TLR7 rs385389 ( $p=0,012$ ). Varijanta rs11614913 u genu za miR-196a2 je povezana sa smanjenim rizikom od OA ( $p=0,034$ ). Obe analizirane RXR $\alpha$  varijante dovedene su u vezu sa rizikom od OA, i to varijanta rs7864987 sa povećanim rizikom za OA ( $p=0,012$ ), dok rs3118523 varijanta predstavlja protektivni faktor za OA ( $p=0,030$ ). Uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova kod ispitanika sa primarnim OA i kontrola i to za obe ispitivane varijante gena za TLR4-rs4986790 ( $p=0,004$ ) i rs4986791 ( $p=0,0001$ ), gena za TLR7-rs385389 ( $p=0,033$ ), gena za miR-196a2-rs11614913 ( $p=0,010$ ), kao i za varijantu rs7864987 gena za RXR $\alpha$  ( $p=0,008$ ). Varijanta rs5743708 gena za TLR2 dovedena je u vezu sa menopauzom ( $p=0,03$ ). Varijanta rs11614913 gena za miR-196a2 povezana je sa polom i prethodnom povredom zgloba ( $p=0,014$ ), dok je varijanta rs767649 gena za miR-155 povezana sa ranom menopauzom ( $p=0,033$ ). RXR $\alpha$  varijanta rs7864987 povezana je sa starošću ( $p=0,035$ ).

Varijante gena za TLR4 (rs4986790; rs4986791) i TLR7 (rs385389) su potencijalni faktor rizika za OA, dok varijanta gena za miR-196a-2 rs11614913 predstavlja potencijalni zaštitni faktor za ovu bolest. Analizirane varijante gena za RXR $\alpha$  su takođe povezane sa predispozicijom za razvoj OA, jedna kao zaštitna (rs3118523), a druga kao faktor rizika (rs7864987). Identifikacija novih genetičkih biomarkera povezanih sa zapaljenskim procesom u mikrosredini zgloba omogućava uvid u imunopatološke mehanizme bolesti. Modulacija TLR-a, mikro RNK i RXR- $\alpha$  može se uspešno primeniti u dizajniranju individualizovanog pristupa ne samo u lečenju pacijenata koji su razvili ovu bolest, već i kod pacijenata koji su podložni razvoju OA.

Ključne reči: osteoarthritis, TLR, mikro RNK, varijante gena, RXR, zapaljenska reakcija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika/Imunogenetika

# ASSOCIATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE VARIANTS, THEIR REGULATORY MICRO RNAS AND RETINOID RECEPTOR (RXR) WITH THE RISK AND CLINICAL PARAMETERS OF OSTEOARTHRITIS

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a progressive degenerative disease of all structures of the joint. Hereditary and environmental factors play a significant role in the development and progression of OA. Inflammatory reaction and immune-mediated mechanisms represent the basis of the disease pathogenesis. Genes associated with the inflammatory process, including Toll-like receptor (TLR) genes, are tightly controlled by several micro RNAs. Micro RNAs play a key role in the regulation of TLR-signaling in the inflammatory process by controlling TLRs themselves, as well as by controlling adapter and regulatory molecules, transcription factors and cytokine signaling. Retinoid X receptor (RXR), a member of the nuclear receptor family, is involved in the regulation of the inflammatory process as a regulator of the main procatabolic mediators involved in the inflammatory reaction in the joints.

The study evaluated the association between genetic variants in TLRs, their regulatory micro RNAs (miR-196a-2, miR-146, miR-155) and RXR $\alpha$  and clinical parameters of OA, as well as OA risk in 95 surgically treated OA patients and control group of 104 healthy individuals.

Adjusted logistic regression analysis demonstrated that polymorphisms in TLR4 rs4986790 ( $p=0.006$ ), rs4986791 ( $p=0.00001$ ), and TLR7 rs385389 ( $p=0.012$ ) increased OA risk, while miR-196a-2 rs11614913 ( $p=0.034$ ) was significantly associated with decreased OA risk. Both analyzed RXR $\alpha$  variants are associated with the risk of OA-rs7864987 variant with an increased ( $p=0.012$ ), while the rs3118523 variant is a protective factor for OA ( $p=0.030$ ). A statistically significant difference was observed in the distribution of genotypes in OA cases and controls for both investigated TLR4 gene variants-rs4986790 ( $p=0.004$ ), and rs4986791 ( $p=0.0001$ ), TLR7 variant-rs3853839 ( $p=0.033$ ), miR-196a-2 variant rs11614913 ( $p=0.010$ ), as well as for the rs7864987 variant of the RXR $\alpha$  gene ( $p=0.008$ ). The rs5743708 variant of the TLR2 gene was associated with menopause ( $p=0.03$ ). The rs11614913 variant of the miR-196a2 gene was associated with gender and previous joint injury ( $p=0.014$ ), while the rs767649 variant of the miR-155 gene was associated with early menopause ( $p=0.036$ ). RXR $\alpha$  variant rs7864987 is associated with age ( $p=0.035$ ).

TLR4 (rs4986790; rs4986791) and TLR7 (rs385389) gene variants represent potential risk factors for OA, while miR-196a-2 gene variant rs11614913 represents a protective factor for this disease. Analyzed RXR $\alpha$  variations are both associated with OA susceptibility, one as protective (rs3118523) and other as risk factor for OA (rs7864987). The identification of new genetic biomarkers associated with the inflammatory process in the joint microenvironment provides insight into the immunopathological mechanisms of the disease. Modulation of TLRs, micro RNAs and RXR- $\alpha$  can be successfully applied in designing an individualized approach not only in the treatment of patients who have developed this disease, but also in patients susceptible to developing OA.

Keywords: osteoarthritis, TLR, micro RNA, RXR, gene variants, inflammation

Scientific field: Biology

Narrower scientific filed: Genetics/Immunogenetics

## Lista skraćenica

ADAMTS - (engl. *A desintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*)

AP-1 - aktivacioni protein 1 (engl. *Activator protein-1*)

APĆ - antigen prezentujuće ćelije (engl. *Antigen presenting cells*)

CCL - (engl. *Chemokine (C-C motif) ligand*)

CLR - lektinski receptor C-tipa (engl. *C-type lectin receptors*)

CoA - ko-aktivatori

CoR - ko-represori

COX-2 - ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase-2*)

CXCL - (engl. *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)

DAMP - molekularni obrasci povezani sa oštećenjem (engl. *Damage associated molecular patterns*)

DBD - (engl. *DNK-binding domain*)

DMOAD - (engl. *Disease-modifying osteoarthritis drug*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

dsRNA - dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. *Double stranded ribonucleic acid*)

DC - dendritske ćelije

ECD - vanćelijski domen (engl. *Extracellular domain*)

ECM - vanćelijski matriks (engl. *Extracellular matrix*)

ER - receptor za estrogen (engl. *Estrogen receptor*)

FXR - (engl. *Farnesoid X receptor*)

GC - germinativni centar

GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GR - receptor za glukokortikoide (engl. *Glucocorticoid receptor*)

GWAS - (engl. *Genome wide association studies*)

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*)

HMGB1 - (engl. *High mobility group box 1 protein*)

HOX gene - (engl. *Homeobox gene*)



HSC - hematopoetske matične ćelije (engl. *Hematopoietic stem cells*)

HSP - protein toplotnog šoka (engl. *Heat shock protein*)

IAV - virus gripa A (engl. *Influenza A virus*)

IL-6 - interleukin-6

iNOS - inducibilna azot oksid sintaza (engl. *Inducible nitric oxide synthase* )

IRF - regulatorni faktor interferona (engl. *Interferon regulatory factor*)

K-L skala - Kellgren Lawrensova skala

LBD - domen za vezivanje liganda (engl. *Ligand binding pocket*)

LBP - lipopolisaharid vezujući protein (engl. *Lipopolysaccharide binding protein*)

LPS - lipopolisaharid

LRR - leucinom bogati nastavci (engl. *Leucine rich repeats*)

LXR - (engl. *Liver X receptor*)

MAMP - molekulski obrasci povezani sa mikrobima (engl. *Microbe associated molecular patterns*)

MAPK - mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen-activated protein kinase*)

MCP-1 - monocitni hemoatraktantni protein-1 (engl. *Monocyte chemoattractant protein-1*)

MD2 - faktor mijeloidne diferencijacije 2 (engl. *Myeloid differentiation factor 2* )

mDĆ - mijeloidne dendritske ćelije

MHCII - (engl. *Major histocompatibility complex II*)

MMP - matriksna metaloproteinaza (engl. *Matrix metalloproteinase*)

NK ćelije - ćelije prirodne ubice (engl. *Natural killer cells*)

NF-κB - nuklearni faktor κB (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLR - receptori slični NOD-u (engl. *Nod-like receptor*)

NO - azot oksid

NR - nuklearni receptor (engl. *Nuclear receptor*)

NSAIL - nesteroidni anti-inflamatorni lekovi

OA - osteoartritis

PAMP - molekulski obrasci povezani sa patogenom (engl. *Pathogen associated molecular patterns*)

pDC - plazmocitoidne dendritske ćelije

PGE2 - prostaglandin E2

PI3K - fosfatidil-inozitol 3 kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*)

PPAR - (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor*)

PRR - receptor za prepoznavanje obrazaca mikroba (engl. *Pattern recognition receptor*)

RARE - (engl. *Retinoic acid response elements*)

RIG - receptori slični RIG-u (engl. *Rig-like receptor*)

RNK - ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive oxygen species*)

RXR - retinoidni X receptor (engl. *Retinoic X receptor*)

SFA - zasićene masne kiseline (engl. *Saturated fatty acids*)

SHIP protein - (engl. *SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*)

SLE - sistemski lupus eritematozus

SNP - polimorfizam nukleotidne sekvence (engl. *Single nucleotide sequence polymorphism*)

SOCS1 - supresor citokinske signalizacije (engl. *Suppressors of cytokine signalling 1*)

ssRNA - jednolančana ribonukleinska kiselina (engl. *Single stranded ribonucleic acid*)

STAT1 - (engl. *Signal transducer and activator of transcription 1*)

Th ćelije - pomoćničke T ćelije (engl. *T helper cells*)

TIR - (engl. *Toll-like/interleukin-1 (IL-1) receptor*)

TIRAP - (engl. *TIR-containing adaptor protein*)

TLR - Receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)

TNF - (engl. *Tumor necrosis factor*)

TR - receptor za tiroidne hormone (engl. *Thyroid receptor*)

TRAM - (engl. *TRIF-related adaptor molecule*)

Treg - regulatorne T ćelije

TRIF - (engl. *TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon beta*)

VDR - receptor za vitamin D (engl. *Vitamin D receptor*)

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. OSTEOARTRITIS .....	1
1.1.1. Epidemiologija osteoartritisa .....	1
1.1.2. Etiologija osteoartritisa .....	2
1.1.3. Dijagnoza osteoartritisa .....	4
1.1.4. Profilaksa i terapijski pristupi .....	6
1.1.5. Patogeneza osteoartritisa .....	6
1.2. RECEPTORI SLIČNI TOLL-U .....	10
1.2.1. Otkriće receptora sličnih Toll-u .....	11
1.2.2. Ligandi receptora sličnih Toll-u.....	12
1.2.3. Ekspresija receptora sličnih Toll-u .....	13
1.2.4. Građa receptora sličnih Toll-u .....	13
1.2.5. Signalizacija receptora sličnih Toll-u.....	15
1.2.5.1. Signalni put zavisin od MyD88 .....	16
1.2.5.2. Signalni put zavisin od TRIF .....	16
1.2.6. Članovi porodice receptora sličnih Toll-u .....	17
1.2.6.1. TLR2.....	17
1.2.6.2. TLR3.....	18
1.2.6.3. TLR4.....	19
1.2.6.4. TLR7.....	20
1.2.6.5. TLR9.....	20
1.3. MIKRO RNK.....	21
1.3.1. miR-196a-2.....	23
1.3.2. miR-146.....	23
1.3.3. miR-155 .....	24
1.4. Retinoidni X receptor .....	25
1.4.1. Građa retinoidnog X receptora .....	25
1.4.2. Signalizacija retinoidnog X receptora .....	25
1.5. GENETIKA I OSTEOARTRITIS .....	28

2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
3.	MATERIJAL I METODE.....	33
3.1.	ETIČKE SMERNICE.....	33
3.2.	STUDIJSKA POPULACIJA .....	33
3.3.	IZOLACIJA DNK .....	33
3.4.	PROVERA KVALITETA IZOLOVANE DNK.....	34
3.5.	PROVERA KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK.....	35
3.6.	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZAMA NUKLEOTIDNE SEKVENCE .....	35
3.7.	STATISTIČKA ANALIZA .....	38
4.	REZULTATI.....	39
4.1.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA.....	39
4.2.	POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA TLR SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA	40
4.3.	POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA.....	42
4.4.	POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA RXR SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA	43
4.5.	ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA TLR .....	44
4.6.	ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK .....	46
4.7.	ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA RXR $\alpha$ .....	47
4.8.	ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA TLR SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA.....	48
4.9.	ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA.....	49
4.10.	ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA RXR $\alpha$ SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA .....	49
5.	DISKUSIJA .....	51
6.	ZAKLJUČCI .....	64
7.	REFERENCE.....	65

# 1. UVOD

## 1.1.OSTEOARTRITIS

Osteoartritis (OA) je progresivno degenerativno oboljenje zglobova koje je vodeći uzrok hroničnog invaliditeta širom sveta. Karakteriše se morfološkim, biomehaničkim i molekularnim promenama koje zahvataju sve strukture zglobnog sistema. Složeni patološki mehanizmi dovode do degradacije zglobne hrskavice, upale sinovijalne membrane, degeneracije muskulature koja podržava zglob i remodelovanja subhondralne kosti (Loeser, Goldring, Scanzello, & Goldring, 2012). Klinički gledano, najčešći simptomi koji se javljaju kod OA jesu bol u zglobovima, otok, krepitacije i ograničenje obima pokreta, uz zadebljanje zglobne kapsule i sinovitis koji se javljaju u uznapredovalim fazama bolesti (L. Sharma, Kapoor, & Issa, 2006). Osteoartritis zahvata velike zglobove kao što su zglob kuka i kolena, koji podržavaju težinu celog tela i izloženi su stalnom opterećenju (Egloff, Hügle, & Valderrabano, 2012).

U nastanku i progresiji ove kompleksne bolesti zglobova učestvuju različiti faktori koji se mogu podeliti na faktore rizika koji određuju specifičnost oboljenja na individualnom nivou, uključujući sociodemografske karakteristike (pol, etnička pripadnost, socioekonomski status), genetsku predispoziciju, kao i faktore vezane za ishranu i prekomernu telesnu težinu. Dodatno, u etiologiji OA učešće imaju i faktori rizika specifični za zglob koji direktno utiču na njegovu funkciju i uključuju traumatske povrede zgloba, urođene anomalije kostiju/zglobova, kao i izloženost zglobova stalnom opterećenju i ponavljanim mehaničkim pokretima (Allen, Thoma, & Golightly, 2022).

Uprkos složenoj prirodi OA, degenerativne promene uočene u svim zglobovima zahvaćenim OA dele osnovne karakteristike koje dovode do oštećenja svih struktura zglobnog aparata kao i patoloških promena meniskusa i ligamenata što rezultira bolom, deformitetom i gubitkom funkcije (Loeser et al., 2012). Zbog razlika u patogenezi zasnovanih na interakciji individualnih faktora rizika, adekvatan pristup u tretmanu OA i dalje predstavlja izazov.

### 1.1.1. Epidemiologija osteoartritisa

Epidemiološke studije pomažu da se bolje razume incidenca, distribucija i opterećenje OA. Cilj epidemioloških studija je da se identifikuju populacije/pojedinci koji imaju značajniji rizik od razvoja oboljenja, kao i da se primeni do sada stečeno znanje kako u terapiji tako i u preventivi kako bi se potencijalno uticalo na smanjenje negativnih posledica ove bolesti na globalnom nivou.

Iako spada u grupu sporoprogresivnih bolesti, OA se zbog svoje rasprostranjenosti smatra bolešću sa velikim socioekonomskim opterećenjem. Ograničenje lokomotornih organa uz prateći bol dovodi do smanjenja funkcionalnosti obolelih i onemogućava osnovu normalnog funkcionisanja, a to je pokretljivost. Samim tim OA negativno utiče na kvalitet života. Jedna od ključnih činjenica za opterećenje koje sa sobom nosi OA jeste i starenje svetske populacije s obzirom da sam proces starenja ima ulogu u nastanku i progresiji bolesti, a takođe je značajno i u kontekstu ograničavanja adekvatnih pristupa u tretmanu OA. Mnoge studije su pokazale da rizik od OA raste sa povećanjem godina života (Anderson & Loeser, 2010).

Incidenca oboljenja veća je kod žena u poređenju sa muškarcima. Procenjuje se da OA pogađa oko 10% muškaraca i 18% žena svetske populacije starije od 60 godina (Allen et al., 2022). Žene imaju veću verovatnoću da razviju ovo stanje, naročito OA kolena i malih zglobova šake, posebno posle 50. godine zbog promena hormonskog statusa u organizmu koje nastaju tokom menopauze (L. Sharma et al., 2006).

Takođe se prevalenca OA razlikuje među različitim populacijama na osnovu etničke pripadnosti (Allen et al., 2022). Među različitim populacijama uočena je i razlika u lokalizaciji oboljenja, što može biti povezano ne samo sa jakom genetičkom predispozicijom već i sa značajnim uticajem faktora rizika životne sredine. Osteoartritis kuka i šake su mnogo ređi među ljudima žute rase nego kod pripadnika bele rase. Suprotno tome, žene žute rase imaju značajno veću prevalencu radiografskog i simptomatskog OA kolena nego žene bele rase (Y. Zhang et al., 2001).

Budući da je jedan od važnih faktora rizika za nastanak OA gojaznost, smatra se da će globalni teret ovog oboljenja rasti jer su i stope gojaznosti svetskih populacija u konstantnom porastu. Metabolički poremećaji i njihov uticaj na OA su posebno istraživani. OA je doveden u vezu sa poremećajima metabolizma lipida i glukoze i insulinskom rezistencijom čija globalna prevalenca je takođe u porastu, a koji su usko povezani sa smanjenom pokretljivošću, sedentarnim načinom života i invaliditetom (Allen et al., 2022).

Imajući u vidu da bol i ograničena pokretljivost negativno utiču na kvalitet svakodnevnog života, kao i da svetska populacija ubrzano stari, adekvatan pristup u cilju otkrivanja sklonosti ka razvoju bolesti, podjednako kao i kontrola toka bolesti u cilju omogućavanja održivog funkcionisanja obolelih sve više dobija na značaju.

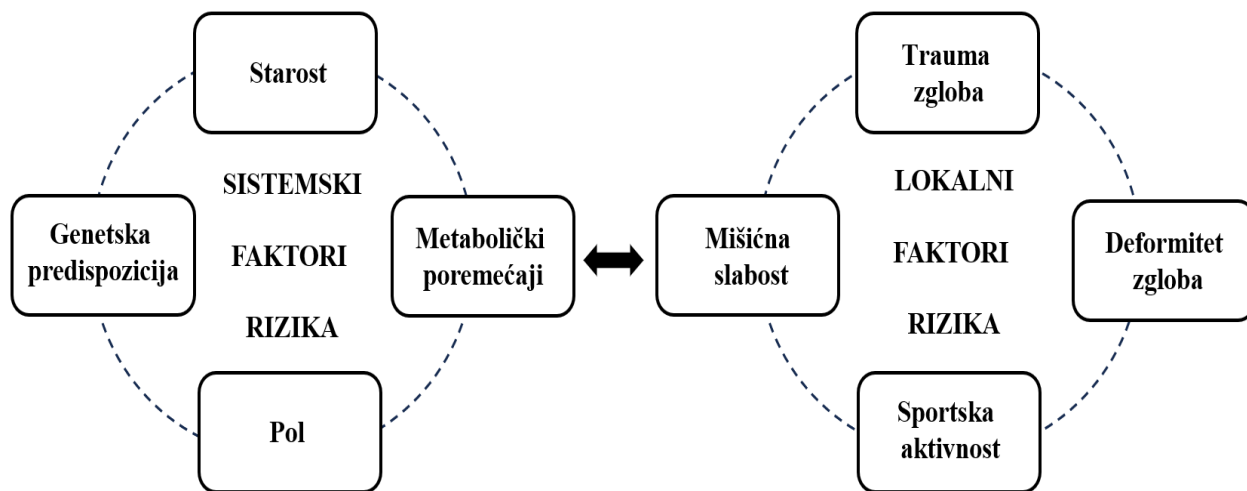
### **1.1.2. Etiologija osteoartritisa**

Osteoartritis je veoma kompleksna bolest budući da nastaje usled dejstva mnogobrojnih faktora rizika. Osteoartritis se može javiti u lokalizovanoj formi (zahvata jedan zglob) ili generalizovanoj formi (zahvata veći broj zglobova) (Samvelyan, Hughes, Stevens, & Staines, 2021). Iako patološke promene karakteristične za OA mogu zahvatiti bilo koji zglob, OA obično zahvata noseće zglobove donjih ekstremiteta poput kolena, kuka i skočnih zglobova, koji su izloženi stalnom opterećenju i ponavljanim mehaničkim pokretima (Egloff et al., 2012).

Na osnovu etiologije bolesti, OA se klasifikuje kao primarni ili sekundarni. Uzrok primarnog OA je nepoznat i karakteriše se brojnim biohemijskim i metaboličkim poremećajima. Poseban aspekt primarnog OA jeste i genetska predispozicija. Uobičajeni faktori rizika koji doprinose nastanku sekundarnog OA uključuju traumu, poremećaje mehano-kompenzatornih mehanizama zgloba, kao i prekomernu upotrebu zglobova. Gojaznost i sedentarni način života takođe doprinose razvoju sekundarnog OA. Razumevanje međudejstva ovih faktora je ključno za razvoj ciljanih terapija i intervencija za sprečavanje ili usporavanje progresije OA.

Same faktore rizika za nastanak OA mozemo podeliti na sistemske faktore rizika i lokalne faktore rizika (Slika 1). Godine, pol, gojaznost i genetska predispozicija kao sistemski faktori čine osnovu za razvoj ovog hroničnog oboljenja. Lokalni faktori rizika odnose se na sam zglob. Trauma zgloba je najznačajniji lokalni faktor rizika. Zajedno, sistemski i lokalni faktori rizika delovanjem različitih mehanizama koji se preklapaju utiču kako na celokupan organizam, tako i

na metabolizam samog zgloba i povećavaju podložnost OA. Takođe, kako individualnim tako i zajedničkim dejstvom ovi faktori dovode do progresije bolesti i pogoršanja postojećih problema, što predstavlja značajan faktor u patološkim procesima u specifičnom tkivu hrskavice.



**Slika 1.** Faktori rizika za razvoj osteoartritisa.

Starenje je primarni faktor rizika za OA i incidenca oboljenja raste sa porastom godina života. Tokom godina dolazi do povećanja katabolizma hrskavice i smanjenja anaboličke aktivnosti hondrocita (Anderson & Loeser, 2010). Promene u hrskavici povezane sa starenjem doprinose prekomernom remodelovanju matriksa hrskavice, što vodi degradaciji i povećanoj proizvodnji citokina i enzima (Loeser et al., 2012). Rizik od razvoja OA je veći kod žena nego kod muškaraca (Allen et al., 2022). Polne razlike u težini kliničke slike OA su izražene među pacijentima starijim od 55 godina. Zabeleženo je da žene imaju izraženije simptome kao i radiografski teži oblik OA kolena koji ima progresivniji tok nego OA muškaraca. Ove razlike između polova mogu se pripisati gubitku estrogena kod žena u postmenopauzi, ali i indeksu telesne mase sa kojom je u vezi i fizička aktivnost (Yuqing Zhang & Jordan, 2010).

Razlike u rasnoj/etničkoj pripadnosti su takođe uočene. Kombinacija genetskih i socioekonomskih faktora može uticati na rasprostranjenost OA među etničkim grupama. Međutim, postoje dokazi da su rasne/etničke razlike povezane i sa razlikama u anatomskim karakteristikama (suženje zglobnog prostora i prisustvo osteofita) koje su značajne kako za samu patogenezu bolesti, tako i za radiografsku dijagnostiku (Y. Zhang et al., 2001).

Gojaznost je povezana sa povećanom metaboličkom inflamacijom i metaboličkim sindromom. Adipokini poput leptina, adiponektina i lipokalina 2 indukuju proizvodnju inflamatornih citokina faktor nekroze tumora (eng. Tumor necrosis factor, TNF), interleukina-6 (IL-6) i IL-12, što doprinosi zapaljenskom fenotipu mikrosredine zgloba (Dickson, Roelofs, Rochford, Wilson, & De Bari, 2019). Takođe je primećeno je da je veliki broj nutritivnih faktora povezan sa razvojem OA, uključujući vitamin A, vitamin D, vitamin C i vitamin K (O'Neill, McCabe, & McBeth, 2018). Balansirana ishrana svakako je važna i u kontekstu održavanja težine u opsegu normalnog indeksa telesne mase (eng. Body mass index, BMI) budući da je i težina važan faktor zbog opterećenja koji zglobovi nose.

Među lokalnim faktorima rizika ističe se povreda zglobnog aparata. Osteoartritis može nastati nakon povrede usled direktnog oštećenja zglobne hrskavice. Takođe se može razviti i kao sekundarna posledica usled prekomernog opterećenja hrskavice koje nastaje usled oštećenja tkiva i podržavajuće muskulature koja bi trebalo da podnese opterećenje. Neusklađen anatomski položaj i slabost podržavajuće muskulature dovode do razvijanja biomehaničkih kompenzatornih mehanizama koji ne uspevaju adekvatno da rasporede opterećenje (L. Sharma et al., 2006). Hondrociti imaju receptore za komponente vanćelijskog matriksa (eng. Extracellular matrix, ECM) koji reaguju na mehaničku stimulaciju pokretanjem proizvodnje proteinaza koje razgrađuju matriks, kao i proizvodnje inflamatornih citokina i hemokina (Loeser et al., 2012).

Faktori rizika specifični za zglobove poput gustine kostiju i koštane mase, oblika kostiju/zgloba, snage zglobova, izdržljivosti i neuromuskularne kontrole su od ključne važnosti za funkcionisanje zglobnog aparata (Allen et al., 2022). Dodatno, prekomerna upotreba zglobova koja je karakteristična za sportske aktivnosti takođe doprinosi nastanku i progresiji OA usled konstantnog ponavljanog izlaganja zglobova pojedinim pokretima (Slika 1) (Allen et al., 2022).

### **1.1.3. Dijagnoza osteoartritisa**

Do danas nije ustanovljen jedinstveni test koji bi obuhvatio sve kliničke parametre za postavljanje dijagnoze OA. Dijagnoza bolesti se zasniva na kombinaciji kliničke procene, funkcionalnog statusa i radioloških snimaka pri čemu se radiografski nalaz smatra referentnim standardom zbog ekonomičnosti, bezbednosti i široke dostupnosti (Ahmed & Mstafa, 2022).

U okviru metoda radiografske dijagnostike najčešće se upotrebljava Kellgren-Lawrence (K-L) skala ocenjivanja koja podrazumeva ocenjivanje zgloba zahvaćenog OA u pet nivoa od 0 do 4 (Kohn, Sassoon, & Fernando, 2016). Ova skala, ustanovljena još 1957. godine, zasnovana je na radiografskom nalazu zglobnog aparata. Uz KL skalu, u kliničkoj praksi se takođe koriste i upitnici o problemima sa zglobovima (engl. Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score, KOOS za kolena; Hip Disability and Osteoarthritis Score, HOOS za kukove), kao i Indeks osteoartritisa (engl. Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index, WOMAC) za subjektivnu procenu bola i funkcije zgloba od strane pacijenta.

Četiri stadijuma OA su definisana vizualizacijom zglobnih struktura i njihovih patoloških promena:

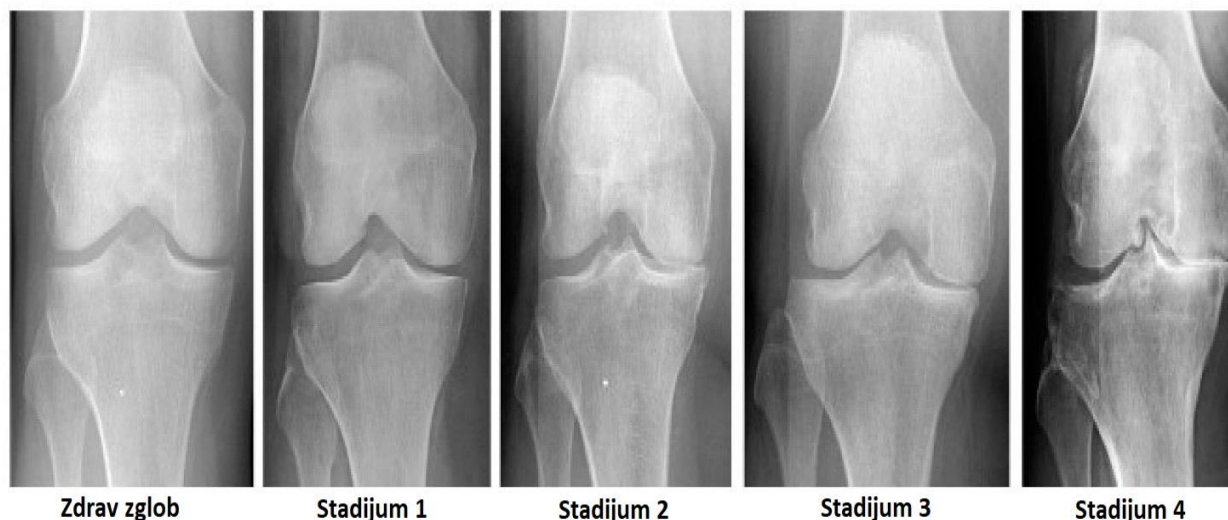
Stadijum 1 - suspektno suženje zglobnog prostora i minimalni, početni osteofiti;

Stadijum 2 - jasno prisustvo osteofita sa mogućim suženjem zglobnog prostora;

Stadijum 3 - osteofiti srednje veličine sa jasnim suženjem zglobnog prostora, skleroza subhondralne kosti;

Stadijum 4 - prisustvo osteofita i cisti, izraženo suženje zglobnog prostora i deformacija kosti (Slika 2) (Ahmed & Mstafa, 2022).





**Slika 2.** Radiografski snimak zdravog zgloba i prikaz zgloba sa osteoartritisom prema Kellgren-Lawrence (K-L) skali ocenjivanja. Preuzeto i modifikovano iz Ahmed & Mstafa, 2022.

Druge radiografske metode, poput direktnog merenja međukoštane udaljenosti kao indikatora širine zglobnog prostora, koriste se za klinička ispitivanja terapija, ali budući da su ove promene sporoprogresivne ove metode nemaju toliki doprinos pravovremenom postavljanju dijagnoze. Osetljivije metode snimanja koje koriste magnetnu rezonancu omogućavaju detaljan pregled više struktura u zglobu za razliku od konvencionalne radiografije (8).

Simptomi OA su bol u zglobovima, jutarnja ukočenost zglobnog aparata, smanjen obim pokreta i otok. Patološke promene, a samim tim i simptomi, razlikuju se od osobe do osobe, što naglašava važnost individualizovane terapije. Zanimljivo je napomenuti da se kod određenog procenata pacijenata javlja neusklađenost radiografskog nalaza i kliničkih simptoma bolesti (Ahmed & Mstafa, 2022). Pacijenti se obično javljaju na pregled zbog bolova u zglobovima, najčešće u već uznapredovalim fazama bolesti koje se karakterišu najčešće prisustvom otoka, a vrlo često i već ograničenom funkcijom zglobnog sistema.

Procenjuje se da će OA imati sve veći uticaj na sisteme javnog zdravlja zbog visoke prevalencije (Helmick et al., 2008). Smatra se da je za adekvatan pristup u lečenju ove bolesti u budućnosti izuzetno bitno poboljšanje praćenja faktora rizika, kao i praćenje ranih simptoma i njihovog uticaja. Detaljan pristup brojnim etiološkim faktorima omogućilo bi osmišljavanje potencijalnih pristupa za intervenciju ili prevenciju OA na globalnom nivou (Yuqing Zhang & Jordan, 2010).

Biološki i biomehanički aspekti patologije hrskavice igraju značajnu ulogu u inflamatornim i degradativnim procesima kod OA. Međutim, došlo je samo do skromnog napretka u prevenciji i lečenju OA. Ciljanje na signalne puteve zapaljenskog procesa i korišćenje tehnika tkivnog inženjeringa za podsticanje regeneracije hrskavice predstavljaju moguće buduće terapijske poduhvate u ovoj oblasti.

#### 1.1.4. Profilaksa i terapijski pristupi

Uprkos visokoj prevalenci i opterećenju u populacijama širom sveta, primarni ciljevi lečenja OA se i dalje svode na ublažavanje simptoma bolesti, smanjenje intenziteta bola i održavanje mobilnosti zglobova u cilju unapređenja kvaliteta života sa OA. Osnova terapije OA je simptomatska u cilju održavanja funkcije zglobova i zaustavljanja napredovanja bolesti kako bi se sprečio invaliditet. Danas postoje kliničke smernice zasnovane na preporuci nefarmakoloških opcija lečenja, opcija lečenja koje podrazumevaju upotrebu medikamenata koji su pokazali efikasnost u smanjenju simptoma bolesti i održavanju funkcije zgloba, kao i opcija koje podrazumevaju invanzivne hirurške pristupe kod pacijenata kod kojih je bolest značajno uznapredovala.

Pristupi koji nisu zasnovani na primeni medikamentozne terapije podrazumevaju promenu načina života radi unapređenja kvaliteta života. Pacijentima sa OA gradusa od 1 do 3 prema K-L skali savetuje se promena režima ishrane i uvođenje doziranog programa vežbanja i uopšte fizičke aktivnosti u skladu sa kliničkom slikom, opštim stanjem i godinama pacijenta. Fizikalna terapija je takođe važna mera za ublažavanje simptoma. Od farmakoterapijskih mera najčešće se primenjuju oralni i lokalni nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL) i opiodi koji kratkoročno smanjuju intenzitet bola, upalu i otok obolelog zgloba (T. Chen et al., 2021). Takođe se primenjuju i intraartikularne injekcije kortikosteroida i hijaluronske kiseline. Kortikosteroidi smanjuju upalu i napredovanje bolesti inhibicijom kaskade proinflatornih medijatora. Egzogeni suplementacija hijaluronskom kiselinom koristi se za ublažavanje simptoma bolesti i obnavljanje funkcije hrskavice (T. Chen et al., 2021; Ding & Hu, 2021).

Kod uznapredovalih stadijuma bolesti (K-L skala gradus 4) pacijenti se podvrgavaju invazivnijim hirurškim pristupima kao što su artroplastika ili operacija potpune zamene zgloba (T. Chen et al., 2021; Overton, Nelson, & Neogi, 2022). Artroskopske tehnike uključuju lavažu i debridman kolena, dok tehnike obnavljanja hrskavice podrazumevaju stimulaciju kostne srži, osteohondralnu transplantaciju i implantaciju autolognih hondrocita (Rönn, Reischl, Gautier, & Jacobi, 2011).

Iako su populacije obolele od OA vrlo heterogene, napredak u identifikaciji pojedinca sa predispozicijom za razvoj bolesti bi omogućio individualni pristup i kreiranje personalizovanih terapija (Foster, Eriksson, Deveza, & Hall, 2023). Važan aspekt pristupa u budućnosti jeste identifikacija komorbiditeta u predviđanju incidence i prevalencije OA, kao i blagovremeno i efikasno lečenje pacijenata sa OA.

#### 1.1.5. Patogeneza osteoartritisa

Osteoartritis je složeno stanje sa multifaktorijalnom patogeneza, koja je rezultat dejstva genetskih, biomehaničkih i biohemijskih faktora. Patološke promene uočene u OA zglobovima uključuju degradaciju zglobne hrskavice, zadebljanje subhondralne kosti, upalu sinovijalne membrane, degeneraciju podržavajuće muskulature zgloba, kao i hipertrofiju zglobne kapsule (Loeser et al., 2012). Iako tačan uzrok OA nije u potpunosti razjašnjen, jasno je da nekoliko ključnih mehanizama doprinosi patogenezi, sa zapaljenskim procesom kao centralnim događajem.

Specifičan aspekt OA jeste jedinstveno tkivo hrskavice. Primarna uloga zglobne hrskavice je da obezbedi podmazivanje i smanji trenje između kostiju omogućavajući pokrete zglobova (Krishnan & Grodzinsky, 2018). Takođe služi kao amortizer pokreta i smanjuje stres tako što ravnomerno raspoređuje težinu i sile preko zgloba (Carballo, Nakagawa, Sekiya, & Rodeo, 2017). U ljudskom telu postoje tri vrste hrskavice:

1. Hijalinska hrskavica - nalazi se u nosu, trahejama, grkljanu, zglobovima i rastućem skeletu.
2. Elastična hrskavica - nalazi se u grkljanu, epiglotisu i spoljašnjem uhu. Sastoji se od kolagena tipa 2 i proteoglikana, zajedno sa elastičnim vlaknima koja joj daju fleksibilnost i robusnost.
3. Fibrohrskavica - nalazi se u intervertebralnom disku, pubičnoj simfizi, meniskusu, i spojevima tetiva i ligamenata/tetiva i kostiju. Izgrađena je primarno od vlakana kolagena tipa 1 (Krishnan & Grodzinsky, 2018).

