

STROKOVNO RAZISKOVALNO DELO

**SPREMEMBE NA DOLGIH KOSTEH GENSKO
MODIFICIRANIH MIŠK AIRE (MODEL ZA AVTOIMUNSKO
POLIENDOKRINOPATIJO)**

**LONG BONE ALTERATIONS IN GENETICALLY MODIFIED
AIRE MICE (MODEL FOR AUTOIMMUNE
POLYENDOCRINOPATHY)**

Larisa Peternelj

Ljubljana, 2026

STROKOVNO RAZISKOVALNO DELO

**SPREMEMBE NA DOLGIH KOSTEH GENSKO
MODIFICIRANIH MIŠK AIRE (MODEL ZA AVTOIMUNSKO
POLIENDOKRINOPATIJO)**

**LONG BONE ALTERATIONS IN GENETICALLY MODIFIED
AIRE MICE (MODEL FOR AUTOIMMUNE
POLYENDOOCRINOPATHY)**

Larisa Peternelj

Strokovno raziskovalno delo je pripravljeno pod mentorstvom asist. dr. Jane Brankovič na Inštitutu za predklinične vede (Enota za anatomijo) Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2026

IZVLEČEK

Avtoimunska poliendokrinopatija (APECED) je redka monogenska bolezen, ki nastane zaradi mutacij v genu avtoimunskega regulatorja (AIRE), ki kodira transkripcijski faktor, ključen za vzpostavljanje centralne imunske tolerance v timusu. Poleg endokrinih motenj so pri humanih pacientih opisane tudi spremembe skeletnega sistema, kot so osteoporoza, osteopenija in v redkih primerih reverzibilna metafizna displazija. Literature o kostnem ali hrustančnem tkivu AIRE knockout (KO) mišk nam ni uspelo najti. Namen našega dela je bilo ugotoviti, ali mišji model izrazi katere izmed opisanih skeletnih manifestacij pri APECED, zato smo histomorfometrično primerjali kortikalno kostnino, sklepni in epifizni rastni hrustanec (EGP) med AIRE KO mišmi in kontrolno skupino.

V raziskavo smo vključili pet mesecev stare samice AIRE KO miši ($n = 5$) in kontrolne miši ($n = 5$). Njihove stegnenice smo izolirali, jih fiksirali, dekalcinirali in vklopili v parafin. Izdelane histološke rezine smo obarvali s hematoksilin-eozinom ter Masson–Goldnerjem. Pregledali smo zgradbo kortikalne kostnine in izmerili debelino kortikalne kostnine na sredini diafize, debelino distalnega EGP ter debelino posameznih plasti sklepnega hrustanca na stegneničnem čvršu. Meritve smo izvedli histomorfometrično, statistično primerjavo med skupinama pa smo opravili s t-testom neodvisnih vzorcev.

Vsi pregledani vzorci so pokazali značilno histološko zgradbo kostnine in hrustanca brez razlik med skupinama. Histomorfometrična analiza prav tako ni pokazala razlik med AIRE KO in kontrolno skupino v debelini kortikalne kostnine, distalnega EGP in sklepnega hrustanca. Rezultati kažejo, da odsotnost gena AIRE pri pet mesecev starih miškah ne povzroča merljivih sprememb v kortikalni kostnini ali hrustančnem tkivu stegnenice. Za natančnejšo opredelitev vpliva pomanjkanja gena AIRE na skeletni sistem so potrebne nadaljnje raziskave na večjem številu živali v različnih obdobjih pubertete.

Ključne besede: cone sklepnega hrustanca, kortikalna kostnina, epifizni rastni hrustanec, histomorfometrija, AIRE KO miši

ABSTRACT

Autoimmune polyendocrinopathy (APECED) is a rare monogenetic disease caused by mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene, which encodes a transcription factor essential for the establishment of central immune tolerance in the thymus. In addition to endocrine disorders, skeletal changes such as osteoporosis, osteopenia and, in rare cases, reversible metaphyseal dysplasia have also been described in human patients. The literature on bone or cartilage tissue in AIRE knockout (KO) mice could not be found. The aim of our work was to determine whether the mouse model expresses any of the described skeletal manifestations in APECED, therefore we histomorphometrically compared cortical bone, articular cartilage and epiphyseal growth plate (EGP) between AIRE KO mice and the control group.

Five-month-old female AIRE KO mice (n = 5) and control mice (n = 5) were included in the study. Their femurs were isolated, fixed, decalcified, and embedded in paraffin. The prepared histological sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson–Goldner. We examined the morphology and measured the thickness of: the cortical bone at middiaphysis, the distal EGP, and individual zones of the articular cartilage on the femoral condyle. The measurements were performed histomorphometrically, and the statistical comparison between the groups was conducted using the independent samples t-test.

All examined samples showed the typical histological structure of bone and articular cartilage, with no differences between the groups. Histomorphometric analysis found no differences between the AIRE KO and control groups in the thickness of distal EGP, the articular cartilage zones and the cortical thickness. The results indicate that the absence of the AIRE gene in five-month-old mice did not induce alteration in bone or articular cartilage tissue of the femur in any animal. Further research involving a larger number of animals at different ages of puberty is necessary to better understand the impact of AIRE gene loss on the skeletal system.

Keywords: cortical bone, articular cartilage zones, epiphyseal growth cartilage, histomorphometry, AIRE KO mice.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	8
1.1 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	10
2. MATERIALI IN METODE	11
2.1 ŽIVALI IN NASTANITEV	11
2.2 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV	12
2.2.1 Masson-Goldner barvanje	12
2.3 HISTOMORFOMETRIJA	13
2.4 STATISTIČNA ANALIZA	17
3. REZULTATI	18
3.1 MORFOLOGIJA KORTIKALNE KOSTNINE	18
3.2 HISTOMORFOMETRIJA KORTIKALNE KOSTNINE, RASTNEGA IN SKLEPNEGA HRUSTANCA	20
4. RAZPRAVA	22
5. SKLEPI	25
6. ZAHVALA	26
7. LITERATURA IN VIRI	27

KAZALO SLIK

Slika 1: prikaz izvajanja meritev na prečnem rezu diafize stegnenice AIRE KO miši, 20x povečava, Masson-Goldner barvanje.	14
Slika 2: prikaz izvajanja meritev rastnega hrustanca na vzdolžnem rezu stegnenice AIRE KO miši, 20x povečava, Masson-Goldner barvanje.	15
Slika 3: mesto izvajanja meritev sklepnega hrustanca na vzdolžnem rezu distalnega okrajka stegnenice kontrolne miši, 4x povečava, Masson-Goldner barvanje.	16
Slika 4: prikaz izvajanja meritev debeline con sklepnega hrustanca na AIRE KO miši; izmerjene so površinska, vmesna in globoka cona. 60x povečava, Masson-Goldner barvanje.....	16
Slika 5: vzdolžni prerez diafize stegnenice miši, stare 5 mesecev, 40x povečava, Masson-Goldner barvanje.	18
Slika 6: prečni prerez diafize stegnenice miši AIRE KO, stare 5 mesecev. Na sliki sta vidna lamelarna kostnina (L) in sistem Haversovih kanalov (H). (A) HE barvanje, (B) Masson-Goldner barvanje, 40x povečava.	19

KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava histomorfometričnih meritev debeline kostnine in rastnega ter sklepnega hrustanca med kontrolno in AIRE KO skupino miši (srednje vrednosti in standardni odklon)	21
--	----

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AIRE	autoimmune regulator gene = gen avtoimunskega regulatorja
AIRE KO	gensko modificirane miši s knockout AIRE genom
APECED	autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy = avtoimunska poliendokrinopatija, kandidiaza in ektodermalna distrofija
EGP	epiphyseal growth plate = epifizni rastni hrustanec
HE	hematoksilin eozin
H1, H2, H3	postavljene hipoteze
mTEC	medularne epitelijske timusne celice
RMD	reverzibilna metafizna displazija
SD	standard deviation = standardni odklon
TSA	telesno specifičen antigen

1. UVOD

APECED (avtoimunska poliendokrinopatija, kandidiaza in ektodermalna distrofija) je redka, avtosomalno recesivna monogenska avtoimunska bolezen, ki jo povzročajo mutacije v genu avtoimunskega regulatorja (AIRE) (Harris et al., 2003). Gre za kompleksno bolezensko stanje, ki se najpogosteje manifestira s kronično mukokutano kandidiazo, hipoparatiroidizmom in Addisonovo boleznijo. Klinični spekter bolezni je zelo širok in vključuje več kot 30 različnih simptomov, ki v 90 % primerov poleg endokrinih prizadenejo tudi druge organe (Cinque et al., 2020).