Hijalinska hrskavica se odlikuje specifičnom morfološkom arhitekturom i biohemijskim sastavom. Avaskularni vanćelijski matriks sastoji se od vode i 3 glavna tipa makromolekula - vlakana (kolagen i elastin), proteoglikana i glikoproteina. Ove makromolekule sintetišu hondrociti (Carballo et al., 2017). Fleksibilnost i svojstva hrskavice zapravo zavise od hidratacije, budući da između 60 i 85 procenata težine hrskavice čini voda (Krishnan & Grodzinsky, 2018). Kolagen tipa 2 čini većinu kolagenih vlakana u hrskavici i stvara mrežu koja hrskavici obezbeđuje otpornost i snagu. Proteoglikani daju matriksu hrskavice konzistenciju nalik gelu i pomažu u njenoj otpornosti na pritisak. Osnovni proteoglikan u hrskavici je agrekan, a takođe hrskavicu grade i drugi proteoglikani kao što su dekorin i biglikan (Krishnan & Grodzinsky, 2018). Zajedno, ovi elementi daju hrskavici njene jedinstvene viskoelastične karakteristike (Carballo et al., 2017).

Još jedna karakteristika hrskavice, veoma bitna za patološka stanja jeste odsustvo vaskularizacije. Za biomehaničke karakteristike zglobne hrskavice, podmazivanje i ishranu veoma je bitna uloga sinovijalne tečnosti. Sinovijalna tečnost se sastoji od hijaluronske kiseline, lubricina i fosfolipida. Stanje sinovijalne tečnosti i njenih komponenti, kao i prisustvo inflamatornih medijatora služi kao biomarker stanja zglobova (Carballo et al., 2017).

Glavne konstitutivne ćelije hrskavice su hondrociti. Hondrociti nastaju iz mezenhimalnih progenitorskih ćelija tokom embrionalnog razvoja u procesu hondrogeneze. Igraju ključnu ulogu u održavanju homeostaze hrskavice i proizvodnje vanćelijskog matriksa putem enzima, faktora rasta i inflamatornih medijatora. Za homeostazu tkiva hrskavice, kao i celog zgloba, veoma je bitna stroga kontrola sinteze enzima (Carballo et al., 2017; Krishnan & Grodzinsky, 2018).

U fiziološkim okolnostima, ekspresija matriksnih metaloproteinaza (MMP), degradativnih enzima, je strogo kontrolisana u hondrocitima (Goldring & Otero, 2011). Sposobnost hondrocita da proizvode i oslobađaju proteinaze je preduslov za njihovu sposobnost kontrole homeostaze. Pravilno remodelovanje tkiva u fiziološkim uslovima zavisi od regulisane aktivnosti ovih enzima (Carballo et al., 2017). Kolagen tipa 2 koji je osnovni konstituent hrskavice je osnovni supstrat kolagenaza, među kojima najvažniju ulogu ima MMP-13. Agrekanaze iz porodice vanćelijskih proteinaza ADAMTS (eng. A desintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs), smatraju se glavnim enzimima uključenim u degradaciju agrekana, glavnu formu proteoglikana u hrskavici (Goldring & Otero, 2011; Shuyu Liu et al., 2022). Sa druge strane ADAMTS 4/5 su esencijalne proteaze (Yao et al., 2023). ADAMTS-5 je prisutna i u zdravom i u hrskavici OA zgloba, dok je ekspresija ADAMTS-4 specifična za OA hrskavicu (Ting Li et al., 2022).

Uprkos svojoj izdržljivosti, glavni problem zglobne hrskavice i njene patologije krije se u njenom ograničenom kapacitetu regeneracije. Usled starenja, ali takođe i usled povreda ili prekomerne upotrebe zglobova dolazi do poremećaja homeostaze hrskavice što vodi hroničnim patološkim procesima. Danas je utvrđeno da etiologija OA ima važnu imunološku komponentu. Osnova funkcionisanja zglobnog aparata jeste homeostatsko stanje, te je stroga regulacija zapaljenskog odgovora neophodna za normalno funkcionisanje kako bi se izbegla prekomerna aktivnost imunskih mehanizama koja dovodi do oštećenja tkiva. Međutim, poremećaji u regulaciji zapaljenskog odgovora se mogu postepeno razviti u hroničnu upalu niskog intenziteta koja može da prethodi različitim imunski posredovanim patološkim stanjima. Mehanizmi povratne sprege koji regulišu zapaljensku signalizaciju imaju važnu ulogu u imunskom nadzoru i kontroli zglobnog aparata i sprečavaju ovake reakcije usmerene na sopstveno tkivo (Mann et al., 2017).

Iako sama zapaljenska reakcija igra ključnu ulogu u oporavku tkiva, posebno nakon povrede, hronična upala ima dugoročne štetne posledice na zglobove. Iako se ranije smatralo da OA ne spada u grupu zapaljenskih bolesti, danas se zna se da je hroničan zapaljenski proces niskog intenziteta ključni faktor degeneracije zglobnog aparata u OA. Pokazano je da je zapaljenska reakcija prisutna u zglobu mnogo pre nego što se radiografski detektuju značajne promene zglobnih struktura (Sokolove & Lepus, 2013). Poremećena homeostaza između sinteze i razgradnje komponenti vanćelijskog matriksa hrskavice usled prekomerne proizvodnje proinflatornih medijatora je osnova za razvoj hroničnog stanja koje se odlikuje začaranim krugom zapaljenja i degradacije tkiva. Dakle, može se reći da su patološke promene karakteristične za OA rezultat poremećene ravnoteže između anaboličkih i kataboličkih procesa u zglobu (Molnar et al., 2021).

Brojne ćelije imunskog sistema, citokini, hemokini i drugi zapaljenski medijatori uključeni su u zapaljenski proces povezan sa OA. Oštećenje svih struktura diartrodijalnog zgloba su uzrokovani delovanjem proinflatornih komponenti. Smatra se da je u osnovi patogeneze ovog oboljenja interakcija između oštećenja zglobnog aparata različite prirode i hronične upale niskog intenziteta (Orlowsky & Kraus, 2015). Oštećenje vanćelijskog matriksa koje je rezultat povreda zgloba, starenja, traume ili konstantnog mehaničkog opterećenja značajno doprinosi razvoju OA. Usled povrede ili ćelijskog stresa, u zglobu dolazi do stvaranja endogenih molekula oštećenja. Specifičnost OA kao patološkog stanja leži upravo u tome što su ovi molekuli koji su inače uključeni u mehanizme odbrane i održanje homeostaze tkiva zapravo okidača razvoj patoloških procesa u OA. Ovi endogeni molekuli oštećenja koji pokreću zapaljenski odgovor i aktiviraju urođeni imunitet aktivacijom receptora urođenog imuniteta.

Degradacija hrskavice se smatra osnovnom karakteristikom OA, a degradacija kolagena tipa 2 je ključni faktor u ireverzibilnom toku bolesti (Goldring & Otero, 2011). Dolazi do uspostavljanja kataboličkog stanja i do progresivne destrukcije zglobnih struktura (Molnar et al., 2021). Abnormalno remodelovanje tkiva zgloba nastaje usled poremećene homeostaze zbog dejstva mnogobrojnih zapaljenskih medijatora poput inflamatornih citokina i hemokina, koji iniciraju i/ili propagiraju zapaljenski proces (Loeser et al., 2012). Glavni proinflatorni citokini uključeni u patofiziologiju OA su IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6, a pored njih u hroničan zapaljenski proces uključeni su i IL-15, IL-17 i IL-8 (Molnar et al., 2021).

Jedan od ključnih citokina u patogenezi OA je IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  je glavni regulator zapaljenskog procesa budući da aktivnost ovog citokina ima uticaj na sintezu proinflatornih i

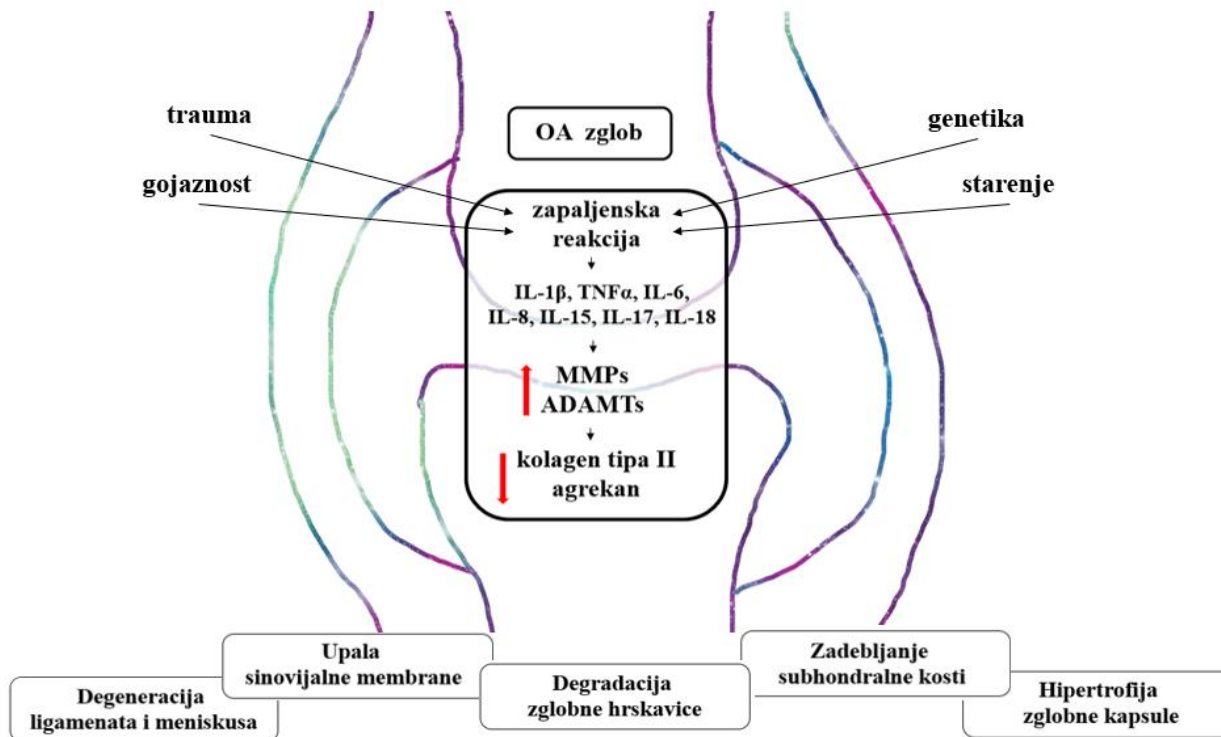
kataboličkih medijatora koji doprinose degradaciji tkiva zgloba (Shuyu Liu et al., 2022). Pokazano je da je nivo IL-1 $\beta$  povišen u sinovijalnoj tečnosti, hrskavici kao i u slojevima subhondralne kosti u OA (Shuyu Liu et al., 2022). Receptor za IL-1 $\beta$  se eksprimira na brojnim tipovima ćelija zgloba, uključujući hondroците, sinoviocyte, osteoblaste i osteoklaste, čime se ostvaruje efekat ovog citokina na ćelije zgloba koje učestvuju u imunopatogenezi OA (Molnar et al., 2021). Glavni efekti IL-1 $\beta$  su inhibicija sinteze makromolekula hrskavice, promocija sinteze kataboličkih medijatora i promocija apoptoze hondrocita (Yao et al., 2023). Delovanje IL-1 $\beta$  je ključno za dalju amplifikaciju zapaljenja, budući da dovodi do oslobađanja drugih proinflamatornih citokina kao i sinteze enzima koji vrše degradaciju tkiva od strane hondrocita (Shuyu Liu et al., 2022).

Dodatno, posredstvom aktivacije različitih hemokina poput monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (engl. Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) i CCL5 (engl. Chemokine (C-C motif) ligand 5), IL-1 $\beta$  stimuliše ekspresiju gena koji kodiraju inducibilnu azot oksid sintazu (engl. Inducible nitric oxide synthase, iNOS) i ciklooksigenazu-2 (engl. Cyclooxygenase-2, COX-2) (Molnar et al., 2021). Ovi katabolički putevi IL-1 $\beta$  u hondrocitima su uglavnom regulisani putem signalizacije preko nuklearnog faktora kB (engl. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kB). Kanonski signalni put NF-kB (p65/p50) reguliše ekspresiju MMP, NOS2 i COX-2. Osim NF-kB, aktivira se i put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) kao odgovor na mehaničke i zapaljenske stimuluse u hondrocitima (Goldring & Otero, 2011). IL-1 $\beta$  takođe indukuje produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (engl. Reactive oxygen species, ROS), slobodnih radikala koji sadrže molekule kiseonika uključujući hidrosilni radikal (HO $^{\cdot}$ ), vodonik peroksid (H $_2$ O $_2$ ), superoksid anjon (O $_2^{\cdot-}$ ), azot oksid (NO $^{\cdot}$ ) i hipohloritni jon (ClO $^{\cdot-}$ ) koji regulišu apoptozu hondrocita, kao i sintezu/razgradnju vanćelijskog matriksa (Zahan, Serban, Gherman, & Fodor, 2020).

TNF- $\alpha$  je drugi citokin koji ima važnu ulogu u patogenezi OA, i deluje sinergistički sa IL-1 $\beta$ . Efekat ovog citokina je čak i do 1000 puta manji u odnosu na IL-1 $\beta$ , ali je pokazano da samo prilikom zajedničkog delovanja ova dva citokina dolazi do značajne destrukcije hrskavice u poređenju sa individualnim dejstvom ovih citokina (Shuyu Liu et al., 2022). Ćelije sinovijalne membrane i hondrociti stvaraju ovaj plejotropni citokin (Shuyu Liu et al., 2022). Efekti TNF- $\alpha$  na patološke procese u OA zglobu posredovani su NF-kB putem, ali i fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)/Akt osom doprinoseći progresiji sinovitisa i degradaciji hrskavice (Shuyu Liu et al., 2022; Songyang Liu et al., 2019). Pokazano je da je degradacija molekula kolagena i agrekana, izazvana ekspresijom zapaljenskih medijatora kao što su IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , direktno povezana sa progresijom OA, što ukazuje na centralnu ulogu ovih imunskih medijatora (C.-Y. Yang, Chanalaris, & Troeberg, 2017).

Pored IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , pacijenti sa OA imaju viši nivo IL-6 u krvi i sinovijalnoj tečnosti, što je u korelaciji sa pogoršanjem stanja (Molnar et al., 2021). Podstičući razvoj MMP i sprečavajući sintezu kolagena, IL-6 doprinosi degradativnim procesima hrskavice (Shuyu Liu et al., 2022). IL-8 je još jedan citokin čija aktivnost dovodi do migracije inflamatornih ćelija u zglob, uključujući neutrofile. Pokazano je da je nivo IL-8 povišen u sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa OA, kao i da i ovaj citokin povećava sintezu proteaza, što doprinosi zapaljenskoj reakciji u zglobu (Yao et al., 2023). Pacijenti sa OA imaju i veće količine IL-17 u krvi i sinovijalnoj tečnosti, što se dovodi u vezu sa pogoršanjem radiografskih nalaza zglobova sa OA (Molnar et al., 2021). Promovišući proizvodnju proinflamatornih citokina, hemokina i enzima koji razgrađuju matriks, IL-17 stimuliše upalu i razvoj osteofita kod OA (Shuyu Liu et al., 2022).

U početnim fazama bolesti, takođe se detektuje i povećanje koncentracije IL-15 u sinovijalnoj tečnosti, ali nije pronađena korelacija između nivoa IL-15 i radiološki potvrđene progresije OA (Molnar et al., 2021). Faktori koji utiču na pojavu, progresiju i karakteristike OA prikazani su na Slici 3.



**Slika 3.** Faktori koji ukazuju na pojavu osteoartritisa, centralne događaje i karakteristike bolesti.

## 1.2. RECEPTORI SLIČNI TOLL-U

Receptori slični Toll-u (eng. Toll-like receptori, TLR) predstavljaju klasu transmembranskih proteina koji igraju ključnu ulogu u urođenom imunskom sistemu gde kao prva linija odbrane učestvuju u odbrani organizma od patogena kao što su bakterije, virusi i gljivice. Pored iniciranja adekvatnih imunskih mehanizama u borbi protiv patogena, takođe imaju važne uloge u održavanju imunske homeostaze i procesima tolerance. Prisustvo TLR u širokom spektru organizama, ne samo kod sisara, već i u različitim organizmima, od insekata do biljaka, naglašava njihov evolucionarni značaj. TLR posredovano prepoznavanje patogena ili signala opasnosti osnovni je mehanizam u odbrani od patogena i održavanju homeostaze kod različitih vrsta.

TLR su jedna od najbrojnijih porodica receptora za prepoznavanje obrazaca mikroba (eng. Pathogen recognition receptors, PRR). PRR su transmembranski proteini povezani sa ćelijskom i endozomskom membranom ili citosolom koji prepoznaju molekulske strukture koje su karakteristične za patogene, takozvane molekularne obrasce povezane sa patogenom (eng. Pathogen associated molecular pattern, PAMP). Glavna uloga PRR jeste aktivacija specifičnih imunskih mehanizama za odbranu od patogena putem aktivacije nizvodnih puteva transdukcije

signala, koji dovode do produkcije inflamatornih citokina, interferona tipa I (IFN) i drugih medijatora zapaljenja (Amarante-Mendes et al., 2018). Pored TLR, u grupu PRR spadaju i receptori slični NOD-u (eng. NOD-like receptors, NLR), receptori slični RIG-u (eng. RIG-like receptors, RLR), i lektinski receptori C-tipa (CLR) (Roh & Sohn, 2018).

Za TLR je karakteristična i aktivacija od strane endogenih molekula poreklom od samog domaćina, što je naročito važno u kontekstu autoimunskih i zapaljenskih oboljenja. Pored PAMP-ova, TLR takođe prepoznaju endogene molekule poznate kao molekulski obrasci koji su povezani sa oštećenjem (eng. Damage associated molecular pattern, DAMP). Ove ćelijske komponente se oslobađaju u vanćelijsko okruženje nakon smrti ćelije izazvane traumom ili mehaničkom povredom. Za ovakvu zapaljensku reakciju izazvanu stresom ili povredom tkiva u odsustvu mikroorganizama koristi se termin sterilna inflamacija. Sterilna zapaljenska reakcija deli osnovne karakteristike sa infektivnom upalom poput regrutovanja imunskih ćelija i aktivacije inflamatornih medijatora. Neki od najpotentnijih DAMP-ova jesu HMGB1, nuklearni protein koji se oslobađa iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija, zatim proteini toplotnog šoka (eng. Heat shock protein, HSP) koji su uključeni u ćelijske odgovore na stres (HSP60 i HSP70), komponente vanćelijskog matriksa poput hijaluronana i fibrinogena, S100 proteini (S100A8 i S100A9), kao i vanćelijska DNK i RNK oslobođena iz oštećenih ćelija.

### 1.2.1. Otkriće receptora sličnih Toll-u

Otkriće TLR-a je imalo veliki uticaj na istraživanja u oblasti imunologije, od izučavanja bazičnih koncepcija urođenog imunskog odgovora do povezivanja kompleksnih interakcija između mehanizama urođenog i adaptivnog imuniteta i njihovih uloga kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima. Istraživači koji su otkrili TLR i njihove biološke funkcije su nosioci Nobelove nagrade. Dobijanju prestižnog laureata prethodila su veoma značajna otkrića koja su postavila fundamentalne postavke u imunologiji.

Najpre je još 1989 godine Charles Janeway pretpostavio da postoji grupa receptora koje proizvode urođene imunske ćelije, a čija je primarna uloga identifikacija konzerviranih struktura mikrobnog porekla. Pet godina nakon toga, i Polly Matzinger je iznela "Teoriju opasnosti" prema kojoj oštećena ili pod stresom ćelija oslobađa "signale opasnosti" koje imunski sistem prepoznaje. Prema ovoj teoriji, oštećene ćelije emituju signale koji upozoravaju imunski sistem na postojanje problema za koje je neophodna aktivacija imunskih mehanizama (Amarante-Mendes et al., 2018). Ova naučna saznanja osnova su današnjeg znanja o bazičnim biološkim funkcijama receptora sličnih Toll-u zasnovanih upravo na interakciji sa konzerviranim molekulskim strukturama patogena, kao i interakciji sa endogenim molekulima oštećenja.

Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu dobili su istraživači Christiane Nüsslein-Volhard, 1995. godine za otkriće Toll gena u *Drosophili melanogaster*, i Jules Hofman i Bruce Beutler, 2011. godine koji su pokazali da su Toll kod *D. melanogaster* i TLR kod sisara uključeni u antifungalni i urođeni imunski odgovor (Otero, 2012).

Do danas je identifikovano 10 TLR kod ljudi (TLR1–10). TLR se takođe eksprimiraju kod drugih sisara, od kojih svaka ima skup TLR-a prilagođenih da prepoznaju specifične patogene relevantne za vrstu i imunski sistem tog organizma. Kod miševa je do sada otkriveno 12 različitih TLR (TLR1-9, TLR11-13) (Sameer & Nissar, 2021).

### 1.2.2. Ligandi receptora sličnih Toll-u

U zavisnosti od ćelijske lokalizacije i liganada, TLR se dele na dve grupe:

#### 1. Membranski TLR

Grupu membranskih TLR čine TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i slabo istražen TLR10.

Ovi receptori su lokalizovani na ćelijskim membranama i stoga se i nazivaju membranski TLR. Brojni PAMPovi specifični za membranske TLR uključuju lipoproteine (heterodimer TLR2 sa TLR1 ili TLR6), peptidoglikane, lipoteihoičnu kiselinu i zimosan (TLR2), lipopolisaharide (TLR4), kao i bakterijski flagelin (TLR5) (Duan, Du, Xing, Wang, & Wang, 2022). Ligandi TLR10 homodimera su diacilovani lipoproteini, dok u heterodimernom obliku sa TLR2 kao koreceptorom ovaj TLR prepoznaje i lipopolisaharide (Fore, Indriputri, Mamutse, & Nugraha, 2020).

Pored konzerviranih struktura patogena, membranski TLR prepoznaju i endogene signale oštećenja poput proteina toplotnog šoka (TLR2, TLR2/6, TLR4), S100 proteine (TLR2, TLR4), kao i protein HMGB1 (TLR2). TLR2 i TLR4 takođe vezuju hijaluronan, dekorin i versikan (Roh & Sohn, 2018).

#### 2. Endozomalni TLR

TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 lokalizovani su na endolizozomima i osnovni ligandi su im molekulske strukture poreklom od internalizovanih patogena (Asami & Shimizu, 2021). Prepoznaju nukleinske kiseline patogena - virusnu dvolančanu RNK (engl. Double stranded RNA, dsRNA) (TLR3), virusnu ili bakterijsku jednolančanu RNK (engl. Single stranded RNA, ssRNA) (TLR7, TLR8), i CpG-bogatu nemetilovanu DNK (TLR9) (Asami & Shimizu, 2021; Duan et al., 2022).

Od endogeno nastalih molekula, ovi receptori prepoznaju katelicidine (TLR7, TLR8 i TLR9), kao i protein HMGB1 (TLR9) (Tabela 1) (Roh & Sohn, 2018).

**Tabela 1.** Receptori slični Toll-u i njihovi ligandi.

	<b>TLR</b>	<b>PAMP</b>	<b>DAMP</b>
<b>Membranski</b>	TLR1/2	triacilovani lipoproteini	/
	TLR2	peptidoglikani lipoteihoična kiselina zimosan	HSP-60,-70,-96, HMGB1, hijaluronan, S100 proteini, dekorin, versikan
	TLR2/6	diacilovani lipoproteini	HSP-60, fibronektin
	TLR4	lipopolisaharidi	HSP-70, tenascin-c, fibrinogen, hijaluronan, S100 proteini, hibronektin, hekorin, versikan
	TLR5	flagelin	/



	TLR2/10	lipopolisaharidi	/
<b>Endozomalni</b>	TLR3	dvolančana RNK	HMGB1
	TLR7	jednolančana RNK	katelicidin
	TLR8	jednolančana RNK	katelicidin
	TLR9	CpG motiv	HMGB1, katelicidin

### 1.2.3. Ekspresija receptora sličnih Toll-u

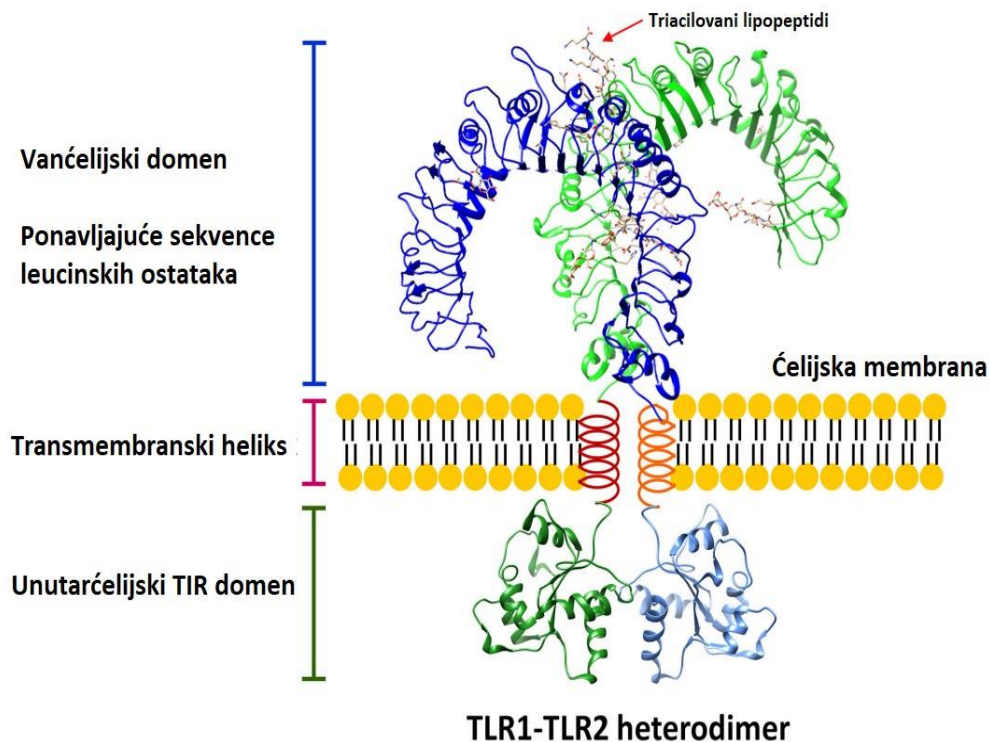
Poznato je da je ekspresija TLR najviša na ćelijama čija je osnovna funkcija posredovanje u mehanizmima imunskog odgovora. TLR se ekspimiraju na svim ćelijama urođenog imuniteta uključujući dendritske ćelije (DĆ), ćelije prirodne ubice (NK ćelije), monocite, makrofage i neutrofile. Takođe se ekspimiraju i na B i T limfocitima koji su glavni posrednici adaptivnog humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora (Duan et al., 2022). Međutim, proučavanja profila ekspresije različitih TLR pokazali su da se nivo njihove ekspresije razlikuje u zavisnosti od tipa ćelije. Na primer, mijeloidne dendritske ćelije (mDĆ) ekspimiraju TLR1, -2, -3, -5 i -6, dok plazmocitoidne dendritske ćelije (pDĆ) ekspimiraju TLR7 i TLR9 (Duan et al., 2022).

Što se tiče tkivne distribucije, TLR su široko ekspimirani u primarnim i sekundarnim limfoidnim organima, kao i asociranim tkivima koja funkcionišu po principu zasebnog, regionalnog imunskog sistema. Među ćelijama koje nisu primarno uključene u osnovne mehanizme imunskog odgovora, značajna ekspresija TLR zabeležena je na fibroblastima, epitelnim i endotelnim ćelijama, kao i u skoro svim tkivima uključujući srce, jetru, debelo crevo, tanko crevo, pankreas, pluća, bubrege, skeletne mišiće, mozak, jajnike, placentu, testise i prostatu (El-Zayat, Sibaii, & Mannaa, 2019).

### 1.2.4. Građa receptora sličnih Toll-u

TLR pripadaju porodici transmembranskih glikoproteina koji imaju modularnu strukturu. Domenska organizacija osnovnih struktura omogućava ovim receptorima odgovor na širok spektar mikrobnih komponenti, doprinoseći brzom prepoznavanju i odbrani od patogena. Svaki od ovih domena ima specifičnu funkciju (Botos, Segal, & Davies, 2011). Izgrađeni su od tri strukturalna domena:

1. vanćelijskog domena (engl. Extracellular domain, ECD)
2. transmembranskog domena
3. intracelularnog Toll-like/interleukin-1 (IL-1) receptorskog (TIR) domena (Slika 4).



**Slika 4.** Reprezentativna struktura i domenska organizacija TLR-a. Preuzeto i modifikovano iz Gao, Xiong, Li & Yang, 2017.

Vanćelijski domen prepoznaje molekulske obrasce. Izgrađen je od ponavljajućih sekvenci leucinskih ostataka koji čine motive bogate leucinom (engl. Leucine rich repeats, LRR). LRR grade specifičnu strukturu u obliku potkovice koja funkcioniše kao domen za vezivanje liganda. Ovi motivi omogućavaju prepoznavanje širokog spektra patogenih i odgovorni su za finu specifičnost različitih TLR prema različitim mikrobnim komponentama. Upravo raznovrsnost vanćelijskih domena TLR odražava prilagodljivost urođenog imunskog sistema u prepoznavanju širokog spektra mikrobnih obrazaca (Asami & Shimizu, 2021). Nakon vezivanja liganda dolazi do konformacionih promena u vanćelijskom domenu i do dimerizacije vanćelijskog domena TLR što je preduslov za dimerizaciju citosolnog TIR domena (Asami & Shimizu, 2021). Naredni koraci u aktivaciji podrazumevaju regrutovanje adapterskih proteina preko kojih se sprovode signali za aktivaciju faktora transkripcije (Botos et al., 2011).

Osnovna funkcija transmembranskog domena jeste povezivanje signala pokrenutih prepoznavanjem liganda od strane vanćelijskog domena sa kaskadom intracelularnih signala. Transmembranski domen je izgrađen od hidrofobnih aminokiselinskih ostataka koje imaju specifičnu funkciju usidranja TLR u membranu. Transmembranski domen omogućava prikazivanje vanćelijskog domena spoljašnjem okruženju radi interakcije sa ligandima. Sa druge strane, transmembranski domen takođe povezuje vanćelijski domen sa citoplazmatskim TIR domenom. Nakon vezivanja liganda za vanćelijski domen, konformacione promene u transmembranskom domenu se prenose na citoplazmatski TIR domen, što dovodi do pokretanja nizvodne signalne kaskade (Asami & Shimizu, 2021).

Citoplazmatski domen TLR-a se naziva Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domen zbog homologije sa signalnim domenima receptora IL-1 familije (Botos et al., 2011). TIR domen ima očuvanu trodimenzionalnu strukturu koju čini visoko očuvana BB petlja (Asami & Shimizu, 2021). Ovaj strukturni motiv je zajednički za sve članove superfamilije receptora Toll/IL-1 i neophodan je za posredovanje u interakcijama između proteina koji sadrže TIR domen (Singh et al., 2014). Aktivacija TIR domena nakon vezivanja liganda za vanćelijski domen dovodi do sprovođenja signala koji vode regrutovanju adapterskih proteina. TLR stupa u interakciju sa TIR domenima adapterskih proteina, kao što su MyD88 (engl. Myeloid differentiation primary response gene 88, primarni odgovor diferencijacije mijeloida 88) i TRIF (engl. TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) (Asami & Shimizu, 2021).

### 1.2.5. Signalizacija receptora sličnih Toll-u

Aktivacija TLR-a dovodi do pokretanja signalnih puteva koji vode proizvodnji inflamatornih citokina i drugih medijatora koji pomažu u eliminaciji patogena (Asami & Shimizu, 2021). TLR signalizacija dovodi do indukcije ili supresije gena koji su uključeni u inicijaciju, propagaciju i završetak zapaljenskog odgovora. Višestepeni proces koji obuhvata aktivaciju specifičnih proteina u kaskadi omogućava finu kontrolu inflamatornih medijatora koji su odgovor na stimulaciju TLR ligandima.

Specifični imunski odgovori na različite stimulse nastaju angažovanjem različitih adapterskih proteina koje članovi porodice TLR selektivno angažuju u signalizaciji. Postoji 5 adapterskih molekula koji posreduju u aktivaciji preklapajućih, ali različitih signalnih puteva (Y. Chen, Lin, Zhao, Ma, & Yi, 2021):

1. MyD88 (engl. Myeloid differentiation primary response 88),
2. TRIF (engl. TIR (Toll/IL-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing IFN  $\beta$ ),
3. TRAM (engl. TRIF-related adaptor molecule) i
4. TIRAP (engl. TIR-containing adaptor protein) (Y. Chen et al., 2021; Lannoy, Côté-Biron, Asselin, & Rivard, 2023).

Naravno, signalizacija sa TLR je strogo kontrolisana od strane različitih molekula čija je uloga sprečavanje prekomernih imunskih odgovora koji vode autoimunskim stanjima i zapaljenskim bolestima. Ovi molekuli se povezuju sa osnovnim adapterskim proteinima (MyD88 ili TRIF) kako bi sprečili njihovu interakciju sa TLR ili nizvodnim molekulima (Kawasaki & Kawai, 2014). Poseban aspekt kontrole signalizacije sa TLR čini kontrola od strane mikro RNK koje regulišu trajanje i intenzitet imunskih odgovora (Arenas-Padilla & Mata-Haro, 2018).

TLR signalni putevi su klasifikovani u dve kategorije zavisno od adapterskih proteina koji su uključeni u specifično sprovođenje signala nakon prepoznavanja liganda:

1. putevi zavisni od proteina MyD88 i
2. putevi nezavisni od MyD88 u čijoj signalizaciji učestvuje TRIF (Lannoy et al., 2023).

Signalizaciju zavisnu od MyD88 koriste skoro svi TLR - TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 i TLR10. Izuzetak je TLR3 čija se aktivnost obavlja uz pomoć TRIF adapterskog proteina. Za TLR4 je karakteristično da se njegova signalizacija može obavljati posredstvom oba navedena puta (Takeda & Akira, 2015).

#### 1.2.5.1. Signalni put zavisan od MyD88

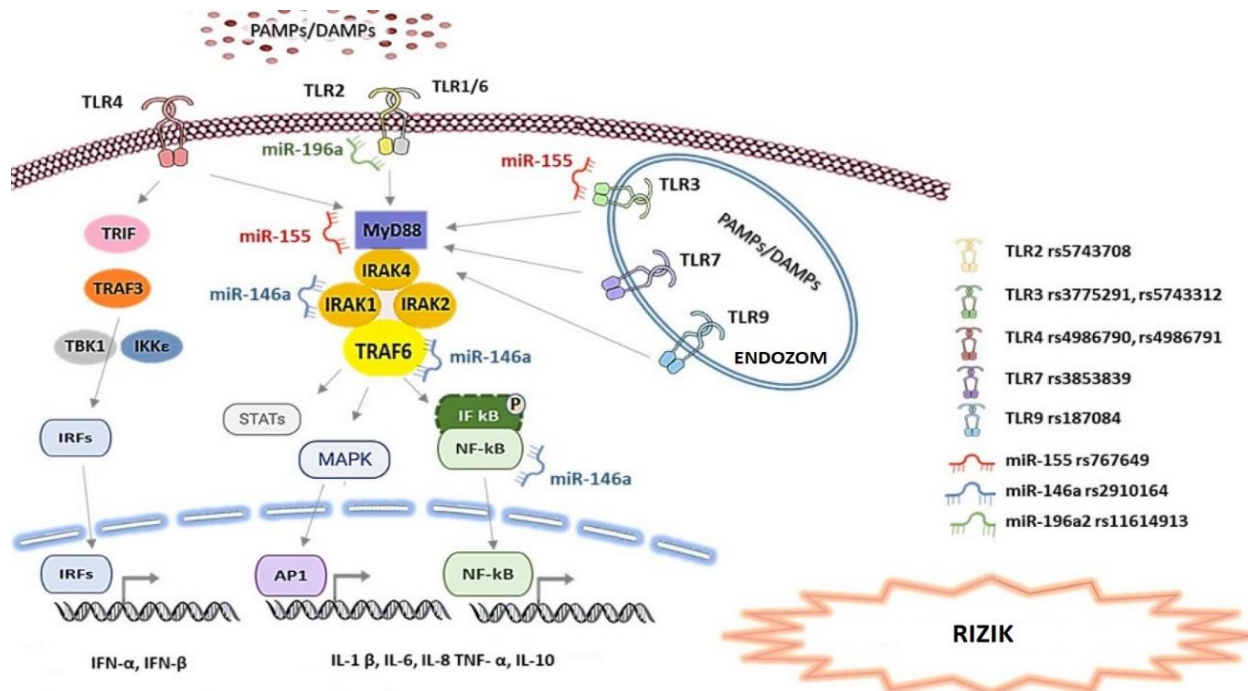
MyD88 je adapterski protein koji se sastoji iz dva domena, TIR domena i domena smrti (engl. Death domain, DD). Za MyD88 je karakteristično formiranje proteinskog kompleksa sa kinazama iz porodice kinaza povezanih sa interleukin-1 receptorom (engl. Interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK). Ovaj proteinski kompleks koji posreduje u signalizaciji sa MyD88 naziva se midozom (Duan et al., 2022). Aktivnost zavisna od MyD88 dovodi do aktivacije signalnih puteva MAP kinaze, NF- $\kappa$ B, i regulatornog faktora interferona (IRF) 5/7. Signalizacija posredstvom ovih puteva transdukcije signala dovodi do transkripcije gena za proinflamatorne citokine IL-1, IL-6 i INF $\alpha$ .