Bolezen je zaradi svoje heterogene klinične predstavitve pogosto napačno diagnosticirana ali celo spregledana. Kljub temu da gre za monogeno bolezen, ni jasne korelacije med specifično mutacijo v genu AIRE in kliničnim fenotipom bolnikov, zaradi česar se domneva, da pri razvoju bolezni sodelujejo tudi dodatni genetski dejavniki in vpliv okolja. Do danes je bilo v genu AIRE opisanih več kot 100 različnih mutacij, pri čemer so pogoste homozigotne ali kombinirano heterozigotne. (Constantine & Lionakis, 2019). Eksperimentalni modeli miši s knockout (KO) AIRE genom so pokazali, da fenotipske variacije niso neposredno povezane z genotipom, kar dodatno potrjuje vlogo okolja pri modulaciji bolezni (Ramsey et al., 2002).

Gen AIRE, ki se nahaja na dolgi roki kromosoma 21 (21q22.3), kodira ključni transkripcijski faktor: protein Autoimmune Regulator, ki je odgovoren za izražanje telesno specifičnih antigenov (TSA) v medularnih epitelijskih celicah timusa (mTEC) (Constantine & Lionakis, 2019). Ta proces je bistven za centralno imunsko toleranco, saj omogoča selekcijo in eliminacijo samoreaktivnih T celic, kar preprečuje razvoj avtoimunskih bolezni.

Ugotovljeno je bilo, da poleg endokrinih motenj, značilnih za APECED, bolezen prizadene tudi skeletni sistem. Reverzibilna metafizna displazija (RMD) je redka fenotipska varianta APECED, ki se lahko pojavi pri določenih bolnikih in je povezana z nepravilno enhondralno osifikacijo (Harris et al., 2003). RMD se lahko pojavi pri otrocih in vključuje nepravilnosti dolgih kosti, kot so stegenica, koželjnica, komolčnica, golenica in mečnica (Harris et al., 2003; Vogel, 2003). Radiološke in histopatološke študije so pokazale prisotnost otočkov kalcificiranega hrustanca znotraj kosti, kljub tem

spremembam pa se je pri bolnikih skeletna bolezen s časom izboljšala, kar nakazuje na njeno reverzibilnost (Harris et al., 2003).

Poleg RMD so bile pri bolnikih z APECED opažene tudi osteopenija in osteoporoza, čeprav je njuna prevalenca med odraslimi bolniki relativno nizka (Mäkitie et al., 2006). Laakso in sodelavci (2020) so v študiji ugotovili, da imajo bolniki z APECED znižano mineralno gostoto kosti in zmanjšano debelino trabekularne kostnine, kar je bilo bolj izrazito pri bolnikih s sedmimi ali več bolezenskimi manifestacijami (Laakso et al., 2020).

Glavni proces, ki se odvija v kostnini ljudi, je remodeliranje, ki vključuje resorpcijo in tvorbo kosti na istem mestu, medtem ko pri glodavcih prevladuje modeliranje, pri katerem se tvorba in resorpcija kosti pojavljata na različnih mestih in neodvisno druga od druge. Ljudje imajo dobro razvit Haversov sistem, ki je ključen za proces remodeliranja (Levolas et al., 2008), pri glodavcih pa ta sistem ni razvit, saj je njihova kost dovolj majhna, da za izmenjavo hranil, signalnih molekul in odpadnih snovi zadostuje difuzija (Vielreicher et al., 2021).