Nakon prepoznavanja liganda i TLR dimerizacije, MyD88 se vezuje za TIR domen odgovarajućeg TLR. Nakon toga, DD domen MyD88 stupa u interakciju sa DD domenom IRAK-4 i formira MyD88-IRAK-4 kompleks. Ovaj kompleks potom regrutuje IRAK-1 i IRAK-2. Dolazi do autofosforilacije kinaze IRAK1 i aktivacije TRAF6 (engl. TNF receptor-associated factor 6). TRAF6 katalizuje sintezu poliubikvitina na Lys63 na ciljnim proteinima, koji se vezuju za TAB2 i TAB3, regulatorne komponente TAK1 kinaznog kompleksa (K63), nakon čega dolazi do aktivacije TAK1. K63 poliubikvitinski lanci takođe se vezuju i za NEMO, regulatornu komponentu IKK kompleksa koji je neophodan za aktivaciju NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B je u mirovanju u citoplazmi vezan za inhibitorski faktor I $\kappa$ B. IKK kompleks posreduje u fosforilaciji i degradaciji I $\kappa$ B što omogućava translokaciju transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B u jedro i indukciju transkripcije gena koji kodiraju inflamatorne citokine. Pored toga, TAK-1 takođe može da aktivira c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK), MAPK i PI3K čija aktivacija dovodi do kaskade zapaljenskih odgovora (Duan et al., 2022; Takeda & Akira, 2015).

#### 1.2.5.2. Signalni put zavisan od TRIF

Put koji je nezavisan od adapterskog proteina Myd88 za signalizaciju koristi alternativni adapterski protein TRIF. TRIF adapter posreduje u MyD88 nezavisnoj indukciji IFN tipa I kroz aktivaciju transkripcionih faktora IRF3 i NF- $\kappa$ B. Signalizaciju posredstvom TRIF adaptera odlika je TLR3 i TLR4.

TRIF-zavisan put dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, IRF i aktivacionog proteina-1 (engl. Activator protein 1, AP-1). Nakon prepoznavanja liganda za TLR dolazi do regrutovanja TRIF-a. Naredni korak je aktivacija TBK1 i RIPK1 od strane TRIF-a. Signalni kompleks TRIF/TBK1 fosforiliše IRF3, omogućavajući njegovu translokaciju i proizvodnju IFN tipa 1, dok RIPK1 dovodi do transdukcije signala na isti način kao i put zavisan od MyD88 (Slika 5) (Takeda & Akira, 2015).



**Slika 5.** Shematski prikaz signalnih puteva posredovanih receptorima sličnim Tollu.

## 1.2.6. Članovi porodice receptora sličnih Toll-u

### 1.2.6.1. TLR2

TLR2 je membranski receptor urođenog imunskog sistema kodiran genom koji se nalazi na hromozomu 4q32. Za TLR2 je karakteristična sposobnost heterodimerizacije sa TLR1, TLR4, TLR6 i TLR10. Mogućnost formiranja heterodimera sa ko-receptorima ima evolutivni značaj, budući da povećavanje opsega patogenih struktura tj. liganada koje heterodimeri TLR receptora prepoznaju omogućava specijalizovani imunski odgovor na širi spektar mikroorganizama (Haehnel, Schwarzfischer, Fenton, & Rehli, 2002).

Među svim TLR-ovima, TLR2 prepoznaje najširi spektar bakterijskih produkata/strukture poput lipopeptida i peptidoglikana, složenih molekula velike molekulske mase različitog sastava koji se nalaze u ćelijskom zidu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. TLR2 takođe prepoznaje lipoteihoičnu kiselinu, sastojak ćelijske membrane gram-pozitivnih bakterija, kao i lipoarabinomanan, mikobakterijski glikolipid, i zimosan, nerastvorljivu polisaharidnu frakciju ćelijskog zida gljiva.

Osnovni ligandi TLR2 su acilovani bakterijski lipoproteini (Monie, 2017). Heterodimer TLR1/TLR2 detektuje triacilovane lipopeptide Gram-negativnih bakterija, dok heterodimer TLR2/6 detektuje diacilovane lipopeptide kao što je lipotehoična kiselina Gram-pozitivnih bakterija (Haehnel et al., 2002). Istraživanja na knock-out miševima su pokazala da sam TLR2, u odsustvu TLR1 ili TLR6 takođe vezuje lipopeptide (Oliveira-Nascimento, Massari, & Wetzler, 2012). TLR2 takođe ima sposobnost heterodimerizacije i sa TLR10, ali do sada funkcija ovog kompleksa nije utvrđena (Guan et al., 2010).

Pored molekularskih struktura patogena, TLR2 takođe detektuju i endogene molekule alarmine poput humanog  $\beta$ -defenzina, fragmenata hijaluronske kiseline, proteina toplotnog šoka i HMGB1 proteina (Oliveira-Nascimento et al., 2012). Za inicijaciju signalizacije sa TLR2 je specifična i aktivnost pomoćnog molekula CD36 koji vezuje ligande, transportuje ih na drugi pomoćni molekul, CD14, koji zatim ligand doprema do TLR1/TLR2 ili TLR2/TLR6 heterodimera (Jimenez-Dalmaroni et al., 2009).

Nakon vezivanja liganda, signalizacija sa TLR2 odvija se kao i kod većine TLR, intracelularnim signalnim putem koji zavisi od adapterskog proteina MyD88. Krajnji efekat TLR2 aktivnosti je aktivacija NF- $\kappa$ B, AP-1 i IRF 3/7 i posledična proizvodnja inflamatornih citokina (Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Diferencijalna ekspresija TLR2 u odgovoru na zapaljenske stimulse pokazana je u brojnim imunskim ćelijama, kao i u tkivu povezanom sa imunskim odgovorom. Pokazan je visok nivo ekspresije TLR2 u monocitima i granulocitima nakon stimulacije faktorom stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), lipopolisaharidom (LPS), IL-1 i IL-10, kao i smanjenje ekspresije nakon stimulacije sa IL-4, IFN- $\gamma$  i TNF. TLR2 se eksprimira i na aktiviranim B-ćelijama u germinativnim centrima limfnih čvorova i krajnika (Flo et al., 2001).

#### 1.2.6.2. TLR3

TLR3 spada u grupu unutarćelijskih TLR čiji ligandi su nukleinske kiseline patogena. Gen za TLR3 nalazi se na hromozomu 4 (4q35.1). Eksprimira se na endoplazmatičnom retikulumu, u lizozomima i endozomima. Osnovni ligand TLR3 je dvolančana RNK virusa. TLR3 takođe može da se aktivira i u prisustvu iRNK oslobođene iz nekrotičnih ćelija koja predstavljaju njegove endogene ligande (Means, 2011).

Specifičnost ovog receptora jeste da je od svih do sada poznatih TLR TLR3 jedini čija sposobnost indukcije proizvodnje IFN u potpunosti zavisi od TRIF-a, odnosno signalnog puta koji ne zavisi od aktivacije MyD88 (Takeda & Akira, 2015). Istraživanja pokazuju da MyD88 nema uticaja na TLR3 signalizaciju, ali da ovaj TLR može uticati na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine kroz interakciju sa drugim TLR-ovima koji koriste MyD88 za signalizaciju (Teixeira, Zhao, Kazmierski, Kinane, & Benakanakere, 2020). Rezultat aktivacije TLR3 je aktivacija IRF3 transkripcionog faktora i sinteza IFN tipa 1 kao i hemokina zavisnih od IFN- $\alpha$ , CCL5 i IL-6. Ekspresija TLR3 je regulisana IFN tip I pozitivnom povratnom spregom, što je izuzetno važan mehanizam antivirusnog imunskog odgovora (Miettinen, Sareneva, Julkunen, & Matikainen, 2001).

TLR3 je široko eksprimiran kod monocita, DĆ i NK ćelija (Sepehri et al., 2015). Za mDC karakteristično je prisustvo TLR3 u endozomima, dok je za makrofage i mastocyte pokazana TLR3 ekspresija kako u endozomima tako i na površini (Agier, Żelechowska, Kozłowska, & Brzezińska-Błaszczyk, 2016; Matsumoto, Oshiumi, & Seya, 2011; Soto et al., 2020). Kod profesionalnih APC, DĆ, TLR3 je visoko eksprimiran, ali pDC, koje ekspimiraju TLR7 i 9 i koje sekretuju visoke količine IFN $\alpha$  u odgovoru na prisustvo virusa ne ekspimiraju TLR3 (Matsumoto et al., 2011). Što se tkivne distribucije tiče, TLR3 ekspresija pokazuje nisku tkivno zavisnu specifičnost. Nizak nivo, ali konstitutivna ekspresija TLR3 je konstitutivno eksprimiran ipokazana je i u neuronima, astrocitima i mikrogliji gde učestvuje u odgovoru na viruse koji uzrokuju encefalomijelitis (Means, 2011).

Pored imunskih ćelija, TLR3 se takođe eksprimira u  $\beta$ -ćelijama pankreasa i adipocitima. Ovo pokazuje da bi izmenjena ekspresija ili funkcija TLR3, pored uloge u imunskim mehanizmima, mogla biti povezana sa homeostazom glukoze i metabolizmom lipida što stavlja ovaj receptor u centar pažnje u patogenezi zapaljenskih bolesti asociranih sa gojaznošću (Sepehri et al., 2015).

#### 1.2.6.3. TLR4

TLR4 je prvi TLR identifikovan kod ljudi. Kodiran je genom koji se nalazi na hromozomu 9q32–33. Osnovni ligand TLR4 je endotoksin LPS, komponenta spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija. LPS je izgrađen od oligosaharida i acilovanih zasićenih masnih kiselina (engl. Saturated fatty acid, SFA), koje i u slobodnoj formi predstavljaju jake TLR4 agoniste.

Svoje biološke aktivnosti TLR4 obavlja uz asistenciju idrugih pomoćnih molekula-LPS vezujućeg proteina (engl. Lypopolysaccharide binding protein, LBP), CD14, i mijeloidnog faktora diferencijacije 2 (engl. Myeloid differentiation factor 2, MD2). Ovi molekuli omogućavaju prepoznavanje i odgovor TLR4 na prisustvo liganda (Kim & Sears, 2010).

LPS se u početku vezuje za LBP, koji promovise vezivanje LPS-a za molekul CD14. Kada se LPS veže za CD14, LBP se sam disocira i LPS-CD14 kompleks se fizički povezuje sa TLR4. Za aktivnost TLR4 u odgovoru na LPS, neophodna je interakcija ovog TLR sa MD-2 za prepoznavanje LPS-a posredstvom njegovog vanćelijskog domena. Pokazano je da su TLR4/MD-2 kompleksi neophodni za odgovor na LPS, jer ni TLR4-deficijentni ni MD-2-deficijentni miševi ne reaguju na LPS (Patel, Buras, & Balasubramanyam, 2013). Iako CD14 nije neophodan za prepoznavanje LPS-a i pokretanje odgovora, ovaj molekul ima važnu ulogu jer povećava senzitivnost TLR4/MD-2 kompleksa za LPS (Akashi et al., 2003). Pored egzogenih PAMP-ova, TLR4 takođe vezuje endogene molekule kao što su HSP60, HSP70, S100A8/S100A9, HMGB1, fibrinogen i zasićene masne kiseline (Kim & Sears, 2010; Rogero & Calder, 2018).

Značajna ekspresija TLR4 zabeležena je u brojnim unutrašnjim organima poput debelog creva, pluća, jajnika i placente, sa vrlo visokom ekspresijom limfoidnom tkivu. Slezina, limfni čvorovi, tonzile i kostna srž odlikuju se visokom ekspresijom ovog TLR (Vaure & Liu, 2014). Od ćelija koje su uključene u mehanizme imunske odbrane, TLR4 ekspresija je zabeležena kod ćelija mijeloidnog porekla - DĆ, monociti i makrofagi (Rogero & Calder, 2018).

Aktivacija TLR4 ligandom pokreće sintezu proinflamatornih citokina, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i IL-1. Pored citokina, makrofagi oslobađaju čitav niz bioloških medijatora kao odgovor na LPS, uključujući faktor aktivacije trombocita (engl. Platelet activation factor, PAF), prostaglandine, enzime i reaktivne vrste kiseonika i azota, čija je uloga inhibiranje rasta i širenja patogena (Könner & Brüning, 2011). TLR4 u kompleksu sa TLR6 i receptorom CD86 stimuliše proinflamatorne aktivnosti makrofaga. Nakon vezivanja liganda, kao što je oksidovani LDL (oxLDL) ili amiloid- $\beta$ , kompleks TLR4/TLR6 dovodi do NF- $\kappa$ B zavisne kaskade CXCL1, CXCL2 i CCL9, preko MyD88 signalnog puta. Takođe dolazi do produkcije CCL5 citokina preko TICAM1 signalnog puta (Estruch et al., 2013).

#### 1.2.6.4. TLR7

TLR7 zajedno sa TLR3, -8 i -9, čini familiju intracelularnih senzora nukleinskih kiselina patogena. Ova 4 TLR sačinjavaju grupu takovanih antiviralnih TLR. TLR7 je kodiran genom na X hromozomu. Endozomalni je senzor jednolančane virusne RNK, a takođe su njegovi ligandi i analozi guanozina. Ovi ligandi dovode do indukcije Th1 imunskog odgovora posredovanog IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i IL-12 od strane DC i makrofaga koji usmeravaju Th1 diferencijaciju (Rezaei & Keshavarz-Fathi, 2019).

Ekspresija TLR7 je obično specifična za ćelije koje imaju primarnu ulogu u mehanizmima imunskog odgovora. Najviši nivo ekspresije zabeležen je na endozomalnoj membrani pDC. Takođe se visoka ekspresija ovog TLR detektuje i kod B ćelija, kako naivnim tako i kod memorijskih, kao i u monocitima i makrofagima (Spiering & de Vries, 2021). Niski nivoi TLR7 su takođe primećeni u neimunskim ćelijama kao što su hepatociti, epitelne ćelije i keratinociti (Petes, Odoardi, & Gee, 2017).

Nakon prepoznavanja liganda i aktivacije, TLR7 regrutuje univerzalni TLR adaptorski protein MyD88, regrutuju se IRAK kinaze i TRAF6 što vodi aktivaciji NF-kB. TLR7/MyD88 osa dovodi do jakog IFN- $\alpha$  odgovora (Hornung, Barchet, Schlee, & Hartmann, 2008).

Iako su TLR7 i TLR8 filogenetski i strukturno slični, pokazano je da ipak postoji funkcionalna razlika između ova dva TLR-a. Agonisti TLR7 i TLR8 se najpre razlikuju po selektivnosti ciljnih ćelija. Dodatno, ova dva TLR se razlikuju i po profilu indukcije citokina, što pravi razliku od značaja u efektorskom smislu. Aktivacija TLR7 primarno dovodi do odgovora povezanog sa proizvodnjom IFN- $\alpha$  i IFN-regulisanih citokina. Sa druge strane, TLR8 koji se je uključen u proizvodnju proinflamatornih citokina i hemokina kao što je TNF- $\alpha$ , IL-12 i MIP-1 $\alpha$  (Gorden et al., 2005). U pDC, TLR7 angažovanje izaziva snažnu proizvodnju IFN tipa I i ključno je za indukciju antivirusnog imunskog odgovora (Souyris et al., 2018). TLR7 je takođe esencijalna komponenta imunskog nadzora posredovanog antitelima na prisustvo endogenih retrovirusa (Kassiotis & Stoye, 2016).

#### 1.2.6.5. TLR9

Gen za TLR9 nalazi se na hromozomu 3p21.3. Iako je TLR9 u literaturi najčešće navođen kao unutarćelijski receptor za prepoznavanje molekularnih struktura patogena, pokazano je da se TLR9 može eksprimirati i na površini pojedinih imunskih ćelija poput neutrofila, B ćelija i eritrocita. Iako funkcija ovih površinskih TLR9 nije u potpunosti ispitana, smatra se da ovaj površinski forma ovog receptora funkcioniše kao homodimer ili u koordinaciji sa endozomalnim TLR9 kao heterodimerni receptor (Kou & Wang, 2023).

Osnovni ligandi TLR9 su nemetilovane sekvence citozin-guanin nukleotida (CpG) fragmenata DNK bakterija, virusa i gljiva. CpG DNK sekvence su u DNK molekulu patogena prisutne sa 20 puta većom frekvencijom nego kod sisara (Takeshita et al., 2001). TLR9 se takođe aktivira i u prisustvu sintetičkih oligonukleotida. Pristupi zasnovani na korišćenju agonista novije generacije i TLR9 signalizacije potencijalno predstavljaju koristan pristup u terapiji tumora, međutim TLR9 ima jak imunomodulatorni efekat i stoga je njegoa implementacija u terapijske protokole protiv agresivnih oboljenja značajno ograničena (Takeshita et al., 2001).

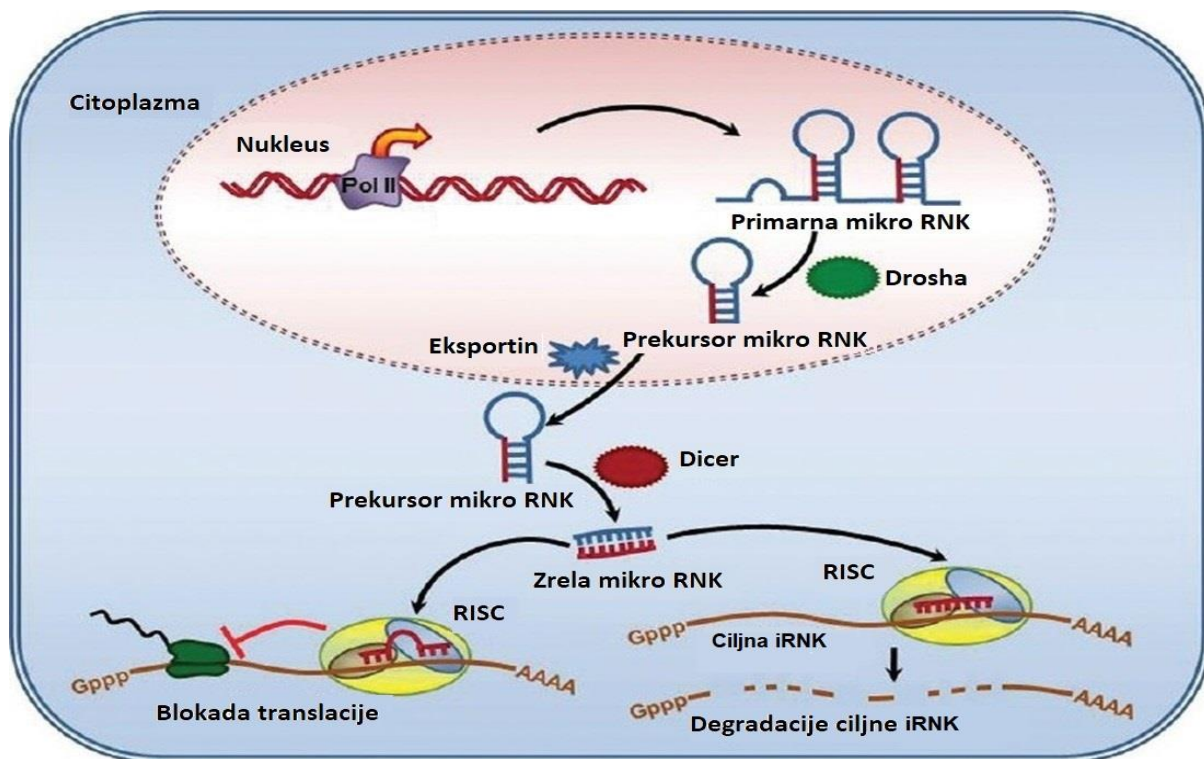


TLR9 je eksprimiran na različitim tipovima ćelija. TLR9 je konstitutivno eksprimiran na profesionalnim APC, pDC i makrofagima, kao i na B ćelijama (Kou & Wang, 2023). U kontekstu zapaljenskih i autoimunskih bolesti, naročito je bitno pokretanje TLR9 signalne kaskade nakon ćelijskog stresa ili oštećenja (Saber, Monir, Awad, Elsherbiny, & Zaki, 2022). Dostupni podaci ukazuju na to da je funkcija TLR9 signalizacije specifična u različitim zapaljenskim stanjima u zavisnosti od vrste stresa i tipa ćelije, jer su dobijeni nedosledni rezultati o ulozi ovog TLR u studijama o različitim patološkim stanjima poput zapaljenskih bolesti jetre (Hao, Zhong, Sun, & Zhou, 2021), tumoru poput glioma (Fehri, Ennaifer, Bel Haj Rhouma, Ardhaoui, & Boubaker, 2023), i virusnim infekcijama poput HPV infekcije (Douzandeh-Mobarrez, Kariminik, Kazemi Arababadi, & Kheirkhah, 2022).

Rezultat aktivacije TLR9 je produkcija IFN- $\alpha$  tipa I posredstvom aktivacije transkripcionog faktora IRF-7 (Takeshita et al., 2001). Aktivacija TLR9 posebno je značajna u smislu diferencijacije T pomoćničkih ćelija (engl. T helper cells, Th) jer pomaže signalizaciju koja usmerava Th ćelije ka Th1 liniji. Osnovni citokin Th1 linije jeste IFN $\gamma$ , čija signalizacija stimuliše pDC i vodi aktivaciji citotoksičnih T ćelija (Eckmann, 2004). Takođe, TLR9 signalizacija učestvuje u aktivaciji DC i makrofaga koji proizvode proinflamatorne citokine, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12, i pojačavaju površinsku ekspresiju MHC klase II i kostimulatora (Kumagai, Takeuchi, & Akira, 2008).

### 1.3. MIKRO RNK

Mikro RNK predstavljaju klasu visoko očuvanih malih nekodirajućih RNK prosečne dužine 22 nukleotida. Biogeneza mikro RNK podrazumeva transkripciju iz DNK sekvenci u primarne mikro RNK (pri-miRNK), obradu u prekursorske mikro RNK (pre-miRNK) i zrele mikro RNK. Najpre se dugački primarni transkripti pri-miRNK transkribuju iz DNK pomoću RNK polimeraze II. Ove pri-miRNK se zatim obrađuju od strane enzima zvanog Drosha i njegovog partnera, proteina DGCR8 (DiGeorge critical region 8 protein). Enzimskom obradom nastaje pre-miRNK koja se odlikuje specifičnom strukturom kraće ukosnice. Pre-miRNK zatim migrira u citoplazmu posredstvom eksportina preko nuklearnih pora. Enzimskom aktivnošću proteina Dicer u citoplazmi od pre-miRNK nastaje dvolančani RNK dupleks. Jedan lanac dupleksa, poznat kao vodeći lanac se usidrava sa proteinima iz Argonaut familije i čini mikro RNK-indukovani utišavajući kompleks (engl. microRNA-induced silencing complex, miRISC). Ovaj kompleks olakšava vezivanje vodećeg lanca za ciljnu iRNK. Kompleks miRNK-RISC se vezuje za 3' netranslirajući region (UTR) ciljnih iRNK komplementarnim sparivanjem baza. Ovom interakcijom omogućava se ostvarivanje biološke funkcije mikro RNK, odnosno supresija ekspresije ciljnog gena putem degradacije iRNK ili translacione represije (Slika 6) (Joshi, McLendon, Comer, & Gerthoffer, 2011; Medley, Panzade, & Zinovyeva, 2021).



**Slika 6.** Osnovni principi biološke aktivnosti mikro RNK. Preuzeto i modifikovano iz Joshi et al., 2011.

Regulacija ekspresije gena ključnih za osnovne ćelijske procese uključujući proliferaciju ćelija, diferencijaciju, apoptozu i zapaljenske procese nalazi se pod strogom regulacijom brojnih mikro RNK (S.-C. Li et al., 2015). Kompleksna mreža medijatora mehanizama na nivou urođenog imuniteta, među kojima je i signalizacija sa TLR nalazi se pod kontrolom mikro RNK (X. He, Jing, & Cheng, 2014). Mikro RNK regulišu funkciju imunskih ćelija kako u urođenom tako i u adaptivnom imunitetu (Raisch, Darfeuille-Michaud, & Nguyen, 2013). Integrisana mreža mikro RNK i osnovnih imunskih medijatora određuju specifičan imunski odgovor koji je osnova za funkcionisanje u fiziološkim uslovima, kao i u razvoju različitih patoloških stanja poput autoimunskih bolesti, hroničnih zapaljenskih stanja i tumora (Bayraktar, Bertilaccio, & Calin, 2019). Mikro RNK imaju brojne uloge u regulaciji imunskog odgovora zbog svog plejotropnog dejstva na medijatore imunskih mehanizama, a smatra se da je potencijalni obim dejstva ovih molekula u regulaciji imunskih odgovora daleko veći nego što je do danas otkriveno.

Pokazano je da se uloge mikro RNK razlikuju u zavisnosti od patološkog stanja. Na primer, u tumoru u se mikro RNK mogu klasifikovati kao tumor supresori ili proonkogeni na osnovu njihove uključenosti u razvoj tumora. Međutim, stimulacija ekspresije onkogeni i supresija gena supresora ciljnog tumora mogu biti rezultat poremećaja u ekspresiji mikro RNK. Određene mikro RNK mogu funkcionisati na dva načina, pokazujući i proonkogeni i tumor supresorsku aktivnost, u zavisnosti od mikrookruženja tumora (99).

### 1.3.1. miR-196a-2

Postoje tri gena koja kodiraju miR-196. Gen za miR-196a-1 lociran je na hromozomu 17 (17k21.32) na mestu između HOXB9 i HOXB10 gena, a gen miR-196a-2 se nalazi u regionu između HOXC10 i HOXC9 na hromozomu 12 (12k13.13). Gen za miR-196b nalazi se u visoko evolutivno očuvanom regionu između HOXA9 i HOXA10 gena, na hromozomu 7 (7p15.2) (C. Chen, Zhang, Zhang, Weakley, & Yao, 2011). Smatra se da su meta delovanja miR-196 upravo HOX geni koji su glavni faktori transkripcije sa ključnom ulogom u embriogenezi, organogenezi i tumorogenezi (S.-C. Li et al., 2015). Putem regulacije HOX proteina, miR-196 ima potencijalnu ulogu u tumorima gde dolazi do disregulacije ekspresije HOX gena (Saito et al., 2013).

miR-196a-2 je uključen u regulaciju različitih aspekata imunskog odgovora i zapaljensku reakciju što sugerise da bi izmenjena aktivnost miR-196a-2 mogla doprineti aberantnoj aktivaciji imunskih ćelija i razvoju autoimunskih patologija i tumora. Najšire je ispitivana njegova uloga u malignoj transformaciji. Pokazano je da je jedna od meta dejstva miR-196a-2 aneksin-1, ključni apoptototski medijator, kao i p27Kip1, inhibitor ćelijskog ciklusa, što ga čini potencijalnim biomarkerom za brojne tumore (Ibrahim et al., 2019).

### 1.3.2. miR-146

Porodica miR-146 sastoji se od dva člana, mikro RNK označene kao miR-146a i mikro RNK označene miR-146b koje su kodirane genima na hromozomima 5 (5k33.3) i 10 (10k24.32). Međutim, iako se ove dve mikro RNK razlikuju samo u 2 nukleotida u 3' regionu, pokazano je da se svaka od ove dve forme odlikuje specifičnostima u vidu profila citokina uključenih u signalizaciju, kao i da svaka od njih može da ispoljava jedinstvene regulatorne funkcije (Labbaye & Testa, 2012).

Aberantna ekspresija ili funkcija miR-146 doprinosi incidenci i progresiji različitih imunoloških zapaljenskim bolesti. miR-146a je jedan od negativnih post-transkripcionih regulatora signalne transdukcije posredovane TLR signalizacijom u imunskim ćelijama (Olivieri et al., 2021). Uloga miR-146a u regulaciji brojnih aspekata patoloških poremećaja je generalno daleko više istražena u poređenju sa ulogama ostalih mikro RNK. Zbog pojedinačnih specifičnosti kao što su polimorfizmi gena i prirode samih oboljenja, ekspresija i regulatorna funkcija miR-146 se razlikuju, a raznolik obrazac ekspresije primećuje se u različitim poremećajima. miR-146a vrši regulatornu ulogu u zapaljenskom odgovoru dejstvom na diferencijaciju i funkcionisanje ćelija koje su inicijatori i posrednici kako urođenog tako i adaptivnog imunskog odgovora (Olivieri et al., 2021).

miR-146a je jedna od najpoznatijih mikro RNK uključenih u regulaciju imunskog odgovora i održavanje homeostaze. Ima regulatornu ulogu u limfocitima i DĆ (Testa, Pelosi, Castelli, & Labbaye, 2017). Što se tiče ekspresije u T limfocitima, miR-146a se retko eksprimira u naivnim T ćelijama, dok je povećana ekspresija registrovana u memorijskim T ćelijama, naročito nakon stimulacije (Labbaye & Testa, 2012). MiR-146a je prvo identifikovana kao mikro RNK koja je upregulisana kao odgovor na različite proinflamatorne stimuluse kao što su IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Taganov, Boldin, Chang, & Baltimore, 2006). Takođe je pokazano da miR-146a imaju ključnu ulogu i u procesu starenja izazvanim stresom (Olivieri et al., 2021). Pokazano je da nedostatak ekspresije miR-146a dovodi do reakcije makrofaga na LPS i dovodi do značajno

snažnijeg zapaljenskog odgovora koji se ogleda u povećanoj produkciji TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12. Za razliku od efekta koji ima na makrofage, za monocite je prijavljeno da povećana ekspresija miR-146a zapravo ima suprotne efekte gde dovodi do smanjenja zapaljenskog odgovora (Duroux-Richard, Robin, Peillex, & Apparailly, 2019).

miR-146 je i regulator B ćelijskog humoralnog imunskog odgovora budući da je visoko eksprimirana u T folikularnim ćelijama (Tfh) i germinativnim centrima folikula. miR-146a cilja ICOS, koji je kritičan regulator aktivacije i diferencijacije B ćelija. miR-146a i miR-146b zajedno koordinišu aktivnost folikula, obezbeđujući adekvatan humoralni imunski odgovor bez pokretanja neželjene autoimunske reakcije. Pokazano je da izmenjena funkcija miR-146a u B limfocitima vodi proizvodnji autoantitela visokog afiniteta i povećane incidence autoimunosti (Cho et al., 2018). Jedna od najvažnijih uloga, karakteristična i za miR-146a i za miR-146b jeste negativna regulacija NF- $\kappa$ B signalnog puta (Paterson & Kriegel, 2017).

Poseban aspekt različitih molekularnih mehanizama miR-146a u osnovnoj imunskoj signalizaciji koji su važni za održavanje homeostaze je njegoa povezanost sa regulatornim T limfocitima (Treg). miR-146a je neophodna za kontrolu IFN $\gamma$  posredovanog Th1 odgovora od strane Treg ćelija. Regulacija STAT1, ključnog transkripcionog faktora potrebnog za diferencijaciju Th1 efektorskih ćelija, posredovana miR-146a je neophodna za funkciju Treg u supresiji Th1 odgovora (Lu et al., 2010). Prekid imunološke tolerance koji je rezultat poremećene funkcije Treg-a i diferencijalna ekspresija miR-146a u Th1-Th2 ćelijama ukazuju na to da je miR-146a važan modulator autoimunskih procesa (Labbaye & Testa, 2012). Određeni optimalni opseg aktivacije STAT1 od strane miR-146a je važan za Treg-posredovanu kontrolu Th1 odgovora, budući da i nedostatak STAT1 i povećana aktivacija STAT1 u Treg ćelijama dovode do poremećaja imunološke tolerance posredovane ovim ćelijama (Lu et al., 2010).

### 1.3.3. miR-155

Za adekvatnu reakciju imunskog sistema naophodan je brz i svrsishodan imunski odgovor posredovan indukcijom transkripcije imunomodulatornih i efektorskih gena. Ekspresija miR-155 u monocitima, makrofagima i DC je inducibilna u odgovoru na proinflamatorne citokinske signale (O'Connell, Taganov, Boldin, Cheng, & Baltimore, 2007). Diferencijacija, proliferacija i preživljavanje kako ovih mijeloidnih ćelija, tako i biogeneza krvnih ćelija fino je regulisana od strane ove mikro RNK (Kagele & O'Connell, 2015). Osnovni princip regulacije od strane miR-155 podrazumeva kontrolu inhibitora faktora koji stimulišu preživljavanje hematopoetskih ćelija. Mete delovanja miR-155 su tri osnovna puta signalne transdukcije – Akt, NF- $\kappa$ B i IFN tip 1. Aktivacijom SHIP-1 proteina koji deluje na PI3K, miR-155 inhibira Akt signalni put čija je glavna uloga stimulacija proliferacije ćelija. miR-155 reguliše i NF- $\kappa$ B signalizaciju i proinflamatorni put zavisian od MyD88, kao i signalne puteve IFN Tip 1 posredstvom uticaja na supresor citokinske signalizacije 1 (engl. Suppressor of cytokine signalling 1, SOCS1) (Kagele & O'Connell, 2015).

Interakcija miR-146 i miR-155 u NF- $\kappa$ B signalizaciji reguliše intenzitet i trajanje zapaljenskog procesa gde miR-155 deluje kao pozitivan regulator, dok miR-146a deluje kao negativan regulator. Ova kontrola zapaljenskog procesa uključuje aktiviranje IKK signalozoma, formiranje pozitivne povratne sprege i inhibiranje aktivnosti NF- $\kappa$ B, što dovodi do rezolucije zapaljenskog procesa (Mahesh & Biswas, 2019).

## 1.4. Retinoidni X receptor

Retinoidni X receptor (RXR) pripada superfamiliji nuklearnih receptora (NR), transkripcionih faktora čija aktivacija zavisi od vezivanja liganada. Pored RXR, u grupu NR koju čini 48 članova, spadaju i receptor za vitamin D (engl. Vitamin D receptor, VDR), receptor retinoične kiseline (engl. Retinoic acid receptor, RAR), receptor za tiroidne hormone (engl. Tyroid receptor, TR), estrogene (engl. Estrogen receptor, ER) i glukokortikoide (engl. Glukocorticoid receptor, GR) (le Maire, Teyssier, Balaguer, Bourguet, & Germain, 2019).

Postoje tri izoforme RXR – RXR $\alpha$  (NR2B1), RXR $\beta$  (NR2B2) i RXR $\gamma$  (NR2B3), kodirane različitim genima (9k34.3, 6p21.1-3 i 1k22-23). Funkcije ove tri izoforme se preklapaju u određenom opsegu (Krężel, Rühl, & de Lera, 2019). Svaka od izoformi odlikuje se specifičnim obrascem ekspresije u različitim tkivima, ali je najmanje jedna izoforma RXR ekspimirana u svakom tipu ljudskog tkiva (B. Li, Cai, & Boyer, 2021). Postoje četiri subtipa RXR $\alpha$  izoforme, pri čemu je RXR $\alpha$ 1 glavni izotip u većini tkiva, a RXR $\alpha$ 2 i RXR $\alpha$ 3 su specifični samo za tkivo testisa (S. Sharma et al., 2022). Široka zastupljenost ovih NR ukazuje na to da su RXR verovatno uključeni u koordinaciju fundamentalnih fizioloških procesa u različitim organskim sistemima i da je signalizacija sa RXR deo mreže brojnih interakcija i signalizacija drugih NR.

### 1.4.1. Građa retinoidnog X receptora

Kao i ostali članovi porodice nuklearnih receptora, i RXR se odlikuje modularnom strukturom. Izgrađen je od nekoliko domena od kojih svaki obavlja specifičnu funkciju. Osnovnu strukturu RXR čine tri domena: N-terminalni aktivacioni domen (engl. Activation functions, AF), centralni DNK-vezujući domen (engl. DNK-binding domain, DBD) i C-terminalni domen za vezivanje liganda (engl. Ligand binding pocket, LBD) (Hiebl, Ladurner, Latkolik, & Dirsch, 2018; S. Sharma et al., 2022). RXR ima dva aktivaciona domena čija aktivnost se razlikuje u zavisnosti od toga da li je za sprovođenje signala neophodno vezivanje liganda. AF-1 je ligand-nezavisni domen koji posreduju u modulaciji ekspresije gena od interesa (Wärnmark, Treuter, Wright, & Gustafsson, 2003). DBD je visoko očuvan DNK vezujući region koji stupa u interakciju sa specifičnim DNK sekvencama (engl. Retinoic acid response elements, RARE) i posreduje u dimerizaciji receptora. Između DBD i LBD domena nalazi se i region šarke koji posreduje u komunikaciji između ova dva domena i omogućava fleksibilnost LBD regionu (le Maire et al., 2019). U okviru C terminalnog dela LBD nalazi se AF-2 domen čija je funkcija zavisna od liganda. Ovaj deo RXR-a reguliše aktivaciju transkripcije ciljnih gena posredstvom interakcije koaktivatora (CoA) ili korepresora (CoR) sa AF-2 sekvencom. LBD posreduje u interakciji sa LBD domenima drugih nuklearnih receptora (Hiebl et al., 2018; S. Sharma et al., 2022).

### 1.4.2. Signalizacija retinoidnog X receptora

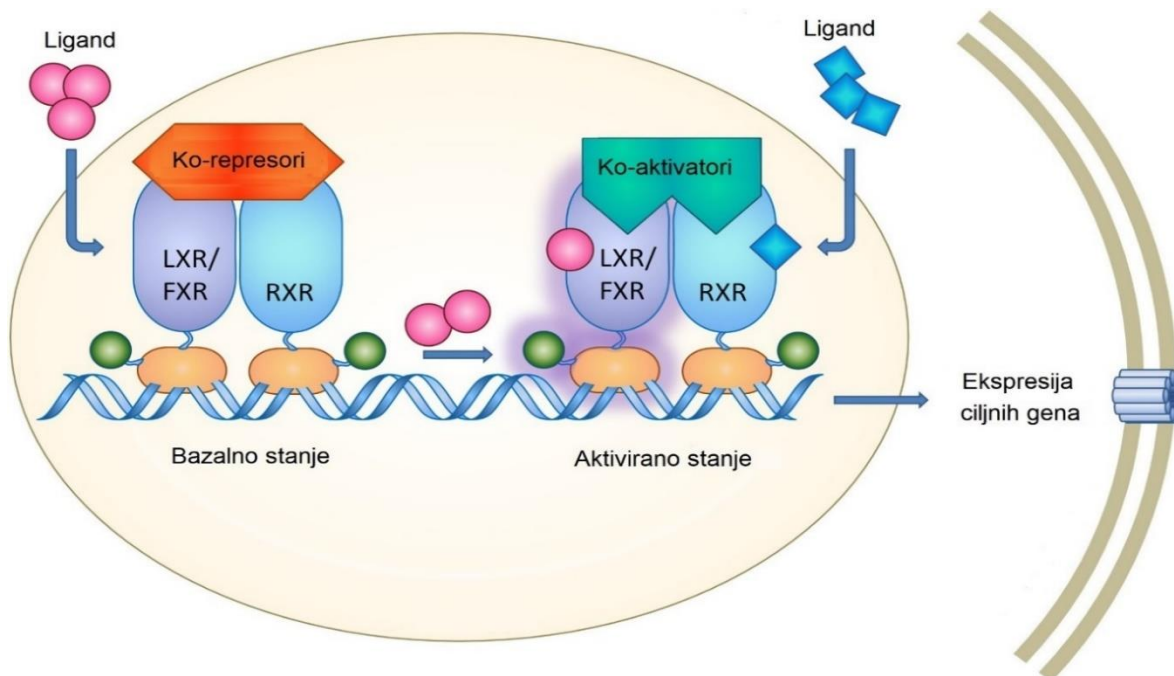
RXR ispoljava svoju biološku aktivnost vezivanjem za specifične sekvence DNK u promotoru ciljnih gena (B. Li et al., 2021). Jedinstvenost ovog NR i kompleksnost njegove signalizacije proizilazi iz raznovrsne prirode aktivacije ovog receptora. RXR može da ispoljava biološku aktivnost kao aktivni ili pasivni član heterodimernog kompleksa, u zavisnosti od toga da li ga njegov ligand ili ligand njegovog heterodimernog partnera aktivira.

RXR stvaraju komplekse dimera sa hormonskim receptorima kao što su TR, VDR i RAR; metaboliti ili receptori lekova kao što su receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma (engl. Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR), X receptor jetre (engl. Liver X receptor, LXR) i farnesoidni X receptor (FXR) (Tabela 2.) (Krężel et al., 2019). Takođe, ovaj specifični receptor funkcioniše i kao homodimer i deluje samostalno (Evans & Mangelsdorf, 2014).

**Tabela 2.** Nuklearni receptori koji stupaju u heterodimerizacioni kompleks sa RXR.

Nuklearni receptor		Ligand
Receptor za retinoičnu kiselinu $\alpha$	RAR $\alpha$	All-trans retinoična kiselina
Receptor za retinoičnu kiselinu $\beta$	RAR $\beta$	
Receptor za retinoičnu kiselinu $\gamma$	RAR $\gamma$	
Farnesoidni X receptor	FXR	Holna i deoksiholna kiselina
$\alpha$ X receptor jetre	LXR $\alpha$	Oksisteroli
$\beta$ X receptor jetre	LXR $\beta$	
Receptor za vitamin D	VDR	Kalcitriol
Tiroidni hormonski receptor $\alpha$	TR $\alpha$	Trijodotironin (T3)
Tiroidni hormonski receptor $\beta$	TR $\beta$	
Receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma $\alpha$	PPAR $\alpha$	Arahidonska kiselina
Receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma $\beta/\delta$	PPAR $\beta/\delta$	Linolna kiselina
Receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma $\gamma$	PPAR $\gamma$	Masne kiseline Prostaglandin J2 (PGJ2)
Receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma $\delta$	PPAR $\delta$	

RXR se vezuje za specifične sekvence DNK koje se zovu elementi odgovora (engl. Response element, RE) i najčešće heterodimerizuje sa nekim od nuklearnih receptora-partnera. U bazalnom stanju je ekspresija gena od interesa potisnuta jer su korepresori vezani za kompleks heterodimera RXR/NR. Transkripciona regulacija od strane NR zahteva aktivnost intermedijernih faktora, koji se nazivaju koregulatori. Nakon prepoznavanja liganda od strane samog RXR-a ili vezivanja liganda njegovog heterodimerizacionog partnera, dolazi do konformacione promene i aktivacije koregulatorskih proteinskih kompleksa. Aktivacija koaktivatora dovodi do remodelovanja hromatina i enzimske modifikacije histonskih repova. Kao posledica toga, kondenzovano transkripciono neaktivno stanje se transformiše u aktivirano dostupno stanje, što na kraju dovodi do transkripcije gena (Slika 7) (Hiebl et al., 2018; Wärnmark et al., 2003).



**Slika 7.** Mehanizam dejstva nuklearnih receptora. Preuzeto i modifikovano iz Hieblet al., 2018.

Aktivnost homo/heterodimernih RXR utiče na ekspresiju nekoliko gena esencijalnih za osnovne fiziološke procese kao što su ćelijski razvoj, diferencijacija i proliferacija (Hausler et al., 2013). Aberantna signalizacija  $\alpha$  izoforme RXR ima značajne efekte na različite ćelijske funkcije, uključujući metaboličke procese i homeostazu (de Almeida & Conda-Sheridan, 2019).

RXR $\alpha$ , zajedno sa brojnim nuklearnim receptorima, posreduje u ekspresiji više gena uključenih u inicijaciju, regulaciju i perpetuaciju zapaljenskog procesa (Núñez et al., 2010). Iako ne postoji mnogo podataka o ispitivanju ovog NR, u naučnoj literaturi dostupni su rezultati koji potvrđuju njegovu aktivnost pretežno u autoimunskim i zapaljenskim bolestima. Eksperiment na animalnom modelu sepse pokazao je da izmenjena RXR $\alpha$  signalizacija utiče na regrutovanje proinflamatornih medijatora na mesto infekcije (Núñez et al., 2010). RXR su takođe uključeni u uklanjanje apoptotskih ćelija i aktivaciju proinflamatornih makrofaga u sistemskom eritemskom lupusu (engl. Systemic lupus erithematosus, SLE) (Röszer, Menéndez-Gutiérrez, Cedenilla, & Ricote, 2013). Uloga ovog receptora ispitivana je i u dijabetesu, gde je pokazano da je uključen u regulaciju transkripcije gena povezanih sa razvojem adipocita, metabolizmom masti i insulina i inflamatornim putem posredovanim NF- $\kappa$ B (Pan, Guleria, Zhu, & Baker, 2014). Aberantna RXR signalizacija takođe utiče na neuroinflamatorne mreže i povezana je sa brojnim neuropatološkim bolestima, uključujući multiplu sklerozu, Alchajmerovu bolest i Parkinsonovu bolest (S. Sharma et al., 2022). Nedavna istraživanja ispitivala su i ulogu RXR u malignoj transformaciji, gde je pokazano da polimorfizmi nukleotidne sekvence (engl. Single nucleotide polymorphism, SNP) u genu RXR $\alpha$  mogu igrati značajnu ulogu u nastanku nekoliko maligniteta (Mostowska, Sajdak, Pawlik, Lianeri, & Jagodzinski, 2016).

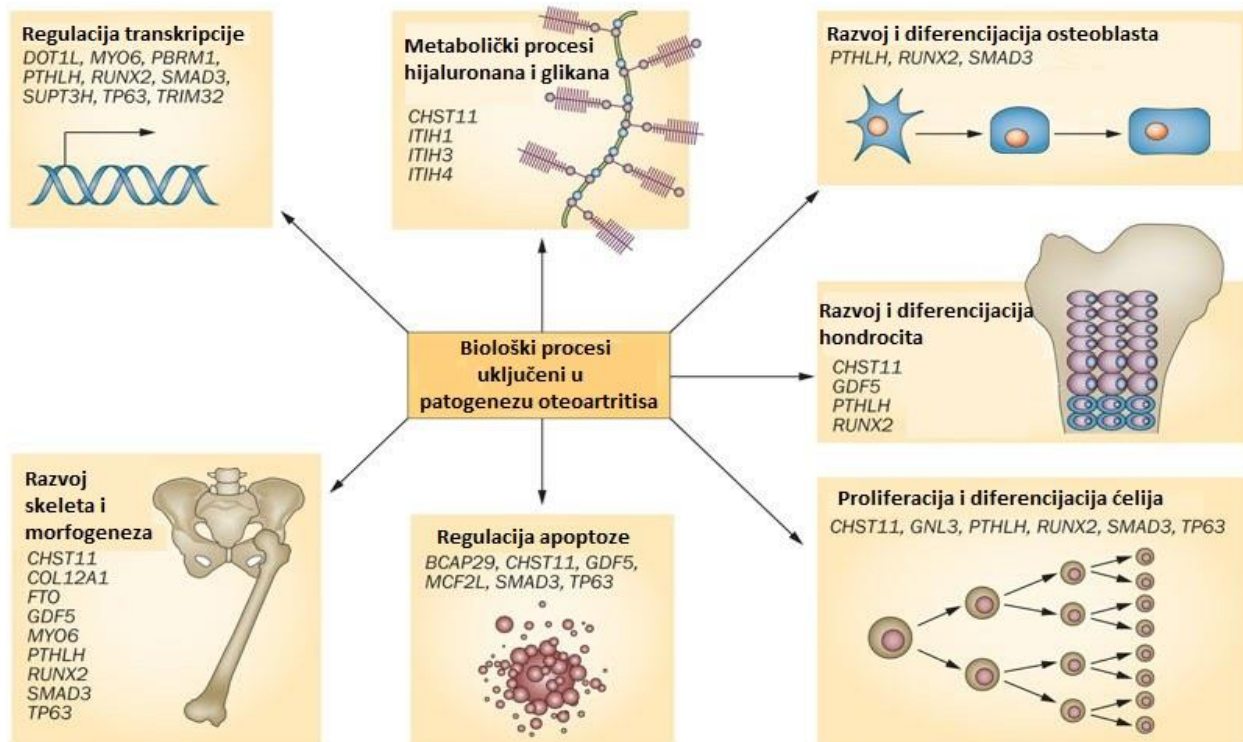
## 1.5. GENETIKA I OSTEOARTRITIS

Molekularno-genetička istraživanja multifaktorijalnih ljudskih bolesti pružaju nam uvid u fundamentalne aspekte patoloških mehanizama bolesti, identifikujući gene od interesa čija bi modifikacija mogla da predstavlja osnov bioloških terapija u budućnosti. Mapiranje alela pojedinačnih varijanti gena kod kontrolnih ispitanika i obolelih od bolesti od interesa predstavlja osnovu studija koje proučavaju genetičku pozadinu patoloških stanja (engl. Genome wide associations studies, GWAS) (Aubourg, Rice, Bruce-Wootton, & Loughlin, 2022). GWAS daje uvid u genetičke činioce koji koreliraju i pokazuju statistički značajnu povezanost sa karakteristikama bolesti kod različitih populacija. Rezultati GWAS-a imaju veoma važnu primenu u zaključivanju potencijalnih uzročno-posledičnih veza između faktora rizika i nastanka, ali i progresije i ishoda bolesti. Kombinovanje podataka GWAS-a sa drugim tipovima podataka, kao što su ekspresija gena i epigenetski podaci, može pružiti sveobuhvatnije razumevanje mehanizama bolesti. Poseban interes GWAS u budućnosti nosi procena predviđanja rizika za pojavu određenog oboljenja koja su generalno izazov za kliničare. Najčešće proučavane genetske varijante u GWAS su SNP (Uffelmann et al., 2021). Naravno, definisanje genetskih okvira multifaktorijalni bolesti veoma je zahtevno zbog interakcije brojnih genetskih i epigenetskih mehanizama koji definišu predispoziciju, ali i mehanizme progresije, a samim tim i ishod patoloških procesa.

Pokazano je da genetika igra ulogu u povećanju rizika za nastanak OA, ali OA sam po sebi kao oboljenje nije nasledan. Od OA može da oboli više članova iste porodice, ali bolest može zahvatiti različite zglobove članova iste porodice. Takođe, tok bolesti u smislu progresije bolesti se obično razlikuje među članovima iste porodice, kao i vreme javljanja prvih simptoma. Ne postoji jedan specifičan izdvojen gen koji povećava rizik od razvoja OA, već brojni geni zajedno sa raznovrsnim faktorima kao što su gojaznost, povrede i hormonski status doprinose nastanku i progresiji OA.

OA je klasičan primer poligenetskog oboljenja u čijim patološkim mehanizmima doprinos daju pojedinačni aleli rizika koji zasebno ostvaruju neznatan uticaj na razvoj oboljenja (Aubourg et al., 2022). Istraživanja sugerišu da nekoliko grupa gena može povećati rizik od razvoja OA. Najveći broj gena povezan je sa mišićno-skeletnim procesima, kao što su formiranje i diferencijacija hondrocita, uključujući gene koji kodiraju strukturne proteine vanćelijskog matriksa hrskavice i učestvuju u metabolizmu tkiva hrskavice. GDF5 gen je ključan za hondrogenezu, proliferaciju hondrocita i rast kostiju. PTHLH reguliše diferencijaciju hondrocita i endohondralnu osifikaciju. RUNX2 je ključni regulator transkripcije uključen u endohondralnu osifikaciju i diferencijaciju osteoblasta. SMAD3 je uključen u proliferaciju hondrocita, diferencijaciju i mineralizaciju matriksa. CHST11 kodira enzim koji prenosi sulfatne grupe na hondroitin, formirajući glikoprotein agrekan hrskavice. TP63 je ključan za diferencijaciju ćelija i održavanje matičnih ćelija. Takođe su i geni koji su uključeni u razvoj i diferencijaciju osteoblasta i geni za mineralnu gustinu kostiju dovedeni u vezu sa OA. Brojne varijante ovih gena su takođe povezane sa drugim karakteristikama skeleta poput varijanti gena DOT1L koje su povezane sa suženjem globalnog prostora (Slika 8) (Reynard & Loughlin, 2013; Yucesoy, Charles, Baker, & Burchfiel, 2015). Dokazana je i veza između zapaljenskog procesa i patološke mineralizacije u OA, gde ključnu ulogu ima LEF1. Odsustvo LEF1 smanjuje proinflamatornu NF-kB signalizaciju, predstavlja zaštitni faktor od ektopične mineralizacije i promovise hondrogenezu i sintezu vanćelijskog matriksa (Knights, Redding, & Maerz, 2023).



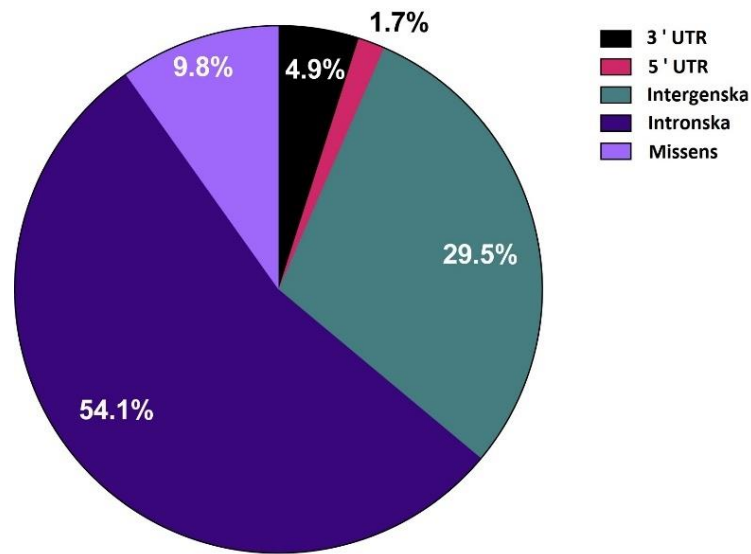


**Slika 8.** Shematski prikaz gena koji su povezani sa predispozicijom za razvoj OA. Preuzeto i modifikovano iz Reynard & Loughlin, 2013.

Transkripcioni faktori kao što su KLF2 i KLF4 regulišu ekspresiju gena u cilju kontrole zapaljenske reakcije i posledičnih procesa. Ovi transkripcioni faktori regulišu osnovne gene uključene u metabolizam hrskavice i vanćelijskog matriksa poput SOX9 i COL2A1. Supresijom inflamatornih i kataboličkih gena iNOS, IL-6 i MMP13, KLF2 i KLF4 štite tkiva konstituentata zgloba od nekontrolisane upale i degradacije vanćelijskog matriksa (Knights et al., 2023).

Mnoge GWAS su pokazale povezanost varijacija gena koji kodiraju TLR i mikro RNK sa modifikacijama citokinskih profila, kao i sa pojavom, progresijom i ishodom bolesti povezanih sa zapaljenskim procesom. Nedavne studije pokazuju da polimorfizmi u genima koji su usko povezani sa zapaljenskom reakcijom mogu imati ulogu u nastanku patoloških stanja koja karakteriše hronična upala, uključujući između ostalih bolesti i OA. Pored toga, pokazno je i da RXR reguliše zapaljenski proces (Núñez et al., 2010), a takođe je uključen u metabolizam kalcijuma i kostiju, što ga usko povezuje sa oboljenjima zglobnog aparata (Ma et al., 2018).

Kod monogenih bolesti genetske varijacije mogu uticati na fenotip posredstvom dva glavna mehanizma: direktnim menjanjem proteina putem promena DNK koda i menjanjem regulacije ekspresije gena. Međutim, većina genskih varijanti povezanih sa OA koji je kompleksno poligeno oboljenje se nalazi u nekodirajućim oblastima genoma, dok se manje od 10% varijanti gena povezanih sa OA nalazi u regionu koji kodira protein (Slika 9) (Aubourg et al., 2022).



**Slika 9.** Genomske lokacije varijanti gena koje su dovedene u vezu sa OA. Preuzeto i modificirano iz Aubourg et al., 2021.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu pregleda literature postavljene su sledeće hipoteze:

1. Postoje razlike u učestalosti genotipova ispitivanih varijanti u genima za TLR, njihove regulatorne mikro RNK i RXR $\alpha$  kod kontrolnih ispitanika i ispitanika sa osteoartritisom.
2. Određeni genotipovi ispitivanih varijanti u genima za TLR, njihove regulatorne mikro RNK i RXR $\alpha$  mogu biti u vezi sa etiološkim faktorima, polom, godinama, indeksom telesne mase, menopauzom i pušenjem.
3. Određeni genotipovi ispitivanih varijanti u genima za TLR, njihove regulatorne mikro RNK i RXR $\alpha$  su u vezi sa kliničko-patološkim parametrima relevantnim za osteoartritis.
4. Određeni genotipovi ispitivanih varijanti u genima za TLR, njihove regulatorne mikro RNK i RXR $\alpha$  mogu predstavljati faktor rizika (ili imati protektivnu ulogu) u patogenezi osteoartritisa.

Za ispitivanje hipoteza postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja :

1. Ispitivanje povezanosti varijanti gena za TLR2 (rs5743708), TLR3 (rs3775291; rs5743312), TLR4 (rs4986790; rs4986791), TLR7 (rs3853839), TLR9 (rs187084), mikro RNK koje kontrolišu signalizaciju sa navedenih TLR-a (miR-196a-2 (rs11614913), miR-146a (rs2910164), miR-155 (rs767649) i RXR $\alpha$  (rs3118523; rs7864987) sa demografskim, etiološkim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa osteoartritisom.
2. Ispitivanje učestalosti genotipova varijanti gena za TLR2 (rs5743708), TLR3 (rs3775291; rs5743312), TLR4 (rs4986790; rs4986791), TLR7 (rs3853839), TLR9 (rs187084), mikro RNK koje su uključene u regulaciju signalizacije sa navedenih TLR-a (miR-196a-2 (rs11614913), miR-146a (rs2910164), miR-155 (rs767649) i RXR $\alpha$  (rs3118523; rs7864987) kod ispitanika sa osteoartritisom, kao i kod ispitanika kontrolne grupe.
3. Ispitivanje povezanosti varijanti gena za TLR2 (rs5743708), TLR3 (rs3775291; rs5743312), TLR4 (rs4986790; rs4986791), TLR7 (rs3853839), TLR9 (rs187084), TLR regulatornih mikro RNK (miR-196a-2 (rs11614913), miR-146a (rs2910164), miR-155 (rs767649) i RXR $\alpha$  (rs3118523; rs7864987) sa rizikom za razvoj osteoartritisa.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. ETIČKE SMERNICE**

Za sprovođenje studije dobijeno je odobrenje Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Srbija (br. 4/4/23). Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom i njenim kasnijim izmenama. Svi ispitanici dali su pristanak u pisanoj formi za učešće u studiji.

#### **3.2. STUDIJSKA POPULACIJA**

U studiju je bilo uključeno 95 pacijenta sa radiografski potvrđenom dijagnozom primarnog osteoartritisa koji su operativno lečeni na Klinici za ortopediju i traumatologiju VMA, Beograd, u periodu od 2015. do 2018. godine. Pacijenti su postoperativno praćeni na Klinici za ortopediju VMA. Podaci o demografskim i etiološkim parametrima su prikupljeni prilikom poseta anketiranjem od strane ordinirajućeg lekara, koji je takođe vršio kliničku evaluaciju i beležio podatke o kliničko-patološkim parametrima od značaja za sprovođenje studije. Relevantni klinički i patološki parametri koji se smatraju faktorima koji doprinose nastanku i razvoju osteoartritisa obuhvaćeni su ovom studijom su: fizička fizičku aktivnost, istorija istoriju povreda, porodična porodičnu anamneza, rana pojava OA i oticanje zglobova. Kod ispitanika ženskog pola prikupljeni su i podaci o menopauzi odnosno ranom ulasku u menopauzu.

Iz studije su isključeni pacijenti kojima je dijagnostikovao sekundarni OA nastao usled traume, operacije, urođenih malformacija, hormonskih/metaboličkih poremećaja, infekcija, gihta i reumatoidnog artritisa. Takođe su iz studije isključeni pacijenti sa istorijom maligniteta.

Kontrolnu grupu činilo je 104 zdravih osoba odgovarajuće polne i starosne distribucije. Kriterijumi za isključenje iz kontrolne grupe studije bili su klinički znaci OA ili druge sistemske zapaljenske bolesti, kao i anamneza maligniteta. Svi učesnici studije su bili poreklom sa teritorije Republike Srbije.

#### **3.3. IZOLACIJA DNK**

Izolacija DNK i genetička analiza je urađena u Odeljenju za molekularnu genetiku Instituta za medicinska istraživanja VMA.

Uzorci periferne krvi pacijenata sa OA i ispitanika kontrolne grupe sakupljeni su u epruvete sa antikoagulansom natrijum-citratom i skladišteni u zamrzivaču na -20 °C. Genomska DNK za analizu genotipa je izolovana iz prikupljenih uzoraka korišćenjem Extract Me Blood Kita za izolaciju genomske DNK iz zamrznutih uzoraka periferne krvi prema uputstvima proizvođača (Blirt, Gdanjsk, Poljska).

Najpre je sprovedena priprema uzoraka koji su bili zamrznuti. Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi u trajanju od dva sata, uzorci krvi u epruvetama su promešani mešanjem gore dole, a zatim se pristupilo radu. Svi reagensi neophodni za rad obezbeđeni su u kitu.

Prema protokolu proizvođača, u obeleženu sterilnu ependorficu je najpre dodato 200 µL periferne krvi. U narednom koraku sipano je 10 µL Proteinaze K i 200 µL Sol QB pufera u svaki uzorak. Uzorak sa dodatim supstratima je vorteksovan i inkubiran na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon isteka perioda inkubacije, dodato je 200 µL 96-100% etanola (Zorka Pharm,

Srbija), nakon čega je svaki pojedinačni uzorak vorteksovao. Dobijeni lizati su prebačeni u prethodno pripremljene obeležene radne kolonice sa kolekcijom tubom, nakon čega su centrifugirani pri brzini od 11000 x g u trajanju od 1 minut na sobnoj temperaturi. U narednom koraku u radnu kolonicu je dodato 500 µL Pufera za ispiranje broj 1, nakon čega je usledilo centrifugiranje pri brzini od 11000 x g u trajanju od 1 minut na sobnoj temperaturi. Sakupljena tečnost u kolekcijom tubicama radne kolonice je odbačena, a potom je kolonica vraćena na istu kolekcijonu tubicu. Na kolonicu je dodato 500 µL Pufera za ispiranje broj 2, nakon čega je sledilo centrifugiranje pri brzini od 11000 x g u trajanju od 1 minut na sobnoj temperaturi. Sakupljena tečnost u kolekcijom tubicama je odbačena, a potom je kolonica vraćena na istu kolekcijonu tubicu. U narednom koraku, uzorak je još jednom centrifugiran u cilju uklanjanja zaostataka Pufera za ispiranje broj 2 iz prethodnog koraka. Kolonica je potom izvađena iz kolekcijone tube i stavljena u obeleženu sterilnu ependorficu od 1,5 mL. Na svaku kolonicu je nanešeno 50 µL Pufera za eluciju. Nakon inkubacije sa elucijom puferom na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta prema uputstvu proizvođača, uzorci su centrifugirani pri brzini od 11000 x g u trajanju od 1 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, iskorišćena kolonica je odbačena, a eluat, odnosno genomski DNK u zapremini od 50 µL je izdvojen na dnu ependorfice.

Nakon izolacije, pristupilo se proveriti kvaliteta, koncentracije i čistoće dobijene genomski DNK. Potom je genomski DNK izolovan iz uzoraka periferne krvi ispitanika koji učestvuju u studiji čuvana na -20 °C do planirane genetičke analize.

### **3.4. PROVERA KVALITETA IZOLOVANE DNK**

Pre izvođenja PCR reakcije sprovodi se provera kvaliteta izolovane DNK. Kvalitet izolovane DNK je proveren horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu korišćenjem sistema Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL (Pharmacia Bitech, Sweden). Priprema agaroznog gela podrazumeva najpre pripremu pufera u kojem će se elektroforeza odvijati. Puferi za elektroforezu se prave kao koncentrovani rastvori koji se čuvaju na sobnoj temperaturi i koriste za pravljenje razblaženja. Elektroforeza na agaroznom gelu odigrava se u puferu Tris-Borna kiselina - EDTA (engl Tris-Boric acid-EDTA, TBE). Priprema 10 x TBE pufera podrazumeva rastvaranje 54 g suve supstance TRIS (Serva, Nemačka), 27,5 g suve supstance borne kiseline (Fisher Scientific, Belgija) i 2,934 g EDTA (Serva, Nemačka) u 500 mL destilovane vode. Za vožnju agaroznog gela u cilju provere kvaliteta izolovane DNK korišćen je 0,5 x TBE pufer koji je dobijen razblaženjem štoka 10 x TBE pufera (25 mL 10 x TBE pufera u 500 mL destilovane vode).

Dvopostotni agarozni gel dobijen je rastvaranjem 0,6 g agaroze u čvrstom stanju (Serva, Nemačka) u 30 mL 0,5 x TBE pufera. Rastvor je zagrevan na temperaturi višoj od 200 °C uz konstantno mešanje upotrebom magnetne mešalice, radi postizanja potpunog rastvaranja supstance. Nakon hlađenja pod mlazom vode do temperature od 50 °C - 60 °C, u tečan rastvor je dodato 1,5 µL etidijum bromida (Merck, Nemačka), i odmah zatim je rastvor sipan u prethodno pripremljene kadice za elektroforezu. U kadice za elektroforezu postavljeni su tzv. češljevi koji služe za pravljenje bunarića u gelu u koje se nanose uzorci. Gel je izliven u kadice za elektroforezu i ostavljen da polimeriše. Nakon hlađenja rastvora u kadicama za elektroforezu i polimerizacije, na mestu zubaca češljeva formirani su bunarići za nalivanje uzoraka. U svaki bunarić na gelu naliveno je 5 µL genomski DNK sa 2 µL boje. Boja koja se meša sa uzorkom dobija se mešanjem fikola (20%) i smesom dve boje (brom-fenol plavo 0,25% i ksilen-cijanolo 0,25%) i služi za povećanje gustine uzorka, kao i za praćenje kretanja uzorka tokom

elektroforeze. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 80V i jačini struje od 35 - 40 mA u vremenskom periodu od 30 minuta.

Za vizualizaciju i analizu uzoraka na gelu korišćen je UV transiluminator ECX-F20M Vilber Lourmat (Francuska). Etidijum bromid, agens koji je korišćen za vizualizaciju interkalira u molekul DNK, pod UV svetlošću transiluminatora fluorescira narandžastom bojom što omogućava detekciju DNK molekula. Ukoliko je izolovana genomska DNK intaktna na gelu se detektuje jasna traka, dok se u slučaju degradovane genomske DNK uočava razmaz (engl. smear). Elektroforeza na agaroznom gelu pokazala je da je iz svih uzoraka periferne krvi izolovana genomska DNK zadovoljavajućeg kvaliteta te se pristupilo merenju koncentracije i određivanju čistoće uzoraka.

### **3.5. PROVERA KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK**

Kontrola koncentracije i čistoće izolovane DNK je značajna radi prevencije inhibicije PCR reakcije, nespecifične amplifikacije i povećanja osetljivosti u cilju pouzdanosti rezultata genetskih analiza. Koncentracija i čistoća izolovane genomske DNK merene su spektrofotometrijskom metodom. Program Gen 5 spektrofotometra Epoch 2 BioTek (Agilent, SAD) je korišćen za merenje apsorbance uzoraka na 260 i 280 nm talasne dužine. Merenje uzoraka nukleinskih kiselina korišćenjem Take3 ploče i Gen5 softvera se postiže upotrebom analize Kvantifikacija nukleinskih kiselina. Princip rada spektrofotometra podrazumeva merenje koncentracije DNK iz male zapremine uzoraka (2  $\mu$ L) nanešene na označeno polje nosača korišćenjem talasnih dužina od 260 i 280 nm.

Vrednost apsorbance na 260 nm talasne dužine predstavlja apsorbancu DNK, dok vrednost apsorbance na 280 nm talasne dužine predstavlja apsorbancu proteina. Određivanjem odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm talasne dužine ( $R=A_{260}/A_{280}$ ) dobija se podatak o čistoći analiziranog uzorka. Zadovoljavajuća čistoća uzorka DNK za dalju analizu kreće se u opsegu 1,7-2,0. Vrednost odnosa apsorbanci značajno niži od 1,7 ukazuje na kontaminaciju proteinima ili drugim organskim jedinjenjima, dok odnos veći od 2,0 obično ukazuje na kontaminaciju sa RNK. Prema podacima dobijenim analizom, odnos R za analizirane uzorke genomske DNK je bio unutar navedenog opsega, što je pokazalo da je izolovana genomska DNK generalno čista i bez kontaminacije proteinima.

### **3.6. GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZAMA NUKLEOTIDNE SEKVENCE**

Alelska diskriminacija gena vršena je metodom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (engl. Real Time PCR) korišćenjem komercijalno dostupnih TaqMan eseja (TaqMan® SNPs Genotyping Assay). Studijom su obuhvaćene varijante gena za TLR2 (rs5743708), TLR3 (rs3775291; rs5743312), TLR4 (rs4986790; rs4986791), TLR7 (rs3853839), TLR9 (rs187084), kao i tri varijante gena za mikro RNK koje su uključene u regulaciju signalizacije sa navedenih TLR-a (miR-196a-2 (rs11614913), miR-146a (rs2910164), miR-155 (rs767649)) i dve varijante gena za RXR $\alpha$  (rs3118523; rs7864987). Detalji o analiziranim varijantama gena dati su u Tabeli 3.

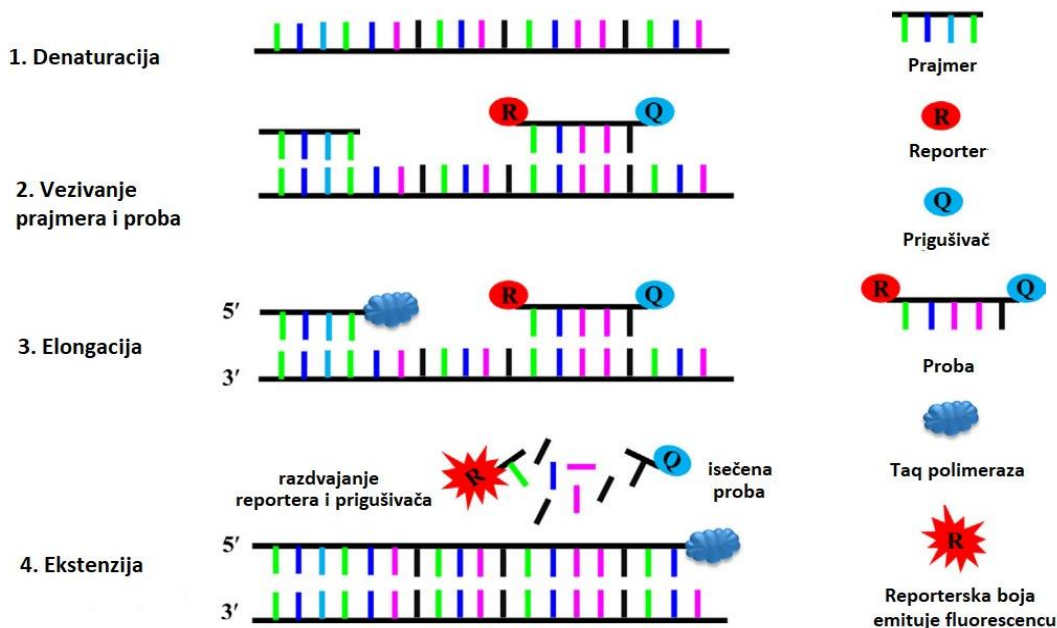
**Tabela 3.** Varijante gena analiziranih TaqMan® tehnologijom.

<b>Gen</b>	<b>Lokacija</b>	<b>rs broj</b>	<b>Izmena</b>	<b>Region</b>	<b>ID TaqMan esej</b>
<b>TLR2</b>	4q31.3	rs5743708	G2258A	Exon 3	C_27860663_10
<b>TLR3</b>	4q35.1	rs3775291	G13909A	Exon 4	C_1731425_10
		rs5743312	C9948T	Intron 3	C_447407_10
<b>TLR4</b>	9q33.1	rs4986790	A896G	Exon 3	C_11722238_20
		rs4986791	C1196T	Exon 3	C_11722237_20
<b>TLR7</b>	Xp22.2	rs3853839	C > G	3' UTR	C_2259573_10
<b>TLR9</b>	3p21.2	rs187084	A > G	Promoter	C_2301952_10
<b>miR-196a-2</b>	12q13.13	rs11614913	C > T	3' UTR	C_31185852_10
<b>miR-146a</b>	5q33.3	rs2910164	C > G	Promoter	C_15946974_10
<b>miR-155</b>	21q21.3	rs767649	A > T	Promoter	C_2212229_10
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	9q34.2	rs3118523	A > G	Intron 4	C_2002263_10
		rs7864987	T > C	Intron 1	C_28976210_20

Za Real Time PCR reakciju ukupne zapremine 20  $\mu$ L po uzorku korišćen je odgovarajući TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x), TaqMan® Universal PCR MasterMix (2x), sterilna destilovana voda i izolovana genomska DNK. Reakcija genotipizacije je izvođena u Applied Biosystems optičkim pločama od 96 bunarića prekrivenim Applied Biosystems optičkom adhezionom folijom.

Za alelsku diskriminaciju korišćeni su komercijalni TaqMan eseji koji pored odgovarajućih prajmera, sadrže i dve TaqMan probe za alelske forme od interesa koje se razlikuju u jednom nukleotidu. Ove probe su komplementarne sa ciljnom sekvencom DNK koja sadrži varijante gena od interesa. Svaka proba je dizajnirana tako da jedna specifično hibridizuje sa izvornim alelom, a druga proba pak sa izmenjenom formom odnosno mutiranim alelom. Nukleotid koji je specifičan za svaku od njih je komplementaran izvornom (engl. wild type, wt) ili mutiranom alelu. Na 5' kraju proba sadrži reporter koji emituje fluorescentnu boju, dok na 3' kraju ima prigušivač reporterske boje (engl. Quencher). U intaktnom stanju probe reporterska fluorescencija je suprimirana zbog blokade emisije fluorescence od strane prigušivača na 3' kraju. Nakon hibridizacije prajmera i proba sa ciljnom sekvencom, Taq polimeraza vrši polimerizaciju dodavanjem novih nukleotida iz smeše, ali takođe i iseca vezanu probu budući da poseduje i 5'-3' egzozonukleazno dejstvo. Dolazi do razdvajanja reporterske boje od prigušivača tj. do oslobađanja fluorescentne boje kojom je proba bila obeležena i emitovanja fluorescence (Slika 10) (Roy, Jain, Singh, Das, & Mallick, 2019).





**Slika 10.** Osnovni principi Real-time PCR TaqMan tehnologije. Preuzeto i modifikovano iz Roy, Jain, Singh, Das & Mallick, 2019

Različiti genotipovi pokazuju karakteristične obrasce fluorescence, omogućavajući precizno određivanje genotipa. Ukoliko je analizirani uzorak u homozigotnom stanju detektuje se samo jedan fluorescentni signal reporterske boje (FAM ili VIC). Fluorescentni signali obe reporterske boje detektuju se ukoliko uzorak ima heterozigotni genotip (Tabela 4).

**Tabela 4.** Korelacija između signala fluorescence i genotipa uzorka.

Fluorescentni signal	Genotip uzorka
VIC <sup>TM</sup>	Homozigot za alel 1
FAM <sup>TM</sup>	Homozigot za alel 2
VIC <sup>TM</sup> i FAM <sup>TM</sup>	Heterozigot alel 1/alel 2

Standardni protokol za genotipizaciju RealTime PCR-om i korišćenjem TaqMan reagenasa obuhvata tri ključna koraka-denaturaciju, hibridizaciju i ekstenziju. Najpre, pre otpočinjanja prvog od ukupno 45 ciklusa PCR reakcije, imamo korak inicijalne denaturacije molekula DNK matrice na 95 °C. Na početku svakog ciklusa takođe na 95 °C dolazi do denaturacije dvolančane DNK i narušavanja sekundarne strukture dobijene jednolančane DNK. Dolazi do hibridizacije prajmera i probe sa komplementarnom sekvencom matrice. U fazi elongacije koja se odvija na 60 °C kao optimalnoj za aktivnost Taq polimeraze vrši se polimerizacija DNK dodavanjem nukleotida, kao i hidroliza vezane probe jer Taq polimeraza ima i egzonukleazno dejstvo. Komponente reakcione smeše i temperaturni profil Real Time PCR reakcije prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Komponente reakcione smeše i temperaturni profil Real Time PCR reakcije.

Real Time PCR reakcija						
Komponente	Zapremina	Ukupna zapremina	Faza reakcije	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Genomska DNK	3 $\mu$ L	20 $\mu$ L	Inicijalna denaturacija	95 $^{\circ}$ C	10 minuta	1
TaqMan® Universal PCR MasterMix (2x)	10 $\mu$ L		Denaturacija	95 $^{\circ}$ C	15 sekundi	45
TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x)	2 $\mu$ L		Hibridizacija probe i elongacija	60 $^{\circ}$ C	1 minut	
Sterilna destilovana voda	5 $\mu$ L					

Rezultati PCR genotipizacije u realnom vremenu su analizirani korišćenjem softvera RT PCR SDS softvera, v. 3.2 (Applied Biosystems, SAD) koji omogućava određivanje genotipa uzorka na osnovu unapred definisanih kriterijuma i detekcije fluorescentnih kriva.

### 3.7. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička obrada dobijenih podataka urađena je pomoću softvera SPSS 20.0 (IBM Inc., Chicago, IL, SAD). Razlike u učestalosti genotipova između grupe obolelih od OA i kontrolne grupe, kao i povezanost ispitivanih varijanti gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama izračunate su korišćenjem Pirsonovog hi-kvadrat testa ( $\chi^2$ ) ili Fišerovog egzaktnog testa kada su dobijene učestalosti bile manje od 5%.

Povezanost između ispitivanih varijanti gena i rizika od OA ispitivana je korišćenjem logističke regresione analize prilagođene polu i starosti. Jačina povezanosti je procenjena korišćenjem odnosa šansi (engl. Odds ratio, OR) sa 95% intervalom poverenja (engl. Confidence interval, CI). Za proračun rizika od OA korišćen je recesivni genetički model (genotip izvornog tipa (wt) naspram kombinovanog heterozigotnog i mutiranog genotipa), dominantni model (wt i heterozigot naspram mutiranog genotipa) i aditivni genetički model analiziranih varijanti gena. Vrednosti p manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Studijsku grupu činilo je 199 ispitanika. Grupu ispitanika obolelih od OA činilo je 95 pacijenata sa klinički i radiografski potvrđenom dijagnozom primarnog osteoartritisisa čije je lečenje zahtevalo totalnu artroplastiku zgloba. Kontrolnu grupu sačinjavala su 104 zdrava pojedinca, odgovarajuće polne i starosne distribucije.

Hirurški lečeni pacijenti sa primarnim OA kuka činili su većinu grupe obolelih (64%). U studiju su bila uključena i 34 hirurški lečena pacijenta sa primarnim OA kolena (36%). Većinu pacijenata sa OA činile su osobe ženskog pola (63%), od kojih je 93 % (56 pacijentkinja) bilo u menopauzi. Prikupljanjem kliničkih podataka ustanovljeno je da je kod 27% žena koje su učestvovala u studiji zabeležena rana pojava menopauze. Prosečna starost ispitanika obolelih od primarnog OA bila je 69 godina, većinom slabo fizički aktivnih (79%) nepušača (82%). Prema skali telesne mase, indeks telesne mase većine ispitanika (81%) bio je u granicama normalne uhranjenosti. Kod 35% obolelih zabeležena je istorija povreda zgloba zahvaćenog OA. Otok obolelog zgloba zabeležen je kod nešto više od trećine ispitanika (34%). Odustvo postojanja porodične istorije obolevanja od OA zabeleženo je kod većine pacijenata (59%). Podaci o demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama relevantnim za OA nalaze se u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Demografske i kliničko-patološke karakteristike ispitanika sa OA.

Varijabla	OA		
	N=95	%	
Pol	muško	35	37
	žensko	60	63
Lokalizacija	kuk	61	64
	koleno	34	36
Starost (medijana)	<69	46	48
	>69	49	52
BMI	≤20	2	2
	20-25	77	81
	>26	16	17
Pušenje	Da	17	18
	Ne	78	82
Fizička aktivnost	Da	20	21
	Ne	75	79
Istorija povreda	Da	33	35
	Ne	62	65
Porodična istorija	Da	39	41
	Ne	56	59
Rana pojava OA	55	52	55
	55	43	45
Menopauza	Da	56	59
	Ne	4	41
Rana menopauza	Da	15	27
	Ne	41	73

Oticanje zglobova	Da	32	34
	Ne	63	66

OA-osteoartritis; BMI-Indeks telesne mase.

#### 4.2. POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA TLR SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA

Analiza povezanosti varijanti gena za TLR i demografskih, etioloških i kliničkih karakteristika pacijenata sa OA pokazala je značajnu povezanost varijante rs5743708 gena za TLR2 sa menopauzom ( $p=0,003$ ), kao i tendencija ka povezanosti iste varijante sa pušenjem ( $p=0,089$ ). Nije uočena povezanost niti jednog od ispitivanih parametara sa varijantama rs3775291 i rs5743312 u genu za TLR3 (Tabela 7).

**Tabela 7.** Povezanost varijanti gena za TLR2 i TLR3 sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama kod pacijenata sa OA.

Demografski/ faktori rizika	Broj ispitanika	TLR2		TLR3	
		rs5743708	rs3775291	rs5743312	
		GG/AG/AA	GG/GA/AA	CC/CT/TT	
Pol	Muško	35	26/8/1	14/20/1	21/14/0
	Žensko	60	40/20/0	21/36/3	39/19/2
	<i>p</i>		0,256	0,810	0,428
Lokalizacija	Kuk	61	42/18/1	24/36/1	38/21/2
	Koleno	34	24/10/0	11/20/3	22/12/0
	<i>p</i>		0,753	0,227	0,566
Godine (medijana)	<69	46	33/13/0	17/26/3	29/16/1
	>69	49	33/15/1	18/30/1	31/17/1
	<i>P</i>		0,592	0,543	0,999
BMI	≤20	2	1/1/0	1/1/0	2/0/0
	20-25	77	52/24/1	27/47/3	50/25/2
	>26	16	13/3/0	7/8/1	8/8/0
<i>p</i>		0,793	0,920	0,516	
Pušenje	Da	17	12/4/1	6/10/1	12/5/0
	Ne	78	54/24/0	29/46/3	48/28/2
	<i>p</i>		0,089	0,927	0,675
Fizička aktivnost	Da	20	17/3/0	8/11/1	15/5/0
	Ne	75	49/25/1	27/45/3	45/28/2
	<i>p</i>		0,229	0,917	0,409
Istorija povreda	Da	33	21/11/1	12/19/2	24/8/1
	Ne	62	45/17/0	23/37/2	36/25/1
	<i>p</i>		0,304	0,806	0,281
Porodična anamneza	Da	39	29/9/1	15/22/2	26/12/1
	Ne	56	37/19/0	20/34/2	34/21/1
	<i>p</i>		0,275	0,882	0,781
Rana pojava OA	<55	52	38/13/1	18/32/2	33/19/0
	>55	43	28/15/0	17/24/2	27/14/2
	<i>p</i>		0,402	0,851	0,283

Menopauza	Da	56	40/16/0	19/34/3	36/18/2
	Ne	4	0/4/0	2/2/0	3/1/0
	<i>p</i>		<b>0,003</b>	0,755	0,874
Rana menopauza	Da	15	11/4/0	5/10/0	7/8/0
	Ne	41	28/13/0	13/25/3	29/10/2
	<i>p</i>		0,716	0,558	0,101
Oticanje zgloba	Da	32	22/10/0	10/19/3	20/12/0
	Ne	63	44/18/1	25/37/1	40/21/2
	<i>p</i>		0,755	0,177	0,570

OA-osteoartritis; BMI-Indeks telesne mase.

Analiza ostalih varijanti gena od interesa pokazala je tendenciju ka povezanosti varijante rs3853839 gena za TLR7 sa lokalizacijom oboljenja ( $p=0,09$ ). Uočen je i statistički trend ka povezanosti varijante rs187084 gena za TL9 i većeg indeksa telesne mase (BMI) ( $p=0,072$ ).

Nije uočena statistički značajna povezanost varijanti ostalih gena za TLR i ispitivanih demografskih i kliničko-patoloških parametara. Povezanost varijanti gena za TLR4, TLR7 i TLR9 sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama kod pacijenata sa OA prikazani su u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Povezanost varijanti gena za TLR4, TLR7 i TLR9 sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama kod ispitanika sa OA.

Demografski/ faktori rizika	Broj ispitanika	TLR4		TLR7	TLR9	
		rs4986790	rs4986791	rs3853839	rs187084	
		AA/AG/GG	CC/CT/TT	CC/CG/GG	AA/AG/GG	
Pol	Muško	35	26/9/0	12/20/3	26/0/9	10/17/8
	Žensko	60	44/16/0	24/35/1	36/6/18	21/25/14
	<i>P</i>		1,000	0,259	0,115	0,771
Lokalizacija	Kuk	61	45/16/0	22/37/2	36/6/19	20/28/13
	Koleno	34	25/9/0	14/18/2	26/0/8	11/14/9
	<i>P</i>		1,000	0,695	0,090	0,834
Godine (medijana)	<69	46	33/13/0	19/25/2	29/3/14	16/18/12
	>69	49	37/12/0	17/30/2	33/3/13	15/24/10
	<i>P</i>		0,816	0,790	0,905	0,613
BMI	≤20	2	2/0/0	0/2/0	1/0/1	2/0/0
	20-25	77	56/21/0	30/43/4	53/5/19	26/31/20
	>26	16	12/4/0	6/10/0	8/1/7	3/11/2
	<i>P</i>		0,682	0,655	0,566	0,072
Pušenje	Da	17	15/2/0	4/13/0	10/2/5	7/5/5
	Ne	78	55/23/0	32/42/4	52/4/22	24/37/17
	<i>P</i>		0,223	0,199	0,573	0,399
Fizička aktivnost	Da	20	17/3/0	5/13/2	14/0/6	7/8/5
	Ne	75	53/22/0	31/42/2	48/6/21	24/34/17
	<i>P</i>		0,259	0,187	0,425	0,913
Istorija povreda	Da	33	26/7/0	12/18/3	20/2/11	10/17/6
	Ne	62	44/18/0	24/37/1	42/4/16	21/25/16
	<i>P</i>		0,471	0,224	0,740	0,539

<b>Porodična anamneza</b>	<b>Da</b>	39	31/8/0	13/24/2	23/3/13	11/20/8
	<b>Ne</b>	56	39/17/0	23/31/2	39/3/14	20/22/14
	<b>P</b>		<i>0,347</i>	<i>0,723</i>	<i>0,560</i>	<i>0,510</i>
<b>Rana pojava OA</b>	<b>&lt;55</b>	52	39/13/0	18/32/2	36/1/15	14/24/14
	<b>&gt;55</b>	43	31/12/0	18/23/2	26/5/12	17/18/8
	<b>P</b>		<i>0,817</i>	<i>0,731</i>	<i>0,150</i>	<i>0,377</i>
<b>Menopauza</b>	<b>Da</b>	56	42/14/0	21/34/1	33/5/18	19/23/14
	<b>Ne</b>	4	2/2/0	3/1/0	3/1/0	2/2/0
	<b>P</b>		<i>0,275</i>	<i>0,333</i>	<i>0,300</i>	<i>0,510</i>
<b>Rana menopauza</b>	<b>Da</b>	15	11/4/0	6/9/0	9/2/4	6/6/3
	<b>Ne</b>	41	32/9/0	15/25/1	28/7/6	12/18/11
	<b>P</b>		<i>0,730</i>	<i>0,818</i>	<i>0,576</i>	<i>0,727</i>
<b>Oticanje zgloba</b>	<b>Da</b>	32	23/9/0	13/17/2	24/0/8	11/12/9
	<b>Ne</b>	63	47/16/0	23/38/2	38/6/19	20/30/13
	<b>P</b>		<i>0,808</i>	<i>0,683</i>	<i>0,139</i>	<i>0,591</i>

OA-osteoartritis; BMI-Indeks telesne mase.

#### 4.3. POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA

Povezanost varijanti gena za mikro RNK sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa OA prikazani su u Tabeli 9. Varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 dovedena je u vezu sa polom, gde je TT genotip povezan sa ženskim polom ( $p=0,014$ ). Genotip TT varijante rs11614913 gena za miR-196a-2 je takođe povezana sa prethodnom istorijom povrede ( $p=0,014$ ). Zapažena je i tendencija ka povezanosti većeg BMI ( $p=0,051$ ) sa varijantom rs11614913 gena za miR-196a-2. Varijanta rs767649 gena za miR-155 sa ranom menopauzom ( $p=0,033$ ), a uočen je i trend ka povezanosti ovog polimorfizma sa polom ( $p=0,086$ ). Nije uočena povezanost između varijante rs2910164 gena za miR-146a ni sa jednom od ispitivanih demografskih i kliničko-patoloških varijabli.

**Tabela 9.** Povezanost varijanti gena za mikro RNK sa demografskim, kliničkim i patološkim karakteristikama kod ispitanika sa OA.

<b>Demografski/ Faktori rizika</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>miR-196a-2</b>	<b>miR-146a</b>	<b>miR-155</b>	
		<b>rs11614913</b>	<b>rs2910164</b>	<b>rs767649</b>	
		<b>CC/CT/TT</b>	<b>GG/GC/CC</b>	<b>TT/TA/AA</b>	
<b>Pol</b>	<b>Muško</b>	35	11/13/11	18/13/4	34/1/0
	<b>Žensko</b>	60	5/28/27	40/17/3	51/9/0
	<b>P</b>		<i>0,014</i>	<i>0,269</i>	<i>0,086</i>
<b>Lokalizacija</b>	<b>Kuk</b>	61	13/26/22	38/19/4	55/6/0
	<b>Koleno</b>	34	3/15/16	20/11/3	30/4/0
	<b>P</b>		<i>0,260</i>	<i>0,902</i>	<i>0,742</i>
<b>Godine (medijana)</b>	<b>&lt;69</b>	46	7/21/18	26/16/4	39/7/0
	<b>&gt;69</b>	49	9/20/20	32/14/3	46/3/0
	<b>P</b>		<i>0,867</i>	<i>0,669</i>	<i>0,190</i>
<b>BMI</b>	<b>≤20</b>	2	0/0/2	1/0/1	2/0/0
	<b>20-25</b>	77	10/37/30	47/24/6	69/8/0
	<b>&gt;26</b>	16	6/4/6	10/6/0	14/2/0
	<b>P</b>		<i>0,051</i>	<i>0,136</i>	<i>0,859</i>

Pušenje	Da	17	2/9/6	11/5/1	16/1/0
	Ne	78	14/32/32	47/25/6	69/9/0
	<i>P</i>		0,641	0,933	0,684
Fizička aktivnost	Da	20	5/6/9	11/7/2	19/1/0
	Ne	75	11/35/29	47/23/5	66/9/0
	<i>P</i>		0,337	0,785	0,683
Istorija povreda	Da	33	10/9/14	18/11/4	30/3/0
	Ne	62	6/32/24	40/19/3	55/7/0
	<i>P</i>		<b>0,014</b>	0,377	1,000
Porodična anamneza	Da	39	9/14/16	23/12/4	36/3/0
	Ne	56	7/27/22	35/18/3	49/7/0
	<i>P</i>		0,308	0,667	0,518
Rana pojava OA	<55	52	9/22/21	30/18/4	47/5/0
	>55	43	7/19/17	28/12/3	38/5/0
	<i>P</i>		0,981	0,754	0,751
Menopauza	Da	56	4/26/26	38/15/3	47/9/0
	Ne	4	1/2/1	2/2/0	4/0/0
	<i>P</i>		0,403	0,576	1,000
Rana menopause	Da	15	0/8/7	10/5/0	10/5/0
	Ne	41	5/19/17	27/11/3	37/4/0
	<i>P</i>		0,366	0,532	<b>0,033</b>
Oticanje zgloba	Da	32	2/14/16	18/11/3	28/4/0
	Ne	63	14/27/22	40/19/4	57/6/0
	<i>P</i>		0,109	0,754	0,728

OA-osteoartritis; BMI-Indeks telesne mase.

#### 4.4. POVEZANOST VARIJANTI GENA ZA RXR $\alpha$ SA DEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA

Analizom povezanosti RXR $\alpha$  varijanti i demografskih i kliničko-patoloških faktora za OA utvrđena je povezanost varijante rs7864987 i starosti ( $p=0,035$ ). Pored toga, postoji tendencija ka povezanosti između većeg BMI i OA za istu varijantu gena, rs7864987 ( $p=0,084$ ). Nije primećena značajna povezanost nijednog od praćenih demografskih i kliničko-patoloških karakteristika ispitanika sa OA i varijante rs3118523 u genu za RXR $\alpha$ . Povezanost varijanti gena za RXR sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama kod pacijenata sa osteoartritisom prikazani su u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Povezanost varijanti RXR $\alpha$  gena sa demografskim, kliničkim i patološkim karakteristikama kod ispitanika sa OA.

Demografski/ Faktori rizika	Broj ispitanika	RXR $\alpha$		
		rs3118523 AA/AG/GG	rs7864987 TT/TC/CC	
Pol	Muško	33	25/6/2	13/17/3
	Žensko	59	42/16/1	23/31/5
	<i>P</i>		0,367	0,993
Lokalizacija	Kuk	59	43/13/3	25/28/6
	Koleno	33	24/9/0	11/20/2
	<i>p</i>		0,383	0,460
Godine (medijana)	<69	44	33/10/1	13/29/2
	>69	48	34/12/2	23/19/6

	<i>p</i>		0,837	<b>0,035</b>
<b>BMI</b>	≤25	32	22/9/1	17/13/2
	25-30	39	28/9/2	12/21/6
	>30	21	17/4/0	7/14/0
	<i>p</i>		0,767	0,084
<b>Pušenje</b>	Da	18	13/4/1	11/6/1
	Ne	73	53/18/2	25/42/7
	<i>p</i>		0,823	0,103
<b>Fizička aktivnost</b>	Da	20	16/3/1	9/9/2
	Ne	72	51/19/2	27/39/6
	<i>p</i>		0,531	0,768
<b>Istorija povreda</b>	Da	38	23/8/0	11/17/3
	Ne	53	44/14/3	25/31/5
	<i>p</i>		0,448	0,872
<b>Porodična anamneza</b>	Da	38	30/7/1	15/20/3
	Ne	53	37/14/2	21/27/5
	<i>p</i>		0,621	0,965
<b>Rana pojava OA</b>	<55	51	38/12/1	19/27/5
	>55	41	29/10/2	17/21/3
	<i>p</i>		0,726	0,870
<b>Menopauza</b>	Da	56	39/16/1	22/29/5
	Ne	3	3/0/0	1/2/0
	<i>p</i>		0,527	0,813
<b>Rana menopause</b>	Da	15	10/5/0	4/8/3
	Ne	41	29/11/1	18/21/2
	<i>p</i>		0,758	0,161
<b>Oticanje zgloba</b>	Da	33	25/7/1	11/20/2
	Ne	59	42/15/2	25/28/6
	<i>p</i>		0,893	0,560

OA-osteoartritis; BMI-Indeks telesne mase.

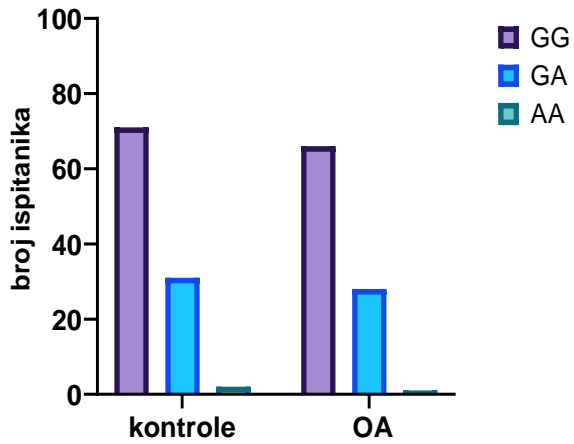
#### 4.5. ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA TLR

Analiza distribucije genotipova ispitanika sa OA i zdravih kontrola pokazala je značajnu razliku u distribuciji genotipova za obe ispitivane varijante rs4986790 ( $p=0,004$ ) i rs4986791 ( $p=0,0001$ ) gena za TLR4 (Grafik 1, D, E).

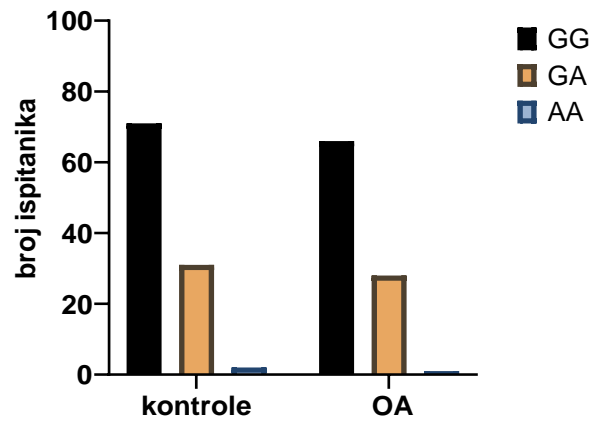
Statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između kontrola i ispitanika sa OA je takođe primećena za varijantu gena TLR7 rs3853839 ( $p=0,033$ ) (Grafik 1, F).

Poređenje između slučajeva OA i kontrola nije otkrilo razlike u učestalosti genotipova varijanti gena za ostale ispitivane TLR. Učestalost genotipova prikazana je na Grafiku 1.

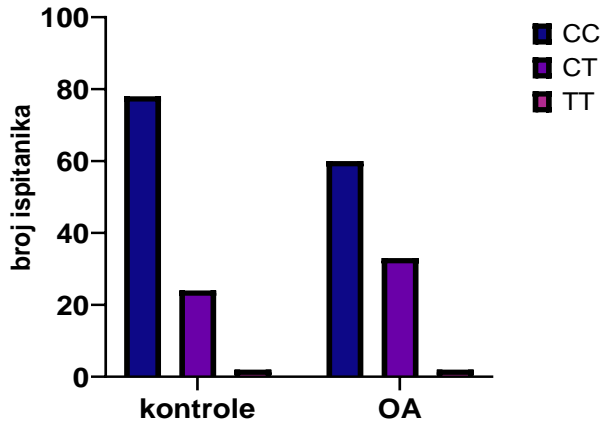




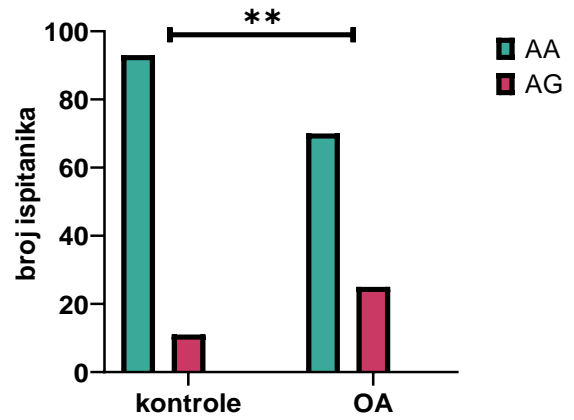
A) rs5743708



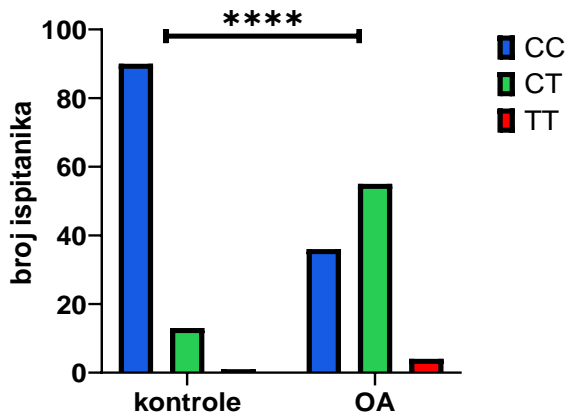
B) rs3775291



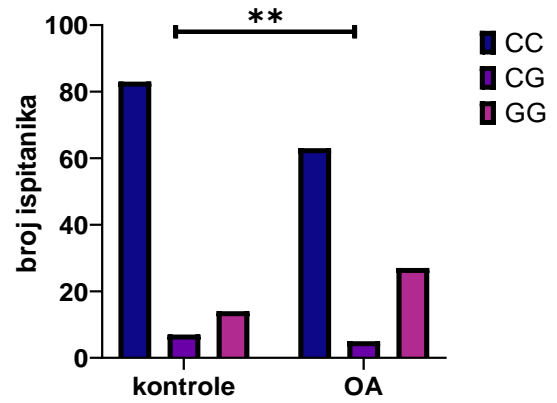
C) rs57433120



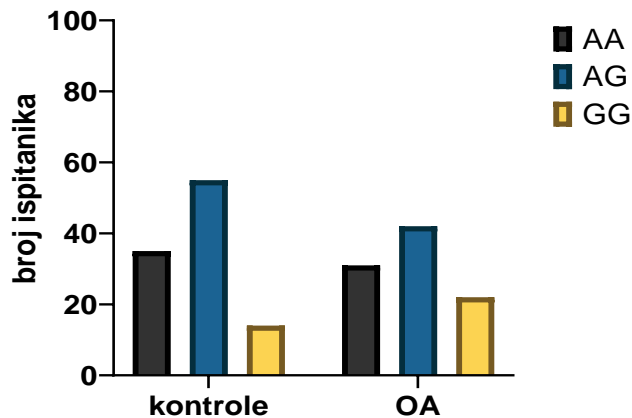
D) rs4986790



E) rs4986791



F) rs3853839



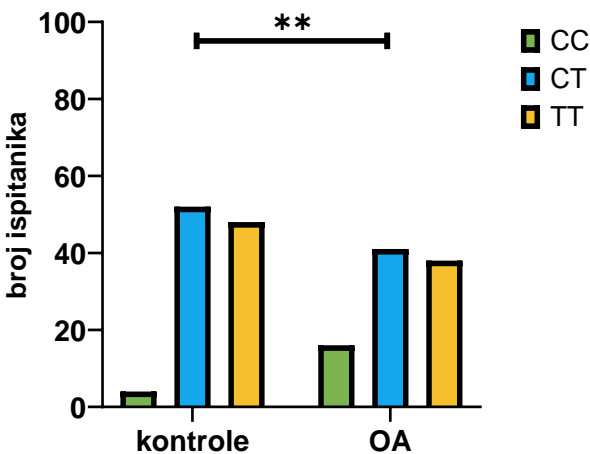
**G) rs1870840**

**Grafik 1.** Učestalost genotipova varijanti gena za TLR.  
OA-osteoartritis; \*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

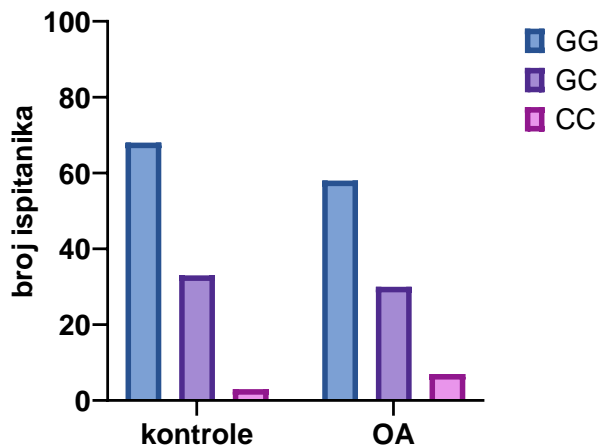
#### 4.6. ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK

Statistički značajna razlika u distribuciji genotipova pronađena je za varijantu rs11614913 gena za miR-196a-2 (p=0,010) (Grafik 2, A).

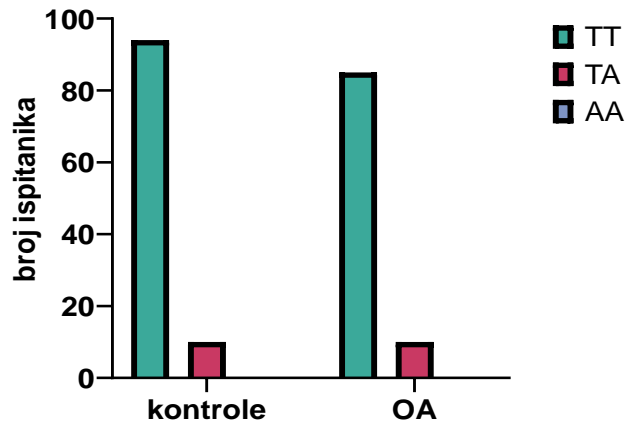
Poređenje između slučajeva OA i kontrola nije otkrilo razlike u učestalosti genotipova varijanti gena za ostale ispitivane mikro RNK (Grafik 2, B, C).



**A) rs11614913**



**B) rs2910164**

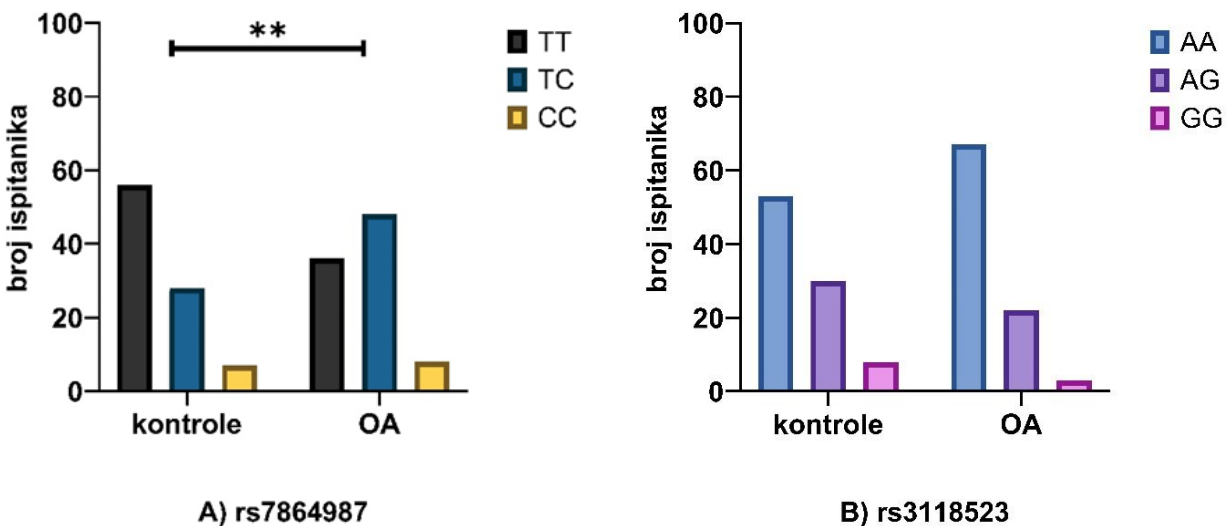


C) rs767649

Grafik 2. Učestalost genotipova varijanti gena za mikro RNK.  
\*\*p<0,001

#### 4.7. ANALIZA DISTRIBUCIJE GENOTIPOVA VARIJANTI GENA ZA RXR $\alpha$

Uočena je značajna razlika u distribuciji genotipova između pacijenata sa OA i kontrolne grupe koja je podudarna po uzrastu i polu za varijantu rs7864987 (p=0,008) (Grafik 3, A) gena za RXR $\alpha$ . Trend ka statistički značajnoj razlici u učestalosti genotipova uočen je za drugu analiziranu varijantu, rs3118523 (p=0,077) (Grafik 3, B).



A) rs7864987

B) rs3118523

Grafik 3. Učestalosti genotipova varijanti gena za RXR $\alpha$ .  
\*\*p<0,001

#### 4.8. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA TLR SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA

Logistička regresiona analiza prilagođena starosti i polu korišćena je za proučavanje povezanosti varijanti ispitivanih gena i rizika od OA. Podaci analize logističke regresije za varijante gena za TLR kod ispitanika sa OA prikazani su u Tabeli 11.

Varijante rs4986790 i rs4986791 gena za TLR4 su značajno povezane sa povećanim rizikom od OA (OR=2,964; p=0,006 i OR=8,766; p=0,00001), kao i varijanta rs3853839 gena za TLR7 (OR=1,579; p=0,012). Ostale ispitivane varijante u genima za TLR nisu pokazale povezanost sa rizikom za OA.

**Tabela 11.** Učestalost genotipova i podaci analize logističke regresije za varijante gena za TLR i rizik od OA.

Gen/ varijanta	Genotip	Kontrole	Ispitanici OA	<i>p</i> <sup>#</sup>	Prilagođeni OR <sup>##</sup>	<i>p</i> <sup>###</sup>
		N=104	N=95		[95% Interval poverenja]	
<b>TLR2</b> rs5743708	AA	71	66	<i>0,877</i>	0,930 [0,532 -1,627]	<i>0,800</i>
	AG	31	28			
	GG	2	1			
<b>TLR3</b> rs3775291	GG	43	35	<i>0,400</i>	1,038 [0,644-1,674]	<i>0,878</i>
	GA	53	56			
	AA	8	4			
<b>TLR3</b> rs57433120	CC	78	60	<i>0,186</i>	1,587 [0,910-2,768]	<i>0,104</i>
	CT	24	33			
	TT	2	2			
<b>TLR4</b> rs4986790	AA	93	70	<b><i>0,004</i></b>	2,964 [1,364-6,442]	<b><i>0,006</i></b>
	AG	11	25			
	GG	0	0			
<b>TLR4</b> rs4986791	CC	90	36	<b><i>0,0001</i></b>	8,766 [4,435-17,328]	<b><i>0,00001</i></b>
	CG	13	55			
	GG	1	4			
<b>TLR7</b> rs3853839	CC	83	63	<b><i>0,033</i></b>	1,579 [1,106-2,255]	<b><i>0,012</i></b>
	CG	7	5			
	GG	14	27			
<b>TLR9</b> rs1870840	AA	35	31	<i>0,186</i>	1,253 [0,839-1,871]	<i>0,271</i>
	AG	55	42			

GG            14            22

# - p vrednosti za procenu učestalosti genotipova kod ispitanika sa OA i kontrolnoj grupi, pomoću  $\chi^2$  ili Fišerovog egzaktnog testa; ## - odnos šansi (OR) prilagođen polu i uzrastu; ### - p vrednosti za prilagođeni OR putem analize logističke regresije.

#### 4.9. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA MIKRO RNK SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA

Među ispitivanim varijantama gena za mikro RNK, uočena je značajna povezanost varijante rs11614913 gena za miR-196a-2 sa smanjenim rizikom za OA (OR=0,619; p=0,034). Nije uočena povezanost druge ispitivane varijante rs2910164 u genu za miR-146a, niti varijante rs767649 u genu za miR-155 sa rizikom za nastanak OA. Podaci analize logističke regresije za varijante gena za mikro RNK kod ispitanika sa OA prikazani su u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Učestalost genotipova i podaci analize logističke regresije za varijante gena za mikro RNK i rizik od OA.

Gen/ varijanta	Genotip	Kontrole	Ispitanici OA	p <sup>#</sup>	Prilagođeni OR <sup>##</sup> [95% Interval poverenja]	p <sup>###</sup>
		N=104	N=95			
<b>miR-196a-2</b> <b>rs11614913</b>	CC	4	16	<b>0,010</b>	0,619 [0,397-0,964]	<b>0,034</b>
	CT	52	41			
	TT	48	38			
<b>miR-146a</b> <b>rs2910164</b>	GG	68	58	<b>0,344</b>	1,328 [0,821-2,146]	<b>0,248</b>
	GC	33	30			
	CC	3	7			
<b>miR-155</b> <b>rs767649</b>	TT	94	85	<b>0,831</b>	1,119 [0,43-2,850]	<b>0,813</b>
	TA	10	10			
	AA	0	0			

# - p vrednosti za procenu učestalosti genotipova kod ispitanika sa OA i kontrolnoj grupi, pomoću  $\chi^2$  ili Fišerovog egzaktnog testa; ## - odnos šansi (OR) prilagođen polu i uzrastu; ### - p vrednosti za prilagođeni OR putem analize logističke regresije.

#### 4.10. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTI GENA ZA RXR $\alpha$ SA RIZIKOM ZA NASTANAK OA

Obe ispitivane varijante gena za RXR $\alpha$  su povezane sa rizikom od OA. Varijanta rs3118523 je povezana sa smanjenim rizikom od OA (OR=0,569; p=0,030). Sa druge strane, analiza varijante rs7864987 pokazala je da je ova varijanta povezana sa povećanim rizikom od OA (OR=1,846; p=0,012). Učestalosti analiziranih RXR $\alpha$  varijanti kod pacijenata sa OA i kontrolne grupe prikazane su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Učestalost genotipova i podaci analize logističke regresije za varijante gena za RXR $\alpha$  i rizik od OA.

Gen/ varijanta	Genotip	Kontrole	Ispitanici	$p^{\#}$	Prilagođeni OR $^{\#\#}$ [95% Interval poverenja]	$p^{\#\#\#}$
		N=91	OA N=92			
<b>RXR<math>\alpha</math> rs3118523</b>	AA	53	67	<i>0,077</i>	0,569 [0,342-0,947]	<b>0,030</b>
	AG	30	22			
	GG	8	3			
<b>RXR<math>\alpha</math> rs7864987</b>	TT	56	36	<b>0,008</b>	1,846 [1,143-2,980]	<b>0,012</b>
	TC	28	48			
	CC	7	8			

$\#$ - p vrednosti za procenu učestalosti genotipova kod ispitanika sa OA i kontrolnoj grupi, pomoću  $\chi^2$  ili Fišerovog egzaktnog testa;  $\#\#$ -odnos šansi (OR) prilagođen polu i uzrastu;  $\#\#\#$ - p vrednosti za prilagođeni OR putem analize logističke regresije.

## 5. DISKUSIJA

Studije koje ispituju povezanost varijanti različitih gena omogućile su bolje razumevanje genetičke osnove mnogih bolesti. Ova saznanja naročito su bitna radi identifikacije genetičkih činilaca koji potencijalno imaju ulogu u nastanku i razvoju multifaktorijskih bolesti različite etiologije koje i danas predstavljaju izazov za kliničare.

Osnova funkcionisanja svakog organizma jeste adekvatna i pravovremena reakcija imunski posredovanih mehanizama. Mogućnost kontrole aktiviranih kaskada imunskih posrednika u cilju postizanja efikasne imunosti i homeostatskog stanja je preduslov za održivo funkcionisanje organizma. Prekomerna ili izmenjena ekspresija svake pojedinačne komponente u signalnom lancu može da dovede do neadekvatnih odgovora, kao i odgovora usmerenih na sopstvene antigene, što je osnova za razvoj zapaljenskih i autoimunskih stanja. Različiti efektorski mehanizmi dovode do povrede tkiva u različitim patološkim stanjima, ali je za sva ova stanja zajednička osnova mreže imunskih procesa. Dosadašnja istraživanja sugerisu da TLR, kao senzori i pokretači mehanizama urođene imunosti, igraju važnu ulogu u indukciji i patogenezi brojnih oboljenja. TLR signalizacija je važna kako za održavanje homeostaze, tako i za uspostavljanje patoloških procesa. Aktivnost TLR-a kao regulatora autoimunskih bolesti ukazuje na njihov potencijal da deluju u kontekstu izvan onih koji uključuju odbranu od patogena. Izmenjena funkcija ili aktivacija TLR-a može doprineti nastanku hroničnog zapaljenskog procesa, njegovom održavanju i propagaciji. Upravo je zapaljenski proces ključan ćelijski i molekularni proces u nastanku i razvoju OA (Mobasher & Batt, 2016).

Zapaljenska reakcija, čiji su okidači TLR je, uz antivirusnu odbranu, osnovni vid urođenog imunskog odgovora. TLR se, kao osnovni receptori urođenog imunskog odgovora, ekspresiraju na mnogim tipovima ćelija. Široko su ekspimirani na ćelijama koje su primarno posrednici mehanizama imunskog odgovora uključujući makrofage, neutrofile, DC, mastocite i NK ćelije (Vijay, 2018). Ekspresija TLR na velikom broju imunskih ćelija ukazuje na spektar njihovih uloga u brojnim mehanizmima imunskog sistema, od aktivacije imunskih mehanizama, preko posredovanja u komunikaciji između urođenog i adaptivnog imunskog odgovora, održavanju homeostaze tkiva, do regulacije imunske odbrane. Brojne biološke uloge TLR u procesima ključnim za održanje organizma sugerisu da bi upravo ovi receptori mogli imati značajnu ulogu kao okidači bolesti. Precizna regulacija TLR signalizacije je ključna za adekvatan odgovor na specifične stimule, a prekomerna/nedovoljna aktivacija TLR dovodi do poremećaja imunološke homeostaze. Posebno je zanimljiva sprega mikro RNK i TLR budući da je aktivnost TLR strogo kontrolisana od strane mikro RNK. Aktivacija TLR ima uticaj na ekspresiju mikro RNK koje su zapravo regulatori TLR signalizacije. Mikro RNK regulišu TLR signalizaciju transkripcionom regulacijom ili deluju kao ligandi za TLR (Banerjee, Thompson, & Chowdhury, 2021; Bayraktar et al., 2019), ali i sama aktivacija TLR reguliše ekspresiju mikro RNK kontrolom kaskade TLR signalizacije ili drugih zajedničkih signalnih puteva (Banerjee et al., 2021).

Danas se smatra da je imunološka komponenta patogeneze OA veoma značajna za započinjanje i održavanje patoloških procesa degradacije matriksa hrskavice i sinovitisa. Povećana ekspresija pojedinih članova TLR porodice je pokazana u skoro svim ćelijama zgloba i potpornih mišića u OA, uključujući hondrocite (TLR1,-2,-4,-9), sinoviocite (TLR1,-7,-9) i osteoblaste (TLR2,-4,-5,-9) (Barreto, Manninen, & K. Eklund, 2020; W. Su, Aloji, & Garden,

2016; Yim, 2020). Široka zastupljenost skoro svih članova TLR porodice u strukturama zgloba naglašava njihov značaj u gotovo svakom aspektu održanja mikrobioma zgloba - imunskom nadzoru na prvom mestu, homeostazi tkiva i procesima reparacije tkiva.

Poseban aspekt funkcija TLR jeste aktivacija od strane endogenih molekula oštećenja u takozvanoj sterilnoj inflamaciji. Širok spektar liganada za TLR sve više dobija na značaju u istraživanjima njihove uloge u različitim patološkim stanjima. Aktivacija zaštitnih imunskih mehanizama kao odgovor na različite molekule koji nastaju usled oštećenja ćelija i kataboličkih procesa u hrskavici, kostima i mišićima koji podržavaju zglobni sistem je jedinstvena karakteristika zapaljenskog odgovora kod OA. Nemogućnost vraćanja homeostatskog stanja nakon aktivacije kataboličkih medijatora ima veću značajnost u patogenezi OA od same indukcije zapaljenskog procesa kao odgovora na različite lokalne faktore rizika u sprezi sa sistemskim faktorima rizika. Kao odgovor na traumatsku povredu dolazi do povećane ekspresije inflamatornih medijatora i proteinaza koje razgrađuju hrskavicu.

U kontekstu OA, aktivacija TLR posredstvom molekula koji potiču od samog organizma je ključna. Kod OA, stimulacija TLR-a dovodi do zapaljenskog stanja koje posledično dovodi do promena u anatomskim i fiziološkim funkcijama svih zglobnih struktura (Y. Y. Chow & Chin, 2020). TLR se aktiviraju u odgovoru na lokalno prisutne molekule povezane sa oštećenjem u hrskavici i sinovijalnoj membrani zgloba koji su takođe snažni aktivatori ovih receptora kao i strukture poreklom od patogena. Prepoznavanja molekula oštećenja od strane TLR pokreće mrežu interakcija koje indukuju oslobađanje proinflamatornih citokina što posledično dovodi do hroničnog zapaljenskog procesa (Rosenberg, Rai, Dilisio, Sekundiak, & Agrawal, 2017). Proinflamatorni mehanizmi u OA koje pokreću TLR su posredovani aktivacijom transkripcionih faktora NF- $\kappa$ B, AP-1, kao i IRF3/7, (Liu-Bryan & Terkeltaub, 2015). Nakon prepoznavanja endogenih liganada od strane TLR pokreće se mreža interakcija koje indukuju oslobađanje TNF- $\alpha$  i IL-1, najpotentnijih citokina koji pojačavaju proinflamatorni odgovor (Rosenberg et al., 2017). Kada se jednom započne prokataboličko stanje, stvara se sve više i više proinflamatornih medijatora, koji propagiraju proces ćelijske degradacije i dovode do hronične upale (Piccinini & Midwood, 2010). Proinflamatorni mehanizmi u OA su vođeni prekomernim zapaljenskim odgovorom usled povećane aktivacije TLR-a u hrskavici i sinovijalnoj membrani (Liu-Bryan & Terkeltaub, 2015). Širok spektar DAMP-a se proizvodi u različitim zglobnim tkivima kako bolest napreduje, jer se OA karakteriše kontinuiranom degradacijom i remodelovanjem tkiva. Takođe je pokazano da je ekspresija širokog spektra endogenih TLR aktivatora, poput HMGB1 proteina koji su nastali u odgovoru na oštećenje, značajno povišena u osteoartritičnim hondrocitima. Alarmini, S100A4, A8, A9 i A11, su dodatni pokazatelji oštećenja zglobova čija signalizacija se odvija putem TLR i koja je uključena u katabolizam tkiva hrskavice pod uticajem inflamatornih signala (Goldring & Otero, 2011). Ekspresija TLR se pojačava u prisustvu inflamatornih medijatora (Barreto et al., 2020). Kod osteoartritičnih lezija hrskavice nivo ekspresije TLR je povećan u odnosu na zdravu hrskavicu, a signalizacija preko MyD88 i NF- $\kappa$ B dovodi do povećanja ekspresije proinflamatornih i kataboličkih gena, kao što su geni za MMP-3 i MMP-13 (Barreto et al., 2020; Sillat et al., 2013).

Najnovija istraživanja usmerena su na TLR kao posrednike oboljenja specifičnih za organ, ali i sistemskih efekata pojedinih regionalnih imunskih sistema na udaljene organe. Jedna od njih je i uticaj mikrobiote na zapaljenske bolesti zglobnog sistema. Molekularni obrasci povezani sa mikrobima (engl. Microbe-Associated Molecular Pattern, MAMP) poput LPS-a, peptidoglikana i flagelina mogu pokrenuti zapaljenske odgovore u imunskim ćelijama i



stimulisati receptore urođenog imunskog sistema u kostima, hrskavici i sinovijalnoj membrani. Endotel creva je barijera koja ograničava transport mikroba koji naseljavaju gastrointestinalni trakt i mikrobnih molekula, koji mogu uticati na bolesti kostiju i zglobova (Hernandez, 2017). Nedavna studija sugerise da mikrobiom može regulisati interakcije između sistemske upale i OA. Pokazano je da produžena primena probiotika koji menjaju mikrobiotu creva može sprečiti razvoj OA (Schott et al., 2017). Ovi podaci ukazuju da translokacija molekula mikrobiote creva u sistemska cirkulaciju takođe može posredovati u razvoju OA ukazujući na kompleksnu mrežu interakcija koja se krije u patogenezi OA.

Uticaj pojedinih članova TLR porodice u patogenezi različitih oboljenja su naširoko ispitivani. TLR2 ima brojne funkcije u zaraznim i drugim bolestima, kao što su hronične i akutne zapaljenske bolesti, ali i metabolički poremećaji. Međutim, TLR2 ima nejasnu ulogu u aktivaciji i u supresiji urođenog imunskog odgovora. Pokazano je da TLR2 signalizacija posredstvom MyD88 predstavlja jedan od ključnih patofizioloških mehanizama u poremećenom procesu zarastanja dijabetičkih rana (Dasu et al., 2010). TLR2 takođe ima ulogu u mehanizmima antitumorskog imunskog odgovora, ali je pokazano da ima ulogu i u progresiji tumora putem ose HMGB1/TLR2 koja promovise samoobnavljanje, proliferaciju i invaziju matičnih ćelija tumora (Di Lorenzo, Bolli, Tarone, Cavallo, & Conti, 2020).

TLR2 i TLR4 imaju ulogu u zapaljenskoj reakciji u zglobovima u reumatoidnom artritisu (Sacre et al., 2007). Takođe su uključeni u patogenezu multiple skleroze, gde aktivacija ovih receptora ligandima poput HMGB1 indukuje produkciju proinflamatornih citokina koji stimulišu Th1 i Th17 diferencijaciju koje olakšavaju migraciju leukocita kroz krvno moždanu barijeru dovodeći do oštećenja CNS-a (Miranda-Hernandez & Baxter, 2013). Smatra se da je TLR4 važan posrednik u nastanku gojaznosti i insulinske rezistencije (M. Li, Zhou, Feng, & Su, 2009). TLR4, baš poput TLR2, igra ulogu i u različitim aspektima tumora. Stimulacija TLR4 puta izaziva supresiju imuniteta, preživljavanje ćelija tumora, i razvoj metastaza kroz aktivaciju NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora, odnosno ima onkogenu ulogu (Kashani, Zandi, Pourbagheri-Sigaroodi, Bashash, & Ghaffari, 2021). Pored toga, pokazano je da TLR4 aktivacija podstiče proizvodnju imunosupresivnih citokina TGF- $\beta$ , VEGF i proangiogenog IL-8 od strane ćelija raka pluća, potpomaže izbegavanje imunskih mehanizama i otpornost na apoptozu (W. He et al., 2007).

Povećana ekspresija TLR7 se primećuje kod autoimunskih bolesti zglobova kao što je reumatoidni artritis (Miettinen et al., 2001). Povećana ekspresija TLR7 je povezana i sa razvojem SLE odnosno lupus nefritisom (Deane et al., 2007), a TLR7 je uključen i u signalizaciju markera zapaljenja CXCL13, CXCR5 i TNF u patogenezi Sjogrenovog sindroma (Y. Wang et al., 2021). Ispitivanja osnovnih procesa u neurodegenerativnoj patogenezi Parkinsonove bolesti, neuroinflamacije i imunskog odgovora, pokazala su da su TLR7 i TLR8 važni pokretači T ćelijskog odgovora. Delecija TLR7 i TLR8 dovodi do smanjene produkcije T ćelija i redukcije migracije ovih ćelija u mozak (Campolo et al., 2020). TLR7 posredovana indukcija produkcije IFN tipa I i drugih inflamatornih citokina je važna u antivirusnom imunskom odgovoru. Infekcija virusima kao npr. virus hepatitisa C (HCV), virus humane imunodeficijencije (HIV) i virus gripa A (IAV) takođe rezultiraju povećanom regulacijom ekspresije TLR7 u hepatocitima, cirkulišućim imunskim ćelijama i makrofagima. Ekspresija TLR7 je takođe dovedena u vezu sa različitim tumorima poput ezofagealnog gde je pokazano da ekspresija TLR7 korelira sa stadijumom tumora (Sheyhidin et al., 2011). Kod gastričnog tumora i tumora pluća pokazano je da je viša ekspresija TLR4 i TLR7 povezana sa progresijom tumora (W. He et al., 2007; Schmausser,

Andrulis, Endrich, Müller-Hermelink, & Eck, 2005). Stimulacija TLR7 agonistima u tumorima dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, pojačane ekspresije antiapoptotičkog proteina Bcl-2, povećanog preživljavanja tumorskih ćelija i hemorezistencije (Cherfils-Vicini et al., 2010).

TLR9 ima važne funkcije u imunskoj odbrani od određenih virusa. Pokazano je da su miševi kojima nedostaje funkcionalni gen za TLR9 podložni infekciji citomegalovirusom. Dendritske ćelije miševa sa nedostatkom TLR9 ne uspeavaju da uspostave odgovarajući IFN tip I odgovor na infekciju herpes simpleks virusom. Ovi podaci sugerišu da TLR9 može igrati važnu ulogu u otkrivanju virusa, verovatno kroz prepoznavanje virusnih DNK intermedijera unutar zaražene ćelije (Eckmann, 2004; Krug et al., 2004). Pokazano je i da je inflamacija posredovana odgovorom TLR9 na ligande povezana i sa kardiometaobličkim poremećajima (Nishimoto, Fukuda, & Sata, 2020). TLR9 je takođe ispitivan i u tumorima. Kod skvamocelularnog tumora jednjaka ekspresija ovog TLR je prognostički faktor gde je ekspresija u ćelijama sličnim fibroblastima povezana sa nižom stopom metastaza limfnih čvorova (Sheyhidin et al., 2011).

Studije na nivou genoma ukazale su na povezanost varijacija u genima za TLR sa bolestima u čijoj osnovi se nalazi zapaljenski proces (El-Bendary et al., 2018). Rezultat pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama u kodirajućem regionu gena za TLR je zamena aminokiselina koja može dovesti do izmenjene funkcije proteina putem promene u motivu za vezivanje faktora transkripcije, menjajući efikasnost elemenata pojačivača ili represora. Polimorfizmi u transmembranskom domenu LRR-a mogu uticati na sposobnost receptora da vežu patogene koje normalno prepoznaju, a polimorfizmi u transmembranskom domenu mogu izazovu defekte u intracelularnom transportu receptora. SNP u citoplazmatskom domenu mogu dovesti do izmenjene interakcije sa adapterskim proteinima ili do poremećaja dimerizacije (Kutikhin, 2011). Utvrđena je povezanost varijanti gena TLR sa izmenjenim profilom citokina, kao i sa pojavom, karakteristikama i ishodom T1DM, SLE, reumatoidnog artritisa i Grejvsove bolesti (Yi, Xu, Xiao, & Cai, 2019). Budući da se degradativni procesi u hrskavici i apoptoza hondrocita u OA zglobu pripisuje upravo interakciji TLR i liganada, moguće je da bi različite varijante gena za TLR mogle imati uticaj i na rizik, pojavu i progresiju OA.

Studije na nivou genoma pokazale su da funkcija gena za TLR4 može biti izmenjena usled prisustva varijanti rs4986790 i rs986791. „Missens“ mutacija rs4986790 nalazi se u trećem egzonu gena za TLR4 i dovodi do zamene adenina guaninom (A>G), što rezultuje zamenom asparaginske kiseline (Asp) glicinskom aminokiselinom (Gly) na poziciji 299 polipeptidnog lanca. Sa druge strane, rs986791 dovodi do supstitucije timina citozinom (T>C), a posledica je zamena treonina (Tre) izoleucinom (Ile) na poziciji 399 u polipeptidnom lancu. Ove promene menjaju ekspresiju inflamatornih citokina i hemokina modulacijom MyD88 i drugih nizvodnih signala (Gowin et al., 2017; Z.-H. Yang, Dai, Gu, Guo, & Gong, 2012). Funkcionalne varijante gena za TLR4 ometaju regrutovanje MyD88 i ekspresiju TRIF zavisnih gena (Figuerola et al., 2012).

Jedna od najnovijih studija na nivou genoma iz 2021. godine pokazala je da bi TLR4 i varijante gena koji ga kodira mogao imati značajnu ulogu u patogenezi OA, budući da se ovaj TLR aktivira i u prisustvu endogeno sintetisanih molekula usled degradacije tkivnih konstituenata u različitim muskulo-skeletnim patologijama. Dodatno, ekspresija TLR na hondrocitima, osteoblastima i sinoviocitima čini ovaj TLR veoma privlačnom metom za modulaciju lokalnog imunskog odgovora u tkivima koja čine i pružaju potporu zglobnom sistemu (Boer et al., 2021). Studije koje su se fokusirale na varijante od interesa rs4986790 i

rs4986791 TLR4 gena ispitivane u ovoj studiji nisu dovedene u vezu sa rizikom za razvoj RA (Yildirim & Uzen, 2019). Međutim, u prilog hipotezi o njihovoj uključenosti u hroničan zapaljenski proces govori podatak da su i rs4986790, kao i rs4986791 povezane su sa povećanom ekspresijom citokina kod zapaljenskih bolesti kao što je Alchajmerova bolest (Balistreri et al., 2008). TLR4 varijanta rs4986791 dovodi do povećane ekspresije proinflamatornog TNF $\alpha$  u odgovoru na stimulaciju ligandom poput LPS-a (Ferber et al., 2007). Pokazano je da varijante gena za TLR4 utiču na aktivnost samog receptora i odgovor na ligande što dovodi do izmenjenog imunskog odgovora (Hold et al., 2014). Trenutno nema podataka koji pokazuju da analizirane varijante rs4986790 i rs4986791 u genu TLR4 utiču na ekspresiju proinflamatornih citokina u OA. S obzirom na funkcionalni uticaj istraživanih varijanti gena za TLR4, ove genetske varijante mogu imati uticaj na predispoziciju pojedinaca za razvoj OA.

Rezultati ove studije ukazali su i da je varijanta rs3853839 gena za TLR7 značajno povezane sa povećanim rizikom od OA što je u skladu sa nedavno objavljenom studijom o OA kolena. Varijanta rs3853839 gena povezana je sa rizikom za OA kolena, kliničkom slikom OA i rizikom od efuzijskog sinovitisa (Xi et al., 2022). Činjenica da žene imaju veći rizik za obolevanje od OA pokazuje da bi X-vezani geni mogli biti povezani i predstavljati faktor rizika za razvoj oboljenja. Istraživanja pokazuju da pojedinci sa određenim alelima rs3853839 mogu imati različite imunske odgovore i podložnost zapaljenskim stanjima. Varijanta rs3853839 igra ulogu u virusnoj infekciji i povezan je sa perzistencijom HCV-a, sa C alelom kao zaštitnim faktorom od HCV-a u ženskoj populaciji (Yue et al., 2014). Takođe je povezana sa COVID-19 infekcijom i lošom prognozom bolesti (El-Hefnawy et al., 2022). Istraživanja o ulozi u SLE pokazala su da heterozigotni CG i mutirani homozigoti GG varijante rs3853839 čine 40% ispitanika sa SLE nefritisom (Raafat, El Guindy, Shahin, Samy, & El Refai, 2018).

Iako su i ostali ispitivani TLR dovedeni u vezu sa zapaljenskim procesom u drugim oboljenjima, nije uočena povezanost između ispitivanih varijanti i OA. Varijanta rs3775291 se nalazi u egzonu 4 gena za TLR3 i dovodi do zamene citozina za timin (C>T), što dovodi do promene strukture visoko konzerviranog domena koji vezuje ligand na površini receptora (Ranjith-Kumar et al., 2007). rs5743312 se nalazi u intronu 2 gena za TLR3. Pokazano je da TLR3 učestvuje u proliferaciji, funkciji i apoptozi  $\beta$ -ćelija pankreasa i izaziva upalu koja dovodi do progresije i pogoršanja dijabetesa tipa 2 i srodnih komplikacija (Sepehri et al., 2015). Ekspresija TLR3 je povećana u ćelijama tiroidee kod pacijenata sa Hašimoto tiroiditisom (Aktaş et al., 2020).

Nekoliko studija je otkrilo vezu između varijante rs187084 gena za TLR9 i osetljivosti na OA (Balbaloglu, Sabah Ozcan, Korkmaz, & Yılmaz, 2017; S.-L. Su et al., 2012; Zheng et al., 2017). Varijanta rs187084 koji se nalazi u promotoru TLR9 gena je povezan sa brzinom transkripcije gena (Yi et al., 2019). Smatra se važnom regulatornom varijantom gena TLR9 pošto se nalazi u regionima nekoliko transkripcionih faktora koji mogu da aktiviraju/suprimiraju transkripciju kao odgovor na različite fiziološke i patološke stimuluse (Hamann et al., 2006). Prethodne studije su objavile da je T alel varijante rs187084 povezan sa uznapredovalim stadijumima OA kolena (S.-L. Su et al., 2012) i kuka (Yi et al., 2019), dok je druga studija prijavila prisustvo C alela kao faktor rizika za OA kolena (Zheng et al., 2017). Ovi nalazi su u saglasnosti sa istraživanjem koje je pokazalo da je TT genotip varijante rs187084 gena za TLR9 povezan sa razvojem RA (Etem, Elyas, Ozgocmen, Yildirim, & Godekmerdan, 2011). Sa druge strane, C alel varijante rs187084 gena za TLR9 povezan je sa povećanim rizikom od Kronove

bolesti, naglašavajući ključnu ulogu bakterijske DNK kao endogenih TLR liganada u patofiziologiji zapaljenske bolesti creva (Török et al., 2004). Nosioci C alela takođe imaju povećan rizik za razvoj astme (Lazarus et al., 2003). Očigledno je da je TLR9 uključen u različite patološke mehanizme, ali suspektan alel varira u zavisnosti od oboljenja i možemo pretpostaviti da je njegova uloga tkivno specifična.

TLR i njihova signalizacija strogo su regulisani od strane brojnih mikro RNK kao što su miR-146a, miR-199a, miR-155, miR-126, miR-21, miR-29, miR-148/152 i miR-4661 (Kondo, Kawai, & Akira, 2012). Veliki uticaj na regulaciju imunskih mehanizama mikro RNK bi mogle da imaju upravo kroz modulaciju signalizacije TLR-a i receptora za citokine (Bayraktar et al., 2019). Agonisti različitih TLR indukuju ekspresiju specifičnih mikro RNK (Taganov et al., 2006), ali sami TLR takođe mogu biti direktno ciljani od strane mikro RNK koje se mogu vezati za visoko očuvana ciljna mesta u 3' UTR ovih receptora (Saba, Sorensen, & Booth, 2014).

Uloga različitih varijanti gena za mikro RNK u OA još uvek nije detaljno opisana. Brojne mikro RNK su uključene u puteve imunske signalizacije kod OA, bilo u regulaciju degradacije matriksa hrskavice pod inflamacijom ili u perpetuaciju zapaljenske reakcije (Bayraktar et al., 2019). Integrativno molekularno profilisanje podataka o sekvenciranju RNK pokazalo je da se nivo ekspresije više od 250 mikro RNK, među kojima su i miR-146a, miR-155 i miR-196a, razlikuje kod zdrave i hrskavice zahvaćene OA. Dodatno, ova studija ukazala je na 37 jedinstvenih mikro RNK koje su eksprimirane samo u OA (Fisch et al., 2014).

Rezultati naše studije su istakli varijantu rs11614913 kao jednu od varijanti gena za miRNK koje mogu imati značajnu ulogu u OA. Varijanta miR-196a-2 rs11614913 je povezana sa polom ( $p=0,014$ ) i istorijom povrede zgloba ( $p=0,014$ ). Uočen je i trend ka asocijaciji ove varijante sa BMI ( $p=0,051$ ). Ovi nalazi su u skladu sa epidemiološkim podacima da većinu obolelih od OA čine žene, kao i u skladu sa sa utvrđenim faktorima rizika od bolesti. rs11614913 u genu za miR-196a-2 je takođe izdvojen u analizi učestalosti genotipova, pri čemu podaci ukazuju na značajnu razliku u distribuciji genotipova između pacijenata sa OA i kontrolne grupe ( $p=0,01$ ).

Dostupne studije o drugim zapaljenskim bolestima pokazale su da je T alel varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 povezan sa rizikom od dijabetesa tipa 1, gde su u poređenju sa kontrolama oboleli imali nižu ekspresiju miR-196a-2. Ovi nalazi ukazuju na to da bi smanjena ekspresija miR-196a-2 i varijanta rs11614913 mogli igrati važnu ulogu u patogenezi i podložnosti ovoj autoimunskoj bolesti (Ibrahim et al., 2019). Druga studija pokazala je da je ekspresija miR-196a-2 značajno smanjena kod nosilaca T alela varijante rs11614913 gena za miR-196a-2 među pacijentima sa ulceroznim kolitisom (Ranjha, Meena, Singh, Ahuja, & Paul, 2017). Varijanta gena miR-196a-2 povezan je i sa vitiligom gde miR-196a-2 cilja TIRP1 u melanocitima, potencijalno izazivajući proizvodnju eumelanina i smrt melanocita (Huang et al., 2013). Uočena je značajna povezanost između miR-196a-2 varijante rs11614913 i miR-423 varijante rs6505162 sa rizikom od infarkta miokarda (Uzair et al., 2024). Utvrđeno je da su nosioci mutiranog alela ovih mikro RNK povezani sa povećanim rizikom za ranu pojavu koronarne bolesti arterije kod muškaraca mlađih od 45 godina i žena mlađih od 55 godina (Agiannitopoulos et al., 2021). Pokazano je i da ova varijanta gena za miR-196a-2 povećava rizik od NHL putem izmene ekspresije zrele miR-196a i stoga se može koristiti kao kandidat za biomarkere za osetljivost na NHL (Tao Li et al., 2015). CC genotip varijante rs11614913 takođe je povezan sa povećanim rizikom od akutne limfoblastne leukemije (Tong et al., 2014). Značajna

je i povezanost između C alela rs11614913 u genu za miR-196a-2 i predispozicije za rak dojke, dok je T alel protektivni faktor za razvoj ovog tipa maligniteta (Nejati-Azar & Alivand, 2018). Pokazano je da prekomerna ekspresija ove mikro RNK može podstaći invaziju, proliferaciju, metastaze u limfnim čvorovima, inhibiciju apoptoze i otpornost na zračenje u različitim tumorima (Dioguardi et al., 2022). Studije pokazuju da deregulisana ekspresija miR-196a i miR-196b doprinosi razvoju tumora i širenju maligniteta kao što su melanom, astroцитom, osteosarkom i mijelom, sa onkosupresivnom ulogom (Dioguardi et al., 2022). Kod raka jajnika miR-196a-2 regulacijom PTEN/PI3K/AKT signalnog puta promoviše proliferaciju ćelija i inhibira apoptozu kod raka jajnika (Hussein et al., 2022). Ekspresija miR-196a-2 u tkivu i plazmi je značajno povećana kod pacijenata sa kolorektalnim tumorom. Varijanta rs11614913 bi mogla biti uključena u neinvazivni skrining i dijagnostički alat za identifikaciju kolorektalnog tumora, zajedno sa poznatim biomarkerima u CRC, uključujući CEA i CA19-9 (Mehrojoi, Haghazari, Bashiri, & Rezvani, 2024). Ovi podaci pokazuju da je miR-196a-2 povezana sa bolestima u čijoj patogenezi se nalazi hroničan zapaljenski proces.

Kada je reč o zapaljenskim bolestima zglobova, uloga miR-196a-2 u destrukciji zglobne hrskavice je uglavnom proučavana kod RA. Varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 nije povezana sa osetljivošću na RA u egipatskoj (Toraih, Ismail, Toraih, Hussein, & Fawzy, 2016) i meksičkoj populaciji (Alemán-Ávila et al., 2017). Međutim, varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 je povezana sa ekstraartikularnim manifestacijama kod RA (De La Cruz-Castillejos et al., 2017). miR-196a-2 se nalazi u klasterima HOX gena, između HOXC10 i HOXC9, i reguliše ekspresiju HOX gena i transkripcionih faktora povezanih sa nastankom i razvojem OA (Pelttari, Barbero, & Martin, 2015). Takođe, miR-196a reguliše ekspresiju ERG transkripcionog faktora posredstvom koga potencijalno utiče na viskoelastične karakteristike same zglobne hrskavice i njen metabolizam u mikrosredini zgloba zahvaćenom OA (Ohta et al., 2015). Pokazano je i da povećana ekspresija miR-196a smanjuje proliferaciju matičnih ćelija iz adipocita i promoviše njihov osteogeni potencijal bez uticaja na adipogenezu, što bi potencijalno moglo da utiče na hondrogeni potencijal prekursora matičnih ćelija *in vitro* (McAlinden, Varghese, Wirthlin, & Chang, 2013). Zbog ograničene količine dostupnih informacija o uticaju na rizik ili progresiju zapaljenskih bolesti zglobova neophodna su dalja istraživanja da bi se detaljnije ispitao funkcionalni uticaj rs11614913 i efekti ove mikro RNK u OA.

Pored miR-196a-2 ispitivane su i miR-146a i miR-155 koje se nalaze u regulatornim regionima gena i regulišu ekspresiju gena uključenih u zapaljenski proces. Dva oblika miR-146, miR-146a i miR-146b su visoko ekspimirani u T limfocitima, mononuklearnim ćelijama i makrofagima (Testa et al., 2017). miR-146a reguliše IRAK1 i TRAF6 serin/treonin kinaze povezane sa IL-1R, kao i ekspresiju ciljnih gena NF-κB, kao što su IL-6, IL-8, IL-1β i TNF-α, čime se smanjuje zapaljenje (Saba et al., 2014). miR-146a igra ključnu ulogu u održavanju homeostaze u imunološkoj signalizaciji interakcijom sa Treg. Ulogu Treg u zapaljenskom odgovoru kontroliše miR-146a, koji ograničava proinflamatornu Th1 signalizaciju. Ekspresija miR-146a na Treg je neophodna za regulaciju Th1 odgovora, a izmenjena funkcija Treg i diferencijalna ekspresija miR-146a u Th1-Th2 ćelijama ukazuju na autoimunske procese (Testa et al., 2017). U kontekstu OA, značajno je da miR-146a potiskuje nizvodnu signalizaciju većine TLR-a (TLR 2,4,5,7,8 i 9) kroz interakciju sa IRAK1/TRAF6 molekulima (Mohammed et al., 2021; Taganov et al., 2006).

Upravo zbog uključenosti u imunske mehanizme uloga miR-146a u patološkim stanjima zgloba je možda i najviše ispitivana od svih mikro RNK. Pokazano je da je miR-146a povezana

sa zapaljenskim oboljenjima zgloba poput RA. Među četiri mikro RNK čija je ekspresija značajno povećana u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa RA našle su se upravo miR-146a i miR-155 (Moran-Moguel, Petarra-Del Rio, Mayorquin-Galvan, & Zavala-Cerna, 2018). Ekspresija miR-146a u hrskavici u ranim fazama OA zavisi od proinflatamornih signala karakterističnih za početne stadijume bolesti, na šta ukazuje značajno povećanje njene ekspresije u poređenju sa zdravim tkivom hrskavice (Yamasaki et al., 2009). Hronična upala i degenerativne promene u hrskavici zahvaćenoj OA mogu biti povezane sa miR-146a (Saba et al., 2014). Pokazano je da ekspresija miR-146a raste kao odgovor na mehaničko oštećenje hrskavice (Jin et al., 2014). U RA, miR-146a ograničava TLR4/NF-kB signalizaciju, što dovodi do smanjene proliferacije i rezolucije zapaljenskog odgovora fibroblasta i sinoviocita (W. Liu et al., 2018). Istraživanja pokazuju da u hondrocitima zglobova zahvaćenim OA, stimulisana ekspresija miR-146a i miR-140-5p inhibira inflamatornu signalizaciju ciljanjem takođe TLR4/NF-kB ose (Papathanasiou, Balis, Trachana, Mourmoura, & Tsezou, 2020).

miR-155 je još jedan regulator zapaljenskog procesa. miR-155 reguliše razvoj B ćelija, odgovore antitela zavisne od T ćelija, inflamatorne odgovore zavisne od T ćelija, funkcije supresije Treg i aktivaciju tkivnih makrofaga (Moran-Moguel et al., 2018). Pod kontrolom ove mikro RNK se nalazi signalizacija sa TLR3 i TLR4 (Hu et al., 2015). Pokazano je da ekspresija miR-155 u sinovijalnim monocitima i makrofagima zglobova zahvaćenim artritismom zavisi od endogenih TLR liganada koji stimulišu povećanje proizvodnje proinflatamornih citokina (Moran-Moguel et al., 2018). Jedna od najvažnijih meta miR-155 u inflamatornoj signalizaciji je SOCS1, negativni regulator signalizacije IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12 i IL-5. miR-155 ispoljava svoje biološke efekte tako što smanjuje transkripciju SOCS1, čime slabi citokinsku signalizaciju posredstvom negativne povratne sprege (Wen et al., 2015). Visoka ekspresija miR-155 takođe dovodi do smanjenja anti-inflamatornog proteina SHIP-1 (engl. SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase), inhibitora TLR signalizacije koji je takođe važan regulator proliferacije i diferencijacije osteoblasta (Iyer, Margulies, & Kerr, 2013). miR-155 ima takođe je ulogu u resorpciji kostiju stimulišući diferencijaciju makrofaga ka razvoju osteoklasta (Mann, Barad, Agami, Geiger, & Hornstein, 2010).

Prema podacima dobijenim u ovoj studiji, ni miR-146a i miR-155 nisu povezani sa rizikom od OA u ispitivanoj populaciji. miR-155 polimorfizam rs767649 je pokazao značajnu povezanost sa ranom menopauzom ( $p=0,033$ ), a uočena je i tendencija ka asocijaciji ovog polimorfizma i pola ( $p=0,086$ ).

Pored TLR i njihovih regulatornih mikro RNK u ovoj studiji je ispitivana i povezanost RXR koji je takođe uključen u zapaljensku reakciju. Pored toga, RXR deluje kao transkripcioni partner VDR-a i RAR-a, što dovodi ovaj NR u vezu sa lokomotornim sistemom.

Poređenjem sa kontrolnom gupom, ova studija je pokazala statistički značajnu razliku u zastupljenosti genotipova između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa OA za varijantu rs7864987 gena za RXR $\alpha$ , kao i trend ka statistički značajnoj razlici u učestalosti i za drugu ispitivanu RXR $\alpha$  varijantu, rs3118523. Veoma značajan podatak jesu i dobijene asocijacije obe ispitivane varijante sa rizikom za OA. Varijanta rs3118523 gena za RXR $\alpha$  je protektivni faktor, dok je rs7864987 varijanta ovog gena faktor rizika za razvoj OA. Ovi podaci ukazuju da različite varijante RXR $\alpha$  gena imaju usko specifičnu ulogu u patogenezi OA. Uočena povezanost oba ispitivana gena za RXR $\alpha$  sa rizikom od OA u skladu je sa potencijalnom ulogom RXR $\alpha$  u hroničnoj upali. Povezanost jedne ispitivane varijante kao faktora rizika i druge kao zaštitnog

faktora za OA pokazuje da RXR $\alpha$  može biti među genima uključenim u kompleksnu mrežu koja leži u osnovi imunopatologije OA. Varijante gena koji kodiraju RXR $\alpha$  i enzime uključene u sintezu *all-trans* retinoične kiseline mogu biti važna komponenta kompleksne mreže koja naglašava imunopatofiziologiju OA.

Ovo je prva studija koja ispituje povezanost RXR-a i OA. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o ispitivanjima povezanosti između OA i varijanti gena za RXR $\alpha$ . Sagledavajući ustanovljene faktore rizika za razvoj OA, nekoliko NR bi moglo potencijalno biti uključeno u patogenezu ovog oboljenja. Zajedničko za sve ove NR jeste da je njihov obligacioni heterodimerizacioni partner upravo RXR.

Među do sada otkrivenih 48 članova, na prvom mestu kao NR koji je potencijalno uključen u patogenezu OA je svakako VDR. Za normalno funkcionisanje zglobnog aparata od krucijalne važnosti je metabolizam mišićno-skeletnog sistema, apsorpcija kalcijuma i mineralizacija kostiju. Biološka aktivnost aktivnog oblika vitamina D (1,25-dihidroksivitamin D3 [1,25(OH)2D3]) kod ljudi je posredovana interakcijom VDR sa RXR-om kao obligacionim heterodimerizacionim partnerom. Uključenost RXR-a u transkripcionu regulaciju gena koji reguliše vitamin D pokazuje da bi varijante gena koje kodira ovaj receptor mogle imati efekat na patogenezu OA uticajem na metabolizam kostiju (Campbell, Xu, El-Tanani, Crowe, & Bingham, 2010).

Pored VDR, i ER je jedan od NR čija uloga bi mogla da bude povezana sa OA. Estrogen ima značajne regulatorne efekte na metabolizam skeletnog sistema. Ključan je za zdravlje kostiju, promovise aktivnost i mineralizaciju osteoblasta i može usporiti razgradnju kostiju. ER su identifikovani u mnogim komponentama zglobova, uključujući sinoviju, kost, hrskavicu i ligamente. Sintaza glikozaminoglikana je ključna za funkciju zglobova i hrskavice. Pokazano je da tretman estrogenom pozitivno utiče na sintezu glikozaminoglikana u hondrocitima kunića, kao i da potiskuje ekspresiju COX-2 u goveđim zglobnim hondrocitima. Ovo ukazuje na protektivni efekat estrogena na tkivo hrskavice što bi svakako moglo da se poveže i sa činjenicom da je OA češće zastupljen kod žena i to nakon menopauze koja se karakteriše hormonskim disbalansom i smanjenjem koncentracije estrogena (Yuqing Zhang & Jordan, 2010).

Jedan od faktora rizika za OA je i prekomerna telesna težina što sugeriše da bi i geni povezani sa metabolizmom lipida i glukoze takođe mogli predstavljati gene kandidate za OA. Iako nije uočena statistički značajna povezanost između ispitivanih varijanti gena za RXR $\alpha$ , primećena je značajna tendencija ka povezanosti između višeg indeksa telesne mase i rs7864987 varijante. Za sada ne postoje dostupni podaci o ispitivanju varijanti gena za RXR $\alpha$  izoformu, međutim, pokazano je da je varijanta rs2134095 gena za RXR $\gamma$  izoformu povezana sa dijabetesom, funkcijom  $\beta$  ostrvaca pankreasa i metabolizmom glukoze i lipida (Yu et al., 2021).

Među članovima NR superfamilije, LXR je receptor čiji je heterodimerni ligand isključivo RXR. Pokazano je da LXR utiče na ekspresiju gena zavisnu od NF-kB i da potiskuje ekspresiju gena povezanih sa upalom, uključujući iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$  i IL-6 (Joseph, Castrillo, Laffitte, Mangelsdorf, & Tontonoz, 2003). Prethodna istraživanja na LXR-u su pokazala zaštitnu ulogu ovog proteina u degradaciji hrskavice kod OA. U poređenju sa normalnom hrskavicom, ekspresija i LXR i RXR je značajno smanjena u humanoj OA hrskavici (Collins-Racie et al., 2009).

Obe istraživane varijante gena za RXR $\alpha$ , rs7864987 i rs3118523 imaju uticaj na funkciju receptora putem modulacije strukture regiona za vezivanje liganada i alel-specifičnog vezivanja transkripcionih faktora (Cooper, 2010; Ward & Kellis, 2016).

Ne postoje dostupni podaci o uticaju varijanti gena za RXR na pojavu i progresiju OA. Iako je RXR uključen u muskulo-skeletni razvoj i metabolizam tkiva konstituenata zglobova, do sada nisu sprovedena istraživanja funkcije ovog receptora u zapaljenskim bolestima zglobova. Metabolit vitamina A, all-trans retinoična kiselina (atRA) igra ključnu ulogu u razvoju mišićno-skeletnog sistema. Biološku ulogu ispoljava vezivanjem za retinoičnu kiselinu ili PPAR $\beta/\delta$  receptor koji je heterodimerni partner RXR. Pokazano je da atRA ima anti-inflamatorno dejstvo na zglobnu hrskavicu i da bi mogla imati ulogu u nastanku OA (Zhu et al., 2022). Varijante u genu za ALDH1A2, koji kodira ključni enzim za sintezu all-*trans* retinoične kiseline dovedene su u vezu sa povredom i inflamacijom kod težeg oblika OA šake (Zhu et al., 2022).

Nedavna istraživanja pokazuju da RXR imaju specifičnu ulogu u imunskom odgovoru kao regulatori homeostatskih procesa, pri čemu se ekspresija različitih izotipova razlikuje u zavisnosti od tipa ćelije (Leal, Reich, Moerland, Zhang, & Liby, 2021; S. Sharma et al., 2022). Različiti heterodimerni partneri RXR uključujući ER, VDR i LXR su povezani sa supresijom proinflamatornih gena (E. K.-H. Chow, Razani, & Cheng, 2007). Takođe je pokazano da RXR kao homodimer ili heterodimerizacioni partner RAR-a blokira ekspresiju proinflamatornih citokina inhibicijom aktivacije NF- $\kappa$ B ili AP-1 (B. Li et al., 2021). Jedan od glavnih proinflamatornih citokina u OA je TNF- $\alpha$ . Sinovijalna tečnost, membrana i hrskavica u OA se karakterišu visokim nivoom ovog citokina (Wojdasiewicz, Poniatowski, & Szukiewicz, 2014). TNF- $\alpha$  reguliše sintezu alarmina, što je ključno za proces sterilne inflamacije. TNF- $\alpha$  takođe direktno kontroliše ekspresiju MMP-1, MMP-3 i MMP-13 u hondrocitima, koji su nosioci degradativnih procesa i remodelovanja hrskavice kod OA (Molnar et al., 2021). RXR regulacijom transkripcije gena za hemokine CCL6 i CCL9 takođe kontroliše infiltraciju zapaljenskih medijatora na mestu upale ili povrede (Núñez et al., 2010). RXR je takođe uključen u kontrolu fagocitne aktivnosti i fenotipa makrofaga, a samim tim i u održavanje autotolerance (Roszer et al., 2011).

Smanjena ekspresija RXR $\alpha$  u OA zglobnoj hrskavici je verovatno faktor koji doprinosi zapaljenju zglobova, pošto agonisti RXR smanjuju upalu izazvanu posredstvom proinflamatornih citokina (Collins-Racie et al., 2009). Ovo je veoma značajan nalaz sa aspekta perpetuacije zapaljenskog procesa budući da je TNF- $\alpha$  koji je glavna meta RXR agonista regulator produkcije alarmina iz aktiviranih sinovijalnih ćelija, hondrocita i nekrotičnih koštanih ćelija što bi mogao da predstavlja okidač za razvoj patologije (van den Bosch, 2019). RXR bi mogao imati ulogu i u kontroli zapaljenskog procesa u OA zglobu regulacijom infiltracije leukocita kao i modifikacijom ekspresije gena povezanih sa fagocitozom (Roszer et al., 2011). Pored toga, RXR ima sposobnost da spreči ćelijsko starenje regulacijom signalizacije kalcijuma i generisanja ROS-a i oštećenja DNK (Ma et al., 2018).

Ranije je utvrđeno da su varijante u genu za RXR $\alpha$  povezane sa rizikom od kolorektalnog tumora (rs7861779 i rs12004589) (Jacobs et al., 2010), tumora jajnika (rs749759) (Mostowska et al., 2016), glave i vrata (rs3118570) (Lee et al., 2011) i bubrega (Karami et al., 2009). Studija o tumoru dojke pokazala je da različite RXR $\alpha$  varijante imaju specifičnu ulogu u tumorogenezi i antitumorskom imunskom odgovoru kao markeri boljeg/lošijeg preživljavanja (Pande et al., 2013). Integrativna analiza GWAS podataka otkrila je da su geni za RXR i njihove varijante



uključene i u antivirusni imunski odgovor na infekciju HCV-om (R. Zhang et al., 2021), što je pokazano i kod odgovora na vakcinaciju protiv malih boginja (McKinney et al., 2016)

Budući da je glavna odlika RXR njegova sposobnost heterodimerizacije sa brojnim NR, jasno definisanje efekata ovog receptora je veoma teško. Dodatno i sam RXR kao homodimer može da ispoljava aktivnost, što otežava definisanje uloge specifično ovog receptora u patogenezi bilo koje bolesti, pa tako i u OA.

Razumevanje etiologije OA zahteva sveobuhvatne studije koje uzimaju u obzir genetsku predispoziciju, izloženost životnoj sredini, epigenetske modifikacije i interakcije gena i sredine. Genetska pozadina OA je kao i kod svake multifaktorijalne bolesti složena i uključuje više gena sa malim pojedinačnim efektima. Identifikovanje relevantnih genetičkih varijanti povezanih sa multifaktorijalnim bolestima zahteva velike studije asocijacije na nivou genoma i napredne statističke analize. Pored genetike, i faktori životne sredine poput ishrane, fizičke aktivnosti i pušenja igraju značajnu ulogu u razvoju i napredovanju bolesti. Kompleksne interakcije između genetičke podložnosti i faktora okoline oblikuju višestepene procese razvoja OA - od rizika od nastanka bolesti, preko progresije, do odgovora na lečenje. Personalizovani pristupi medicine mogu optimizovati ishode strategije za usporavanje progresije bolesti ili odlaganje početka bolesti što bi predstavljalo značajan napredak. Budućnost medicine zasnivaće se na integraciji genetičkih i epigenetičkih podataka u kombinaciji sa tradicionalnim kliničkim podacima. Personalizovana medicina i ciljana terapija predstavljaju osnov naprednih pristupa u tretmanu široko rasprostranjenih bolesti koje bi mogle da smanje rizik od pojave patologija. Iako je OA multifaktorijalna bolest u čijoj je osnovi ograničena regenerativna sposobnost tkiva hrskavice kao osnove zglobnog sistema, podaci epigenetike, genomike i proteomike bi mogli da omogućće napredak u dosadašnjem tretmanu OA.

Budući da je zapaljenska reakcija centralni deo patogeneze OA, strategije zasnovane na atenuaciji imunskih medijatora moraju biti pažljivo prilagođene specifičnom kontekstu bolesti, uzimajući u obzir i korisne i štetne efekte modulacije na patogenezu, ali i sam imunski odgovor domaćina. Biološki lekovi koji deluju na inflamatorne citokine do sada nisu bili efikasni u sprečavanju progresije OA (Grässel & Muschter, 2020). Nedavno osmišljene strategije imaju za cilj da inhibiraju zapaljenje u OA ciljanjem inicijatora proinflamatorne signalne kaskade, poput TLR. Svakako da bi procena inflamatornog statusa pojedinačnog pacijenta pomogla da se identifikuju specifičnosti zglobova i omogući terapija specifična barem za pojedinačne zapaljenske medijatore u zglobu. Modifikacija faktora signalnih kaskada poput MyD88, TRAF3/6, MAPK, Janus kinaze i NF- $\kappa$ B smatraju se obećavajućim pristupom, međutim, do sada nisu dobijeni značajni efekti (Grässel & Muschter, 2020). Stoga bi genetička pozadina zapaljenske signalizacije vođene TLR-ima mogla da predstavlja osnovu strategije za imunološku modulaciju i imunoterapiju.

Razumevanje interakcija i uticaja genetičkih varijacija na imunski odgovor posredovan TLR omogućilo bi razvijanje pristupa za selektivno pojačavanje ili suzbijanje aktivnosti TLR. Antagonisti TLR signalnog puta su se pojavili kao obećavajući terapeutici za bolesti, ali su sprovedena ograničena klinička ispitivanja. Razvijanje antagonista koji ciljaju na više TLR signalnih puteva koji se prepliću i nadopunjuju moglo bi olakšati prevođenje ovih modulatora u kliničku upotrebu (Gao, Xiong, Li, & Yang, 2017). Kontrola imunskih procesa naročito je bitna za malignu transformaciju, gde je TLR signalizacija značajna za aspekt imunonadzora i antitumorogene aktivnosti. Pokazano je da je uloga TLR-a u tumorogenezi je složena i zavisna

od konteksta, sa pro-tumorigenim i anti-tumorigenim efektima u zavisnosti od mikrookruženja. TLR može doprineti antitumorskim imunskim odgovorima pokretanjem mehanizama u odgovoru na ćelije raka ili molekule okruženja tumora. Međutim, oni takođe mogu podstaći rast i napredovanje tumora budući da je hronična zapaljenska reakcija povezana sa razvojem i napredovanjem većine tumora jer indukuje mikrookruženje pogodno za tumorigenezu (Sameer & Nissar, 2021). Imajući u vidu dvojni ulogu u tumoru, a takođe i raznovrsne uloge TLR u homeostatskom stanju, potrebno je sagledati i endogene regulatore ovih receptora koji bi mogli da doprinesu osmišljavanju novih pristupa u lečenju bolesti sa zapaljenskom komponentom.

Diferencijalna ekspresija različitih mikro RNK u OA i zdravom zglobu pokazala je da bi upravo mikro RNK mogle da imaju veliki terapijski potencijal (Zhou et al., 2020). Profili ekspresije tri ispitivane mikro RNK mogu biti modifikovani upotrebom agonista pojedinih članova TLR porodice. Agonist TLR4, LPS, pozitivno utiče na ekspresiju miR-155 i miR-146a u mezenhimalnim matičnim ćelijama dobijenim iz kostne srži. Takođe je i nivo ekspresije miR-196a podložan promeni usled stimulacije agonistom TLR2 (X. Wang, Zhu, Xu, Wang, & Liu, 2016). Istraživanja na animalnom modelu pokazala su da mikro RNK imaju mogućnost modulacije bola u OA. miR-21 posredstvom aktivacije TLR7 posreduje u bolu kod OA kolena (Hoshikawa, Sakai, Takai, & Suzuki, 2020). Varijante gena kako za TLR tako i za mikro RNK mogu uticati na terapije ciljane na TLR kod pacijenata sa OA. Personalizovani pristup, uključujući podatke o genotipizaciji i inflamatorni status, mogao bi poboljšati efikasnost kliničkih ispitivanja. Ovo, zajedno sa razvojem hondrotropnih lekova i biomarkera, može dovesti do budućeg lečenja OA.

Pored targetiranja TLR i regulatora njihove signalizacije, i pristupi koji su zasnovani na RXR dobijaju sve veću pažnju zbog svojih funkcija u imunski posredovanim procesima, prvenstveno u terapiji tumora, ali i u lečenju zapaljenskih poremećaja. Eksperimenti na animalnim modelima pokazali su da je anti-inflamatorni efekat selektivnog inhibitora all-*trans* retinoične kiseline (atRA), talarozola (sredstvo za blokiranje metabolizma retinoične kiseline, RAMBA) u tkivu hrskavice posredovan RXR/PPAR heterodimerom (Kamalathevan, Zhu, Muhammad, Furniss, & Vincent, 2022). Talarozol smanjuje ekspresiju inflamatornog gena u zglobnoj hrskavici, što ukazuje na atRA i ulogu njegovih receptora u zapaljenju zgloba u OA (Zhu et al., 2022). Ovo pokazuje da bi lekovi koji su povezani sa metabolizmom retinoične kiseline mogli potencijalno da se uključe u dizajniranje terapija za OA u budućnosti.

OA je složena bolest sa raznolikom genetičkom pozadinom i faktorima rizika životne sredine. Uprkos nedostatku pojedinačnih faktora rizika, do sada sprovedene studije su pružile bolje razumevanje promena na nivou genoma koje utiču na razvoj i napredovanje OA. Razumevanje uzroka poremećaja OA može dovesti do strategija za prevenciju i efikasnih tretmana. Identifikovanje gena i njihovih varijanti može otkriti biološke mehanizme, što dovodi do biomarkera za rano otkrivanje i novih terapijskih ciljeva. Uvid u gene koji su blisko povezani sa zapaljenskim procesom poput TLR i njihovih regulatornih mikro RNK, kao i gene koji su usko povezani sa metabolizmom tkiva konstituentata zgloba takođe bi trebalo da usmeri klasifikaciju OA ili način na koji se oboleli leče.

Iako je do sada istražen veliki broj imunskih medijatora i njihov doprinos patogenezi OA, brojne interakcije i preklapanje funkcija odlikavaju kompleksnost patoloških procesa koji tek treba da se definišu. Iako je postignut značajan napredak u razumevanju OA, još uvek postoji potreba za adekvatnim skriningom i efikasnijim terapijama, uključujući ciljane pristupe

zasnovane na novim biomarkerima. Genetsko ciljanje varijanti gena povezanih sa bolestima ima veliki potencijal za personalizovanu medicinu, dijagnostiku i terapiju. Napredak u genomici i bioinformatici omogućava identifikaciju novih asocijacija i prediktivnih modela rizika. Razumevanje genetičke kontrole bioloških procesa u osnovi OA omogućuje unapređenje našeg razumevanja patogeneze bolesti, poboljšanje dijagnostike i strategija lečenja i na kraju poboljšanje ishoda bolesti kod pacijenata sa OA. Tretman kompleksne bolesti poput OA trebalo bi da se zasniva na targetiranju svih aspekata oboljenja i da obuhvata terapije usmerene na zapaljenski proces, degradaciju matriksa hrskavice i remodelovanje kostiju kao osnovne patološke mehanizme bolesti.

Iako su nalazi studije ohrabrujući, postoje potencijalna ograničenja svojstvena dizajnu ove studije. Prvo, veličina uzorka studije bila je relativno mala što bi moglo da ograniči mogućnost otkrivanja malih, ali klinički značajnih efekata. Broj pacijenata bi mogao da bude ograničenje za generalizaciju nalaza u širem kontekstu, bilo na populacije drugih centara na pacijentima bilo kavkazoidnog ili drugačijeg porekla. Drugo, ova studija je sprovedena u jednom centru na uzorku ispitanika iz iste populacije, što može ograničiti generalizaciju rezultata na belu populaciju i određeni geografski region specifične genetičke pozadine. Takođe su ograničenja i demografska i klinička heterogenost učesnika studije, iako je dizajn studije podrazumevao striktno kriterijume pri stratifikaciji pacijenata. Uprkos činjenici da su dobijeni nalazi značajni za definisanje genetike OA, ispitan je ograničen broj varijanti gena povezanih sa rizikom za razvoj zapaljenskih bolesti i gena blisko povezanih sa genima uključenim u metabolizam kostiju.

Primetno je da su različite studije ukazale na različite alele kao varijante od interesa za OA što bi moglo da se dovede u vezu sa etiologijom, demografijom ili genetičkom pozadinom ispitivane populacije. Međutim, ova studija zajedno sa ostalim dostupnim rezultatima istraživanja sprovedenim na svetskim populacijama ukazuje da su genetičke promene prepoznate kao deo disregulacije imunskog sistema u zapaljenskim bolestima zglobova poput OA.

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

- Varijanta rs5743708 gena za TLR2 je statistički značajno povezana sa menopauzom, a postoji i tendencija ka povezanosti iste varijante sa pušenjem. Takođe je zapažena tendencija ka povezanosti varijante rs3853839 gena za TLR7 sa lokalizacijom oboljenja, kao i varijante rs187084 gena za TLR9 i većeg indeksa telesne mase.
- Varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 povezana je sa polom, prethodnom povredom zgloba, a postoji i tendencija ka povezanosti ove varijante sa većim BMI. Uočena je i povezanost varijante rs767649 gena za miR-155 sa ranom menopauzom, kao i trend ka povezanosti ovog polimorfizma sa polom.
- Varijanta rs7864987 gena za RXR $\alpha$  je povezana sa godinama starosti, a postoji i tendencija ka povezanosti sa većim indeksom telesne mase.
- Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova za obe ispitivane varijante gena za TLR4 (rs4986790 i rs4986791), kao i za varijantu gena TLR7 rs3853839 između kontrolne grupe i ispitanika sa OA.
- Statistički značajna razlika u distribuciji genotipova uočena je za varijantu rs11614913 gena za miR-196a-2 između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa OA.
- Statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa OA primećena je i za varijantu rs7864987 gena za RXR $\alpha$ , dok je za drugu ispitivanu RXR $\alpha$  varijantu, rs3118523, uočen trend ka statistički značajnoj razlici u učestalosti genotipova između kontrolne i grupe sa OA.
- Obe ispitivane varijante u genu za TLR4, rs4986790 i rs4986791, su značajno povezane sa povećanim rizikom od OA, kao i varijanta rs3853839 gena za TLR7.
- Varijanta rs11614913 gena za miR-196a-2 je povezana sa smanjenim rizikom od OA.
- Varijanta rs3118523 gena za RXR $\alpha$  povezana je sa smanjenim rizikom od OA, dok je rs7864987 varijanta, povezana sa povećanim rizikom od OA.

Neophodno je uključivanje većeg broja ispitanika sa dijagnostikovanim primarnim OA kao i uključivanje većeg broja ispitanika u kontrolnu grupu u daljem istraživanju kako bi se detaljnije ispitala uloga varijanti u genima za TLR, mikro RNK i RXR u patogenezi OA. Takođe bi bilo korisno analizirati veći broj varijanti u okviru pojedinačnih gena, ali i polimorfizme gena blisko lociranih ovim genima kao i njihovu međusobnu interakciju.

## 7. REFERENCE

- Agiannitopoulos, K., Samara, P., Papadopoulou, M., Efthymiadou, A., Papadopoulou, E., Tsaousis, G. N., ... Lamnissou, K. (2021). miRNA polymorphisms and risk of premature coronary artery disease. *Hellenic Journal of Cardiology: HJC = Hellenike Kardiologike Epitheorese*, 62(4), 278–284. doi: 10.1016/j.hjc.2020.01.005
- Agier, J., Źelechowska, P., Kozłowska, E., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2016). Expression of surface and intracellular Toll-like receptors by mature mast cells. *Central-European Journal of Immunology*, 41(4), 333–338. doi: 10.5114/ceji.2016.65131
- Ahmed, S. M., & Mstafa, R. J. (2022). Identifying Severity Grading of Knee Osteoarthritis from X-ray Images Using an Efficient Mixture of Deep Learning and Machine Learning Models. *Diagnostics*, 12(12), 2939. doi: 10.3390/diagnostics12122939
- Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., ... Miyake, K. (2003). Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: Higher affinity than that with MD-2 or CD14. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(7), 1035–1042. doi: 10.1084/jem.20031076
- Aktaş, T., Celik, S. K., Genc, G. C., Arpacı, D., Can, M., & Dursun, A. (2020). Higher Levels of Serum TLR2 and TLR4 in Patients with Hashimoto's Thyroiditis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 20(1), 118–126. doi: 10.2174/1871530319666190329114621
- Alemán-Ávila, I., Jiménez-Morales, M., Beltrán-Ramírez, O., Barbosa-Cobos, R. E., Jiménez-Morales, S., Sánchez-Muñoz, F., ... Ramírez-Bello, J. (2017). Functional polymorphisms in pre-miR146a and pre-miR499 are associated with systemic lupus erythematosus but not with rheumatoid arthritis or Graves' disease in Mexican patients. *Oncotarget*, 8(54), 91876–91886. doi: 10.18632/oncotarget.19621
- Allen, K. D., Thoma, L. M., & Golightly, Y. M. (2022). Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(2), 184–195. doi: 10.1016/j.joca.2021.04.020
- Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*, 9, 2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379
- Anderson, A. S., & Loeser, R. F. (2010). Why is Osteoarthritis an Age-Related Disease? *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 24(1), 15. doi: 10.1016/j.berh.2009.08.006
- Arenas-Padilla, M., & Mata-Haro, V. (2018). Regulation of TLR signaling pathways by microRNAs: Implications in inflammatory diseases. *Central-European Journal of Immunology*, 43(4), 482–489. doi: 10.5114/ceji.2018.81351
- Asami, J., & Shimizu, T. (2021). Structural and functional understanding of the toll-like receptors. *Protein Science*, 30(4), 761–772. doi: 10.1002/pro.4043
- Aubourg, G., Rice, S. J., Bruce-Wootton, P., & Loughlin, J. (2022). Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(5), 636–649. doi: 10.1016/j.joca.2021.03.002
- Balbaloglu, O., Sabah Ozcan, S., Korkmaz, M., & Yilmaz, N. (2017). Promoter polymorphism (T-1486C) of TLR-9 gene is associated with knee osteoarthritis in a Turkish population. *Journal of Orthopaedic*

- Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 35(11), 2484–2489. doi: 10.1002/jor.23559
- Balistreri, C. R., Grimaldi, M. P., Chiappelli, M., Licastro, F., Castiglia, L., Listì, F., ... Candore, G. (2008). Association between the polymorphisms of TLR4 and CD14 genes and Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 14(26), 2672–2677. doi: 10.2174/138161208786264089
- Banerjee, S., Thompson, W. E., & Chowdhury, I. (2021). Emerging roles of microRNAs in the regulation of Toll-like receptor (TLR)-signaling. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 26(4), 771–796. doi: 10.2741/4917
- Barreto, G., Manninen, M., & K. Eklund, K. (2020). Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. *Biology*, 9(4), 65. doi: 10.3390/biology9040065
- Bayraktar, R., Bertilaccio, M. T. S., & Calin, G. A. (2019). The Interaction Between Two Worlds: MicroRNAs and Toll-Like Receptors. *Frontiers in Immunology*, 10, 1053. doi: 10.3389/fimmu.2019.01053
- Boer, C. G., Hatzikotoulas, K., Southam, L., Stefánsdóttir, L., Zhang, Y., Coutinho de Almeida, R., ... Zeggini, E. (2021). Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. *Cell*, 184(18), 4784–4818.e17. doi: 10.1016/j.cell.2021.07.038
- Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure*, 19(4), 447–459. doi: 10.1016/j.str.2011.02.004
- Campbell, F. C., Xu, H., El-Tanani, M., Crowe, P., & Bingham, V. (2010). The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: Operational networks and tissue-specific growth control. *Biochemical Pharmacology*, 79(1), 1–9. doi: 10.1016/j.bcp.2009.09.005
- Campolo, M., Filippone, A., Biondo, C., Mancuso, G., Casili, G., Lanza, M., ... Paterniti, I. (2020). TLR7/8 in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9384. doi: 10.3390/ijms21249384
- Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, 36(3), 413–425. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001
- Chen, C., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S. M., & Yao, Q. (2011). MicroRNA-196: Critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(1), 14–23. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01219.x
- Chen, T., Weng, W., Liu, Y., Aspera-Werz, R. H., Nüssler, A. K., & Xu, J. (2021). Update on Novel Non-Operative Treatment for Osteoarthritis: Current Status and Future Trends. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 755230. doi: 10.3389/fphar.2021.755230
- Chen, Y., Lin, J., Zhao, Y., Ma, X., & Yi, H. (2021). Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 22(8), 609–632. doi: 10.1631/jzus.B2000808
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., ... Cremer, I. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1285–1297. doi: 10.1172/JCI36551
- Cho, S., Lee, H.-M., Yu, I.-S., Choi, Y. S., Huang, H.-Y., Hashemifar, S. S., ... Lu, L.-F. (2018). Differential cell-intrinsic regulations of germinal center B and T cells by miR-146a and miR-146b. *Nature Communications*, 9(1), 2757. doi: 10.1038/s41467-018-05196-3

- Chow, E. K.-H., Razani, B., & Cheng, G. (2007). Innate immune system regulation of nuclear hormone receptors in metabolic diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, *82*(2), 187–195. doi: 10.1189/jlb.1206741
- Chow, Y. Y., & Chin, K.-Y. (2020). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, *2020*, 1–19. doi: 10.1155/2020/8293921
- Collins-Racie, L. A., Yang, Z., Arai, M., Li, N., Majumdar, M. K., Nagpal, S., ... LaVallie, E. R. (2009). Global analysis of nuclear receptor expression and dysregulation in human osteoarthritic articular cartilage: Reduced LXR signaling contributes to catabolic metabolism typical of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *17*(7), 832–842. doi: 10.1016/j.joca.2008.12.011
- Cooper, D. N. (2010). Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. *Human Genomics*, *4*(5), 284–288. doi: 10.1186/1479-7364-4-5-284
- Dasu, M. R., Thangappan, R. K., Bourgette, A., DiPietro, L. A., Isseroff, R., & Jialal, I. (2010). TLR2 expression and signaling-dependent inflammation impair wound healing in diabetic mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *90*(11), 1628–1636. doi: 10.1038/labinvest.2010.158
- de Almeida, N. R., & Conda-Sheridan, M. (2019). A review of the molecular design and biological activities of RXR agonists. *Medicinal Research Reviews*, *39*(4), 1372–1397. doi: 10.1002/med.21578
- De La Cruz-Castillejos, J., Barbosa-Cobos, R., Becerril-Mendoza, L., Lugo-Zamudio, G., Ramírez-Bello, J., Matias-Carmona, M., & Alemán-Ávila, I. (2017). AB0242 Evaluation of variants in MIR-146A, MIR-196A-2 and MIR-499 and their association with susceptibility for rheumatoid arthritis and its extra-articular manifestations. *Abstracts Accepted for Publication*, 1133.1-1133. BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.6500
- Deane, J. A., Pisitkun, P., Barrett, R. S., Feigenbaum, L., Town, T., Ward, J. M., ... Bolland, S. (2007). Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*, *27*(5), 801–810. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.009
- Di Lorenzo, A., Bolli, E., Tarone, L., Cavallo, F., & Conti, L. (2020). Toll-Like Receptor 2 at the Crossroad between Cancer Cells, the Immune System, and the Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9418. doi: 10.3390/ijms21249418
- Dickson, B. M., Roelofs, A. J., Rochford, J. J., Wilson, H. M., & De Bari, C. (2019). The burden of metabolic syndrome on osteoarthritic joints. *Arthritis Research & Therapy*, *21*, 289. doi: 10.1186/s13075-019-2081-x
- Ding, J. B., & Hu, K. (2021). Injectable therapies for knee osteoarthritis. *Reumatologia*, *59*(5), 330–339. doi: 10.5114/reum.2021.110612
- Dioguardi, M., Cantore, S., Sovereto, D., La Femina, L., Caloro, G. A., Spirito, F., ... Ballini, A. (2022). Potential Role of miR-196a and miR-196b as Prognostic Biomarkers of Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review, Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Life*, *12*(8), 1269. doi: 10.3390/life12081269
- Douzandeh-Mobarrez, B., Kariminik, A., Kazemi Arababadi, M., & Kheirkhah, B. (2022). TLR9 in the Human Papilloma Virus Infections: Friend or Foe? *Viral Immunology*, *35*(7), 457–464. doi: 10.1089/vim.2021.0223

- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2022). Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology*, *13*. doi: 10.3389/fimmu.2022.812774
- Duroux-Richard, I., Robin, M., Peillex, C., & Apparailly, F. (2019). MicroRNAs: Fine Tuners of Monocyte Heterogeneity. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2145. doi: 10.3389/fimmu.2019.02145
- Eckmann, L. (2004). Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Current Opinion in Gastroenterology*, *20*(2), 82–88. doi: 10.1097/00001574-200403000-00006
- Egloff, C., Hügler, T., & Valderrabano, V. (2012). Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Medical Weekly*, *142*, w13583. doi: 10.4414/smw.2012.13583
- El-Bendary, M., Neamatallah, M., Elalfy, H., Besheer, T., Elkholy, A., El-Diasty, M., ... Esmat, G. (2018). The association of single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8 genes with the susceptibility to HCV infection. *British Journal of Biomedical Science*, *75*(4), 175–181. doi: 10.1080/09674845.2018.1492186
- El-Hefnawy, S. M., Eid, H. A., Mostafa, R. G., Soliman, S. S., Omar, T. A., & Azmy, R. M. (2022). COVID-19 susceptibility, severity, clinical outcome and Toll-like receptor (7) mRNA expression driven by TLR7 gene polymorphism (rs3853839) in middle-aged individuals without previous comorbidities. *Gene Reports*, *27*, 101612. doi: 10.1016/j.genrep.2022.101612
- El-Zayat, S. R., Sibai, H., & Mannaa, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: An overview. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1), 187. doi: 10.1186/s42269-019-0227-2
- Estruch, M., Bancells, C., Beloki, L., Sanchez-Quesada, J. L., Ordóñez-Llanos, J., & Benitez, S. (2013). CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis*, *229*(2), 356–362. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.011
- Emem, E. O., Elyas, H., Ozgocmen, S., Yildirim, A., & Godekmerdan, A. (2011). The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology International*, *31*(10), 1369–1374. doi: 10.1007/s00296-010-1472-8
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, *157*(1), 255–266. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.012
- Fehri, E., Ennaifer, E., Bel Haj Rhouma, R., Ardhaoui, M., & Boubaker, S. (2023). TLR9 and Glioma: Friends or Foes? *Cells*, *12*(1), 152. doi: 10.3390/cells12010152
- Ferwerda, B., McCall, M. B. B., Alonso, S., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Mouktaroudi, M., Izagirre, N., ... Netea, M. G. (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(42), 16645–16650. doi: 10.1073/pnas.0704828104
- Figuerola, L., Xiong, Y., Song, C., Piao, W., Vogel, S. N., & Medvedev, A. E. (2012). The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *188*(9), 4506–4515. doi: 10.4049/jimmunol.1200202
- Fisch, K. M., Saito, M., Akagi, R., Duffy, S., Alvarez-Garcia, O., Grogan, S., ... Lotz, M. K. (2014). Integrative Omics profiling of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*, S231–S232. doi: 10.1016/j.joca.2014.02.446
- Flo, T. H., Halaas, O., Torp, S., Ryan, L., Lien, E., Dybdahl, B., ... Espevik, T. (2001). Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *69*(3), 474–481.



- Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J., & Nugraha, J. (2020). TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Network*, 20(3), e21. doi: 10.4110/in.2020.20.e21
- Foster, N. E., Eriksson, L., Deveza, L., & Hall, M. (2023). Osteoarthritis year in review 2022: Epidemiology & therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(7), 876–883. doi: 10.1016/j.joca.2023.03.008
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 8, 508. doi: 10.3389/fphys.2017.00508
- Goldring, M. B., & Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis: *Current Opinion in Rheumatology*, 23(5), 471–478. doi: 10.1097/BOR.0b013e328349c2b1
- Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., Kedl, R. M., Kieper, W. C., Qiu, X., ... Vasilakos, J. P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(3), 1259–1268. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1259
- Gowin, E., Świątek-Kościelna, B., Kałużna, E., Nowak, J., Michalak, M., Wysocki, J., & Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2017). Analysis of TLR2, TLR4, and TLR9 single nucleotide polymorphisms in children with bacterial meningitis and their healthy family members. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 60, 23–28. doi: 10.1016/j.ijid.2017.04.024
- Grässel, S., & Muschter, D. (2020). Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-325. doi: 10.12688/f1000research.22115.1
- Guan, Y., Ranao, D. R. E., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J., & Tapping, R. I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(9), 5094–5103. doi: 10.4049/jimmunol.0901888
- Haehnel, V., Schwarzfischer, L., Fenton, M. J., & Rehli, M. (2002). Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(11), 5629–5637. doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5629
- Hamann, L., Glaeser, C., Hamprecht, A., Gross, M., Gomma, A., & Schumann, R. R. (2006). Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 364(1–2), 303–307. doi: 10.1016/j.cca.2005.07.017
- Hao, L., Zhong, W., Sun, X., & Zhou, Z. (2021). TLR9 Signaling Protects Alcohol-Induced Hepatic Oxidative Stress but Worsens Liver Inflammation in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 12. doi: 10.3389/fphar.2021.709002
- Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Haussler, C. A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., & Jurutka, P. W. (2013). Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue International*, 92(2), 77–98. doi: 10.1007/s00223-012-9619-0
- He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., & Cao, X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular Immunology*, 44(11), 2850–2859. doi: 10.1016/j.molimm.2007.01.022
- He, X., Jing, Z., & Cheng, G. (2014). MicroRNAs: New regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*, 2014, 945169. doi: 10.1155/2014/945169

- Helmick, C. G., Felson, D. T., Lawrence, R. C., Gabriel, S., Hirsch, R., Kwoh, C. K., ... National Arthritis Data Workgroup. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. *Arthritis & Rheumatism*, *58*(1), 15–25. doi: 10.1002/art.23177
- Hernandez, C. J. (2017). The Microbiome and Bone and Joint Disease. *Current Rheumatology Reports*, *19*(12), 77. doi: 10.1007/s11926-017-0705-1
- Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S., & Dirsch, V. M. (2018). Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnology Advances*, *36*(6), 1657–1698. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.003
- Hold, G. L., Berry, S., Saunders, K. A., Drew, J., Mayer, C., Brookes, H., ... Bryant, C. E. (2014). The TLR4 D299G and T399I SNPs are constitutively active to up-regulate expression of Trif-dependent genes. *PloS One*, *9*(11), e111460. doi: 10.1371/journal.pone.0111460
- Hornung, V., Barchet, W., Schlee, M., & Hartmann, G. (2008). RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (183), 71–86. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3\_4
- Hoshikawa, N., Sakai, A., Takai, S., & Suzuki, H. (2020). Targeting Extracellular miR-21-TLR7 Signaling Provides Long-Lasting Analgesia in Osteoarthritis. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *19*, 199–207. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.011
- Hu, X., Ye, J., Qin, A., Zou, H., Shao, H., & Qian, K. (2015). Both MicroRNA-155 and Virus-Encoded MiR-155 Ortholog Regulate TLR3 Expression. *PloS One*, *10*(5), e0126012. doi: 10.1371/journal.pone.0126012
- Huang, Y., Yi, X., Jian, Z., Wei, C., Li, S., Cai, C., ... Li, C. (2013). A single-nucleotide polymorphism of miR-196a-2 and vitiligo: An association study and functional analysis in a Han Chinese population. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *26*(3), 338–347. doi: 10.1111/pcmr.12081
- Hussein, S., Lasheen, A. E. S., Abdelrahman, A. A., Al-Karamany, A. S., Sameh, R., & Algazeery, A. (2022). Association between miR-196a-2 Gene Polymorphism and Ovarian Cancer Prognosis in Egyptian Females. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *23*(5), 1761–1768. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.5.1761
- Ibrahim, A. A., Ramadan, A., Wahby, A. A., Hassan, M., Soliman, H. M., & Abdel Hamid, T. A. (2019). Micro-RNA 196a2 expression and miR-196a2 (rs11614913) polymorphism in T1DM: A pilot study. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, *32*(10), 1171–1179. doi: 10.1515/jpem-2019-0226
- Iyer, S., Margulies, B. S., & Kerr, W. G. (2013). Role of SHIP1 in bone biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1280*, 11–14. doi: 10.1111/nyas.12091
- Jacobs, E. T., Martínez, M. E., Campbell, P. T., Conti, D. V., Duggan, D., Figueiredo, J. C., ... Baron, J. A. (2010). Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis*, *31*(8), 1412–1416. doi: 10.1093/carcin/bgq127
- Jimenez-Dalmaroni, M. J., Xiao, N., Corper, A. L., Verdino, P., Ainge, G. D., Larsen, D. S., ... Wilson, I. A. (2009). Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PloS One*, *4*(10), e7411. doi: 10.1371/journal.pone.0007411
- Jin, L., Zhao, J., Jing, W., Yan, S., Wang, X., Xiao, C., & Ma, B. (2014). Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, *34*(2), 451–463. doi: 10.3892/ijmm.2014.1808

- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., & Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Medicine*, *9*(2), 213–219. doi: 10.1038/nm820
- Joshi, S. R., McLendon, J. M., Comer, B. S., & Gerthoffer, W. T. (2011). MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. *Pulmonary Circulation*, *1*(3), 357–364. doi: 10.4103/2045-8932.87301
- Kagele, D. A., & O’Connell, R. M. (2015). MicroRNAs in Hematopoietic Stem Cell Biology. In *MicroRNA in Regenerative Medicine* (pp. 329–348). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-405544-5.00013-7
- Kamathevan, P., Zhu, L., Muhammad, H., Furniss, D., & Vincent, T. (2022). MAINTAINING ALL-TRANS RETINOIC ACID LEVELS WITH TALAROZOLE SUPPRESSES MECHANFLAMMATION FOLLOWING CARTILAGE INJURY THROUGH A PERIXOSOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR GAMMA-DEPENDENT MECHANISM. *Osteoarthritis and Cartilage*, *30*, S181. doi: 10.1016/j.joca.2022.02.240
- Karami, S., Brennan, P., Rosenberg, P. S., Navratilova, M., Mates, D., Zaridze, D., ... Moore, L. E. (2009). Analysis of SNPs and haplotypes in vitamin D pathway genes and renal cancer risk. *PLoS One*, *4*(9), e7013. doi: 10.1371/journal.pone.0007013
- Kashani, B., Zandi, Z., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Bashash, D., & Ghaffari, S. H. (2021). The role of toll-like receptor 4 (TLR4) in cancer progression: A possible therapeutic target? *Journal of Cellular Physiology*, *236*(6), 4121–4137. doi: 10.1002/jcp.30166
- Kassiotis, G., & Stoye, J. P. (2016). Immune responses to endogenous retroelements: Taking the bad with the good. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(4), 207–219. doi: 10.1038/nri.2016.27
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
- Kim, J. J., & Sears, D. D. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterology Research and Practice*, *2010*, 212563. doi: 10.1155/2010/212563
- Knights, A. J., Redding, S. J., & Maerz, T. (2023). Inflammation in osteoarthritis: The latest progress and ongoing challenges. *Current Opinion in Rheumatology*, *35*(2), 128–134. doi: 10.1097/BOR.0000000000000923
- Kohn, M. D., Sassoon, A. A., & Fernando, N. D. (2016). Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *474*(8), 1886–1893. doi: 10.1007/s11999-016-4732-4
- Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in Immunology*, *33*(9), 449–458. doi: 10.1016/j.it.2012.05.002
- Könner, A. C., & Brüning, J. C. (2011). Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *22*(1), 16–23. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.007
- Kou, M., & Wang, L. (2023). Surface toll-like receptor 9 on immune cells and its immunomodulatory effect. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1259989. doi: 10.3389/fimmu.2023.1259989
- Krężel, W., Rühl, R., & de Lera, A. R. (2019). Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *491*, 110436. doi: 10.1016/j.mce.2019.04.016
- Krishnan, Y., & Grodzinsky, A. J. (2018). Cartilage diseases. *Matrix Biology*, *71–72*, 51–69. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.005

- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., & Colonna, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*, *103*(4), 1433–1437. doi: 10.1182/blood-2003-08-2674
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(7), 795–804. doi: 10.1016/j.addr.2007.12.004
- Kutikhin, A. G. (2011). Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Human Immunology*, *72*(11), 1095–1116. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.307
- Labbaye, C., & Testa, U. (2012). The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, *5*, 13. doi: 10.1186/1756-8722-5-13
- Lannoy, V., Côté-Biron, A., Asselin, C., & Rivard, N. (2023). TIRAP, TRAM, and Toll-Like Receptors: The Untold Story. *Mediators of Inflammation*, *2023*, 2899271. doi: 10.1155/2023/2899271
- Lazarus, R., Klimecki, W. T., Raby, B. A., Vercelli, D., Palmer, L. J., Kwiatkowski, D. J., ... Weiss, S. T. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): Frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case–control disease association studies☆☆This work was supported by Programs for Genomic Applications, Grant U01 HL66795, Innate Immunity in Heart, Lung and Blood Disease, from the National Heart, Lung and Blood Institute. *Genomics*, *81*(1), 85–91. doi: 10.1016/S0888-7543(02)00022-8
- le Maire, A., Teyssier, C., Balaguer, P., Bourguet, W., & Germain, P. (2019). Regulation of RXR-RAR Heterodimers by RXR- and RAR-Specific Ligands and Their Combinations. *Cells*, *8*(11), 1392. doi: 10.3390/cells8111392
- Leal, A. S., Reich, L. A., Moerland, J. A., Zhang, D., & Liby, K. T. (2021). Potential therapeutic uses of retinoids. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 91, pp. 141–183). Elsevier. doi: 10.1016/bs.apha.2021.01.004
- Lee, J. J., Wu, X., Hildebrandt, M. A. T., Yang, H., Khuri, F. R., Kim, E., ... Hong, W. K. (2011). Global assessment of genetic variation influencing response to retinoid chemoprevention in head and neck cancer patients. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(2), 185–193. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0125
- Li, B., Cai, S.-Y., & Boyer, J. L. (2021). The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1867*(5), 166085. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166085
- Li, M., Zhou, Y., Feng, G., & Su, S. B. (2009). The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. *Current Molecular Medicine*, *9*(3), 365–374. doi: 10.2174/156652409787847137
- Li, S.-C., Shi, H., Khan, M., Caplin, M., Meyer, T., Öberg, K., & Giandomenico, V. (2015). Roles of miR-196a on gene regulation of neuroendocrine tumor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *412*, 131–139. doi: 10.1016/j.mce.2015.06.003
- Li, Tao, Niu, L., Wu, L., Gao, X., Li, M., Liu, W., ... Liu, D. (2015). A functional polymorphism in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(5), 3279–3284. doi: 10.1007/s13277-014-2957-y

- Li, Ting, Peng, J., Li, Q., Shu, Y., Zhu, P., & Hao, L. (2022). The Mechanism and Role of ADAMTS Protein Family in Osteoarthritis. *Biomolecules*, *12*(7), 959. doi: 10.3390/biom12070959
- Liu, Shuyu, Deng, Z., Chen, K., Jian, S., Zhou, F., Yang, Y., ... Zhu, W. (2022). Cartilage tissue engineering: From proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review). *Molecular Medicine Reports*, *25*(3), 1–15. doi: 10.3892/mmr.2022.12615
- Liu, Songyang, Cao, C., Zhang, Y., Liu, G., Ren, W., Ye, Y., & Sun, T. (2019). PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF- $\alpha$ -induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *14*(1), 425. doi: 10.1186/s13018-019-1394-4
- Liu, W., Wu, Y.-H., Zhang, L., Xue, B., Wang, Y., Liu, B., ... Ji, Y. (2018). MicroRNA-146a suppresses rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and inflammatory responses by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget*, *9*(35), 23944–23959. doi: 10.18632/oncotarget.24050
- Liu-Bryan, R., & Terkeltaub, R. (2015). Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, *11*(1), 35–44. doi: 10.1038/nrrheum.2014.162
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(6), 1697–1707. doi: 10.1002/art.34453
- Lu, L.-F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L.-L., Taganov, K. D., Hanada, T., ... Rudensky, A. Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, *142*(6), 914–929. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.012
- Ma, X., Warnier, M., Raynard, C., Ferrand, M., Kirsh, O., Defossez, P.-A., ... Bernard, D. (2018). The nuclear receptor RXRA controls cellular senescence by regulating calcium signaling. *Aging Cell*, *17*(6), e12831. doi: 10.1111/acel.12831
- Mahesh, G., & Biswas, R. (2019). MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *39*(6), 321–330. doi: 10.1089/jir.2018.0155
- Mann, M., Barad, O., Agami, R., Geiger, B., & Hornstein, E. (2010). miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(36), 15804–15809. doi: 10.1073/pnas.0915022107
- Mann, M., Mehta, A., Zhao, J. L., Lee, K., Marinov, G. K., Garcia-Flores, Y., ... Baltimore, D. (2017). An NF- $\kappa$ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nature Communications*, *8*(1), 851. doi: 10.1038/s41467-017-00972-z
- Matsumoto, M., Oshiumi, H., & Seya, T. (2011). Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Reviews in Medical Virology*, *21*(2), 67–77. doi: 10.1002/rmv.680
- McAlinden, A., Varghese, N., Wirthlin, L., & Chang, L.-W. (2013). Differentially expressed microRNAs in chondrocytes from distinct regions of developing human cartilage. *PLoS One*, *8*(9), e75012. doi: 10.1371/journal.pone.0075012
- McKinney, B. A., Lareau, C., Oberg, A. L., Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., & Poland, G. A. (2016). The Integration of Epistasis Network and Functional Interactions in a GWAS Implicates RXR Pathway Genes in the Immune Response to Smallpox Vaccine. *PLoS One*, *11*(8), e0158016. doi: 10.1371/journal.pone.0158016

- Means, T. K. (2011). Toll-Like Receptors in SLE. In *Systemic Lupus Erythematosus* (pp. 293–306). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374994-9.10017-8
- Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 12(3), e1627. doi: 10.1002/wrna.1627
- Mehrjoei, B., Haghazari, L., Bashiri, H., & Rezvani, N. (2024). The diagnostic potential of miR-196a-1 in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 24(1), 162. doi: 10.1186/s12885-024-11881-y
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., & Matikainen, S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and Immunity*, 2(6), 349–355. doi: 10.1038/sj.gene.6363791
- Miranda-Hernandez, S., & Baxter, A. G. (2013). Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 2(1), 75–93.
- Mobasheri, A., & Batt, M. (2016). An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(5–6), 333–339. doi: 10.1016/j.rehab.2016.07.004
- Mohammed, S. R., Shaker, O. G., Mohammed, A. A., Fouad, N. A., Hussein, H. A., Ahmed, N. A., ... Ibrahim, A. A. (2021). Impact of miR-155 (rs767649 A>T) and miR-146a (rs57095329 A>G) polymorphisms in System Lupus Erythematosus susceptibility in an Egyptian cohort. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(3), 1425–1435. doi: 10.26355/eurrev\_202102\_24850
- Molnar, V., Matišić, V., Kodvanj, I., Bjelica, R., Jeleč, Ž., Hudetz, D., ... Primorac, D. (2021). Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9208. doi: 10.3390/ijms22179208
- Monie, T. P. (2017). *The innate immune system: A compositional and functional perspective*. London San Diego Cambridge Oxford: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Moran-Moguel, M. C., Petarra-Del Rio, S., Mayorquin-Galvan, E. E., & Zavala-Cerna, M. G. (2018). Rheumatoid Arthritis and miRNAs: A Critical Review through a Functional View. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2474529. doi: 10.1155/2018/2474529
- Mostowska, A., Sajdak, S., Pawlik, P., Lianeri, M., & Jagodzinski, P. P. (2016). Polymorphic variants in the vitamin D pathway genes and the risk of ovarian cancer among non-carriers of BRCA1/BRCA2 mutations. *Oncology Letters*, 11(2), 1181–1188. doi: 10.3892/ol.2015.4033
- Nejati-Azar, A., & Alivand, M. R. (2018). miRNA 196a2(rs11614913) & 146a(rs2910164) polymorphisms & breast cancer risk for women in an Iranian population. *Personalized Medicine*, 15(4), 279–289. doi: 10.2217/pme-2017-0088
- Nishimoto, S., Fukuda, D., & Sata, M. (2020). Emerging roles of Toll-like receptor 9 in cardiometabolic disorders. *Inflammation and Regeneration*, 40(1), 18. doi: 10.1186/s41232-020-00118-7
- Núñez, V., Alameda, D., Rico, D., Mota, R., Gonzalo, P., Cedenilla, M., ... Ricote, M. (2010). Retinoid X receptor alpha controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10626–10631. doi: 10.1073/pnas.0913545107
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1604–1609. doi: 10.1073/pnas.0610731104

- Ohta, Y., Okabe, T., Larmour, C., Di Rocco, A., Maijenburg, M. W., Phillips, A., ... Iwamoto, M. (2015). Articular cartilage endurance and resistance to osteoarthritic changes require transcription factor Erg. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *67*(10), 2679–2690. doi: 10.1002/art.39243
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, *3*, 79. doi: 10.3389/fimmu.2012.00079
- Olivieri, F., Prattichizzo, F., Giuliani, A., Matakchione, G., Rippo, M. R., Sabbatinelli, J., & Bonafè, M. (2021). miR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, *70*, 101374. doi: 10.1016/j.arr.2021.101374
- O'Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, *32*(2), 312–326. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.007
- Orlowsky, E. W., & Kraus, V. B. (2015). The Role of Innate Immunity in Osteoarthritis: When Our First Line of Defense Goes On the Offensive. *The Journal of Rheumatology*, *42*(3), 363–371. doi: 10.3899/jrheum.140382
- Otero, M. J. i. (2012). Dendritic cells (DC) and their Toll-like receptors (TLR): Vital elements at the core of all individual immune responses. On the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011 awarded to Bruce A. Beutler, Jules A. Hoffmann, and Ralph M. Steinman. *Contributions to science*, *8*(1), 61–68.
- Overton, C., Nelson, A. E., & Neogi, T. (2022). Osteoarthritis Treatment Guidelines from Six Professional Societies: Similarities and Differences. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, *48*(3), 637–657. doi: 10.1016/j.rdc.2022.03.009
- Pan, J., Guleria, R. S., Zhu, S., & Baker, K. M. (2014). Molecular Mechanisms of Retinoid Receptors in Diabetes-Induced Cardiac Remodeling. *Journal of Clinical Medicine*, *3*(2), 566–594. doi: 10.3390/jcm3020566
- Pande, M., Thompson, P. A., Do, K.-A., Sahin, A. A., Amos, C. I., Frazier, M. L., ... Brewster, A. M. (2013). Genetic variants in the vitamin D pathway and breast cancer disease-free survival. *Carcinogenesis*, *34*(3), 587–594. doi: 10.1093/carcin/bgs369
- Papathanasiou, I., Balis, C., Trachana, V., Mourmoura, E., & Tsezou, A. (2020). The synergistic function of miR-140-5p and miR-146a on TLR4-mediated cytokine secretion in osteoarthritic chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *522*(3), 783–791. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.168
- Patel, P. S., Buras, E. D., & Balasubramanyam, A. (2013). The role of the immune system in obesity and insulin resistance. *Journal of Obesity*, *2013*, 616193. doi: 10.1155/2013/616193
- Paterson, M. R., & Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: A family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics*, *49*(4), 243–252. doi: 10.1152/physiolgenomics.00133.2016
- Pelttari, K., Barbero, A., & Martin, I. (2015). A potential role of homeobox transcription factors in osteoarthritis. *Annals of Translational Medicine*, *3*(17), 254. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.44
- Petes, C., Odoardi, N., & Gee, K. (2017). The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1075. doi: 10.3389/fimmu.2017.01075
- Piccinini, A. M., & Midwood, K. S. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation*, *2010*. doi: 10.1155/2010/672395

- Raafat, I. I., El Guindy, N., Shahin, R. M. H., Samy, L. A., & El Refai, R. M. (2018). Toll-like receptor 7 gene single nucleotide polymorphisms and the risk for systemic lupus erythematosus: A case-control study. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, *77*(5), 416–420. doi: 10.1007/s00393-017-0283-7
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. T. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(20), 2985–2996. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.2985
- Ranjha, R., Meena, N. K., Singh, A., Ahuja, V., & Paul, J. (2017). Association of miR-196a-2 and miR-499 variants with ulcerative colitis and their correlation with expression of respective miRNAs. *PLoS One*, *12*(3), e0173447. doi: 10.1371/journal.pone.0173447
- Ranjith-Kumar, C. T., Miller, W., Sun, J., Xiong, J., Santos, J., Yarbrough, I., ... Kao, C. C. (2007). Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(24), 17696–17705. doi: 10.1074/jbc.M700209200
- Reynard, L. N., & Loughlin, J. (2013). Insights from human genetic studies into the pathways involved in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *9*(10), 573–583. doi: 10.1038/nrrheum.2013.121
- Rezaei, N., & Keshavarz-Fathi, M. (2019). *Vaccines for cancer immunotherapy: An evidence-based review on current status and future perspectives*. London San Diego Cambridge, MA Oxford: Elsevier/Academic Press.
- Rogero, M. M., & Calder, P. C. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, *10*(4), 432. doi: 10.3390/nu10040432
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, *18*(4). doi: 10.4110/in.2018.18.e27
- Rönn, K., Reischl, N., Gautier, E., & Jacobi, M. (2011). Current Surgical Treatment of Knee Osteoarthritis. *Arthritis*, *2011*, 454873. doi: 10.1155/2011/454873
- Rosenberg, J. H., Rai, V., Dilisio, M. F., Sekundiak, T. D., & Agrawal, D. K. (2017). Increased expression of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in osteoarthritis of human knee joint compared to hip joint. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *436*(1–2), 59–69. doi: 10.1007/s11010-017-3078-x
- Röszer, T., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Cedenilla, M., & Ricote, M. (2013). Retinoid X receptors in macrophage biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *24*(9), 460–468. doi: 10.1016/j.tem.2013.04.004
- Roszer, T., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Lefterova, M. I., Alameda, D., Núñez, V., Lazar, M. A., ... Ricote, M. (2011). Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *186*(1), 621–631. doi: 10.4049/jimmunol.1002230
- Roy, J., Jain, N., Singh, G., Das, B., & Mallick, B. (2019). Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility. In *AGO-Driven Non-Coding RNAs* (pp. 101–136). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-815669-8.00005-1
- Saba, R., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2014). MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*, *5*, 578. doi: 10.3389/fimmu.2014.00578
- Saber, M. M., Monir, N., Awad, A. S., Elsherbiny, M. E., & Zaki, H. F. (2022). TLR9: A friend or a foe. *Life Sciences*, *307*, 120874. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120874



- Sacre, S. M., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Amjadi, P., Lundberg, A., Giddins, G., ... Foxwell, B. M. (2007). The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Pathology*, *170*(2), 518–525. doi: 10.2353/ajpath.2007.060657
- Saito, K., Inagaki, K., Kamimoto, T., Ito, Y., Sugita, T., Nakajo, S., ... Zama, T. (2013). MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. *PLoS One*, *8*(8), e71480. doi: 10.1371/journal.pone.0071480
- Sameer, A. S., & Nissar, S. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *BioMed Research International*, *2021*, 1157023. doi: 10.1155/2021/1157023
- Samvelyan, H. J., Hughes, D., Stevens, C., & Staines, K. A. (2021). Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. *Calcified Tissue International*, *109*(3), 243–256. doi: 10.1007/s00223-020-00670-x
- Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Müller-Hermelink, H.-K., & Eck, M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: An implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, *295*(3), 179–185. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.02.009
- Schott, E., Farnsworth, C., Grier, A., Soniwala, S., Doolittle, M., Zhang, J., ... Zuscik, M. (2017). Prebiotic manipulation of the gut microbiome with oligofructose confers protection against the osteoarthritis of obesity. *Osteoarthritis and Cartilage*, *25*, S11–S12. doi: 10.1016/j.joca.2017.02.035
- Sepehri, Z., Kiani, Z., Javadian, F., Akbar Nasiri, A., Kohan, F., Sepehri, S., ... Kennedy, D. (2015). TLR3 and its roles in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, *61*(3), 46–50.
- Sharma, L., Kapoor, D., & Issa, S. (2006). Epidemiology of osteoarthritis: An update. *Current Opinion in Rheumatology*, *18*(2), 147–156. doi: 10.1097/01.bor.0000209426.84775.f8
- Sharma, S., Shen, T., Chitranshi, N., Gupta, V., Basavarajappa, D., Sarkar, S., ... Gupta, V. (2022). Retinoid X Receptor: Cellular and Biochemical Roles of Nuclear Receptor with a Focus on Neuropathological Involvement. *Molecular Neurobiology*, *59*(4), 2027–2050. doi: 10.1007/s12035-021-02709-y
- Sheyhidin, I., Nabi, G., Hasim, A., Zhang, R.-P., Ainiwaer, J., Ma, H., & Wang, H. (2011). Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(32), 3745–3751. doi: 10.3748/wjg.v17.i32.3745
- Sillat, T., Barreto, G., Clarijs, P., Soininen, A., Ainola, M., Pajarinen, J., ... Nordström, D. C. E. (2013). Toll-like receptors in human chondrocytes and osteoarthritic cartilage. *Acta Orthopaedica*, *84*(6), 585–592. doi: 10.3109/17453674.2013.854666
- Singh, S., Pandey, K., Rathore, Y. S., Sagar, A., Pattnaik, U. B. K., & Ashish. (2014). A communication network within the cytoplasmic domain of toll-like receptors has remained conserved during evolution. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *32*(5), 694–700. doi: 10.1080/07391102.2013.787545
- Sokolove, J., & Lepus, C. M. (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, *5*(2), 77–94. doi: 10.1177/1759720X12467868

- Soto, J. A., Gálvez, N. M. S., Andrade, C. A., Pacheco, G. A., Bohmwald, K., Berrios, R. V., ... Kalergis, A. M. (2020). The Role of Dendritic Cells During Infections Caused by Highly Prevalent Viruses. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1513. doi: 10.3389/fimmu.2020.01513
- Souyris, M., Cenac, C., Azar, P., Daviaud, D., Canivet, A., Grunenwald, S., ... Guéry, J.-C. (2018). TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Science Immunology*, *3*(19), eaap8855. doi: 10.1126/sciimmunol.aap8855
- Spiering, A. E., & de Vries, T. J. (2021). Why Females Do Better: The X Chromosomal TLR7 Gene-Dose Effect in COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *12*. doi: 10.3389/fimmu.2021.756262
- Su, S.-L., Yang, H.-Y., Lee, C.-H., Huang, G.-S., Salter, D. M., & Lee, H.-S. (2012). The (-1486T/C) promoter polymorphism of the TLR-9 gene is associated with end-stage knee osteoarthritis in a Chinese population. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *30*(1), 9–14. doi: 10.1002/jor.21494
- Su, W., Aloï, M. S., & Garden, G. A. (2016). MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain, Behavior, and Immunity*, *52*, 1–8. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.003
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(33), 12481–12486. doi: 10.1073/pnas.0605298103
- Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Current Protocols in Immunology*, *109*, 14.12.1-14.12.10. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109
- Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., & Klinman, D. M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(7), 3555–3558. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3555
- Teixeira, H. S., Zhao, J., Kazmierski, E., Kinane, D. F., & Benakanakere, M. R. (2020). TLR3-Dependent Activation of TLR2 Endogenous Ligands via the MyD88 Signaling Pathway Augments the Innate Immune Response. *Cells*, *9*(8), 1910. doi: 10.3390/cells9081910
- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., & Labbaye, C. (2017). miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA*, *3*(3), 22. doi: 10.3390/ncrna3030022
- Tong, N., Xu, B., Shi, D., Du, M., Li, X., Sheng, X., ... Zhang, Z. (2014). Hsa-miR-196a2 polymorphism increases the risk of acute lymphoblastic leukemia in Chinese children. *Mutation Research*, *759*, 16–21. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.11.004
- Toraih, E. A., Ismail, N. M., Toraih, A. A., Hussein, M. H., & Fawzy, M. S. (2016). Precursor miR-499a Variant but not miR-196a2 is Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility in an Egyptian Population. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *20*(3), 279–295. doi: 10.1007/s40291-016-0194-3
- Török, H.-P., Glas, J., Tonenchi, L., Bruennler, G., Folwaczny, M., & Folwaczny, C. (2004). Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology*, *127*(1), 365–366. doi: 10.1053/j.gastro.2004.05.051
- Uffelmann, E., Huang, Q. Q., Munung, N. S., De Vries, J., Okada, Y., Martin, A. R., ... Posthuma, D. (2021). Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*, *1*(1), 59. doi: 10.1038/s43586-021-00056-9

- Uzair, M., Haq, T. U., Ali, S., Hussain, M., Jalil, F., Ali, Y., & Shah, A. A. (2024). The miRNA variants MIR196A2 (rs11614913) and MIR423 (rs6505162) contribute to an increase in the risk of myocardial infarction. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *12*(1), e2323. doi: 10.1002/mgg3.2323
- van den Bosch, M. H. J. (2019). Inflammation in osteoarthritis: Is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease? *Clinical and Experimental Immunology*, *195*(2), 153–166. doi: 10.1111/cei.13237
- Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, *5*, 316. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*, *59*, 391–412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002
- Wang, X., Zhu, Y., Xu, B., Wang, J., & Liu, X. (2016). Identification of TLR2 and TLR4-induced microRNAs in human mesenchymal stem cells and their possible roles in regulating TLR signals. *Molecular Medicine Reports*, *13*(6), 4969–4980. doi: 10.3892/mmr.2016.5197
- Wang, Y., Roussel-Queval, A., Chasson, L., Hanna Kazazian, N., Marcadet, L., Nezos, A., ... Alexopoulou, L. (2021). TLR7 Signaling Drives the Development of Sjögren’s Syndrome. *Frontiers in Immunology*, *12*, 676010. doi: 10.3389/fimmu.2021.676010
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2016). HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D877–881. doi: 10.1093/nar/gkv1340
- Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. H., & Gustafsson, J.-A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: Molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(10), 1901–1909. doi: 10.1210/me.2002-0384
- Wen, Y., Zhang, X., Dong, L., Zhao, J., Zhang, C., & Zhu, C. (2015). Acetylbritannilactone Modulates MicroRNA-155-Mediated Inflammatory Response in Ischemic Cerebral Tissues. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *21*(1), 197–209. doi: 10.2119/molmed.2014.00199
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, *2014*, 561459. doi: 10.1155/2014/561459
- Xi, X., Mehmood, A., Niu, P., Yang, J., Wang, Y., Zhou, H., ... Wu, Y. (2022). Association of X-linked TLR-7 gene polymorphism with the risk of knee osteoarthritis: A case–control study. *Scientific Reports*, *12*(1), 7243. doi: 10.1038/s41598-022-11296-4
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., ... Ochi, M. (2009). Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, *60*(4), 1035–1041. doi: 10.1002/art.24404
- Yang, C.-Y., Chanalaris, A., & Troeberg, L. (2017). ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis—Looking beyond the “usual suspects.” *Osteoarthritis and Cartilage*, *25*(7), 1000–1009. doi: 10.1016/j.joca.2017.02.791
- Yang, Z.-H., Dai, Q., Gu, Y.-J., Guo, Q.-X., & Gong, L. (2012). Cytokine and chemokine modification by Toll-like receptor polymorphisms is associated with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Science*, *103*(4), 653–658. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02210.x

- Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., ... Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–31. doi: 10.1038/s41392-023-01330-w
- Yi, X., Xu, E., Xiao, Y., & Cai, X. (2019). Evaluation of the Relationship Between Common Variants in the TLR-9 Gene and Hip Osteoarthritis Susceptibility. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23(6), 373–379. doi: 10.1089/gtmb.2019.0010
- Yildirim, İ. H. 1, & Uzen, R. 2 1 D. O. G. (2019). Investigation of the Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms of TLR4 gene in Rheumatoid Arthritis. 255–260. doi: 10.5798/dicletip.540004
- Yim, M. (2020). The Role of Toll-Like Receptors in Osteoclastogenesis. *Journal of Bone Metabolism*, 27(4), 227–235. doi: 10.11005/jbm.2020.27.4.227
- Yu, X., Song, L., Zheng, H., Wei, S., Wen, X., Huang, B., & Liu, D. (2021). Association between functional genetic variants in retinoid X receptor- $\alpha/\gamma$  and the risk of gestational diabetes mellitus in a southern Chinese population. *Bioscience Reports*, 41(10), BSR20211338. doi: 10.1042/BSR20211338
- Yucesoy, B., Charles, L. E., Baker, B., & Burchfiel, C. M. (2015). Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: A review. *Work (Reading, Mass.)*, 50(2), 261–273. doi: 10.3233/WOR-131739
- Yue, M., Feng, L., Tang, S., Wang, J., Xue, X., Ding, W., ... Deng, X. (2014). Sex-specific association between X-linked Toll-like receptor 7 with the outcomes of hepatitis C virus infection. *Gene*, 548(2), 244–250. doi: 10.1016/j.gene.2014.07.040
- Zahan, O.-M., Serban, O., Gherman, C., & Fodor, D. (2020). The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(1), 12–22. doi: 10.15386/mpr-1422
- Zhang, R., Fu, Z., Fan, H., Tian, T., Wu, M., Xie, C., ... Wang, J. (2021). Genetic variant of RXR involved in the vitamin D metabolic pathway was linked to HCV infection outcomes among a high-risk Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 87, 104641. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104641
- Zhang, Y., Xu, L., Nevitt, M. C., Aliabadi, P., Yu, W., Qin, M., ... Felson, D. T. (2001). 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 and Rheumatism*, 44(9), 2065–2071. doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2065::AID-ART356>3.0.CO;2-Z
- Zhang, Yuqing, & Jordan, J. M. (2010). Epidemiology of Osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine*, 26(3), 355–369. doi: 10.1016/j.cger.2010.03.001
- Zheng, M., Shi, S., Zheng, Q., Wang, Y., Ying, X., & Jin, Y. (2017). Association between TLR-9 gene rs187084 polymorphism and knee osteoarthritis in a Chinese population. *Bioscience Reports*, 37(5), BSR20170844. doi: 10.1042/BSR20170844
- Zhou, Y., Wang, Z., Chen, X., Zhang, J., Yang, L., Liu, S., & Liu, Y. (2020). Identification of differentially expressed miRNAs and mRNAs in synovial of osteoarthritis via RNA-sequencing. *BMC Medical Genetics*, 21(1), 46. doi: 10.1186/s12881-020-0978-5
- Zhu, L., Kamalathevan, P., Koneva, L. A., Zarebska, J. M., Chanalaris, A., Ismail, H., ... Shirley, R. (2022). Variants in ALDH1A2 reveal an anti-inflammatory role for retinoic acid and a new class of disease-modifying drugs in osteoarthritis. *Science Translational Medicine*, 14(676), eabm4054. doi: 10.1126/scitranslmed.abm4054

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Дебора Мишић рођена је 30. јула 1991. године у Зрењанину. Средњу школу - Зрењанинску гимназију је завршила 2010. године. Школске 2010/2011. године је уписала основне академске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм молекуларна биологија и физиологија. Дипломирала је 2015. године, након чега је уписала мастер академске студије, модул Имунобиологија. Мастер студије завршила је школске 2016/2017. године, са завршним мастер радом на тему “Диференцијални ефекат субкутног оралног уноса варфарина на интестиналне имунске одговоре *Albino Oxford* и *Dark Agouti* пацова”. Приправнички стаж као медицински сарадник одрадила је на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије, на Одељењу за клиничку и експерименталну имунологију. Школске 2017/18. године уписала је докторске академске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, модул Имунобиологија. Специјалистичке академске студије, модул Имунобиологија са микробиологијом, уписала је 2019. године, и завршила 2020. године са темом специјалистичког рада “Повезаност варијанте rs187084 у гену за Toll-like рецептор 9 и варијанте rs3775291 у гену за Toll-like рецептор 3 са ризиком за настанак остеоартритиса”. Од 2020. године је запослена као биолог на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије, на Одељењу за молекуларну генетику, Одсек за медицинску и онколошку молекуларну генетику. У досадашњем научноистраживачком раду је као аутор/коаутор објавила 14 радова у домаћим и међународним часописима.

## ПРИЛОЗИ

### Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани/а \_\_\_\_\_ Дебора Ф. Мишић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3021/2017 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност варијанти гена за рецепторе сличне Toll-у, њихових регулаторних микро РНК и ретиноидног рецептора (RXR) са ризиком за настанак и клиничким параметрима остеоартритиса

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.07.2024. \_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дебора Мишић

Број индекса Б3021/2017

Студијски програм Имунобиологија

Наслов рада Повезаност варијанти гена за рецепторе сличне Toll-у, њихових регулаторних микро РНК и ретиноидног рецептора (RXR) са ризиком за настанак и клиничким параметрима остеоартритиса

Ментори Др Биљана Божић Недељковић

Др Гордана Шупић

Потписани/а Дебора Мишић

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

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

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

**Потпис докторанда**

.У Београду, 10.07.2024.

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Повезаност варијанти гена за рецепторе сличне Toll-у, њихових регулаторних микро РНК и ретиноидног рецептора (RXR) са ризиком за настанак и клиничким параметрима остеоартритиса

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.07.2024. \_\_\_\_\_



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.