Rast kosti v dolžino se odvija s procesom enhondralne osifikacije. Rastni hrustanec, ki je na meji med epifizo in diafizo rastoče kosti, med procesom osifikacije proliferira in propada, sproti pa ga zamenjuje novo nastalo kostno tkivo. Področje, v katerem se hrustančno tkivo zamenja s kostnim, imenujemo metafiza. Osteoklasti sproti razgrajujejo nastajajočo kostnino, zato je metafiza stalno enako debela (Fazarinc & Pogačnik, 1997). Kost raste v širino z delovanjem osteoblastov, ki nalagajo mineralizirano tkivo na zunanjo (periostalno) površino kosti, in osteoklastov, ki kostnino na strani medularne votline razgrajujejo. Ta proces imenujemo apozicijska rast. (Rauch, 2005).

Na področjih kosti, ki se stikajo v sklepih, je visoko specializiran tip hialinega hrustanca, ki se imenuje sklepni hrustanec. Sestavljajo ga 3 plasti, ki jih histološko lahko razlikujemo; površinska, vmesna in globoka plast (Ravnihar, 2018).

Z APECED povezane fenotipske spremembe so bile potrjene tudi na modelih AIRE KO miši, ki izražajo multiorganske limfocitne infiltrate (Anderson et al., 2002; Hassler et al. 2006; Ramsey et al., 2002). Pri teh miših so raziskovalci opazili atrofijo timusa, gonad in nadledvičnih žlez ter prisotnost avtoprotiteles proti različnim organskim tkivom (Ramsey et al., 2002). Starejše AIRE KO miši so izražale manjše fenotipske

spremembe, pri čemer so bile samice bolj prizadete kot samci, na kar nakazujeta nižja telesna masa in splenomegalija (Hassler et al., 2006). V literaturi nismo uspeli zaslediti podatkov o proučevanju kostnine ali hrustančnega tkiva pri AIRE KO miškah

Zaradi vsega naštetega se je v raziskavo vključilo 5 mesecev stare AIRE KO samice, kar ustreza starosti 16-letnega človeka (Dutta & Sengupta, 2016). V strokovnem raziskovalnem delu smo se osredotočili na proučevanje morebitnih sprememb debeline kortikalne kostnine, EGP in sklepnega hrustanca.

1.1 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen raziskovalnega dela je bil ugotoviti morebitne spremembe na kostnem ali hrustančnem tkivu med AIRE KO in kontrolnimi miškami, zato smo opravili histomorfometrične meritve debeline kortikalne kostnine, EGP in sklepnega hrustanca. Debelino kortikalne kostnine smo izmerili na prečnem prerezu diafize stegenice, debelino plasti EGP in sklepnega hrustanca pa na vzdolžnem rezu distalnega okrajka stegenice.

V sklopu te naloge smo postavili tri hipoteze:

H1: Kortikalna kostnina AIRE KO miši je tanjša v primerjavi s kontrolami.

H2: Sklepni hrustanec AIRE KO miši je tanjši v primerjavi s kontrolami.

H3: Debelina EGP je pri AIRE KO miših debelejša v primerjavi s kontrolami.

2. MATERIALI IN METODE

2.1 ŽIVALI IN NASTANITEV

Osem tednov stare samice miši B6.129S2-Airetm1.1Doi/J (AIRE skupina, $n = 5$), homozigotne za *Airetm1.1Doi*, mišji model za preučevanje APECED, so bile pridobljene iz laboratorija Jackson Laboratory, Charles River, Calco, Italija (JAX stock #004743) (Anderson et al., 2002). Kontrolne živali so bile osem tednov stare samice miši C57BL/6JOlaHsd (kontrolna skupina, $n = 5$), ki so bile vzrejene v Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti univerze v Ljubljani v Sloveniji.

Miši so bile vzrejene na običajen način v odprtih kletkah iz polikarbonata velikosti 37,5 × 22 × 15 cm (Tecniplast, Buguggiate, Italija) z žagovino kot steljo (Lignocel®, Rettenmaier & Söhne, Nemčija) v standardnih pogojih: 12:12 urni temno-svetli cikel (LED svetila, CCT 3000 K, 25 luksov pri kletkah), temperatura 21–25 °C, vlažnost 50–60 %. Hranjene so bile z obsevanim prehranskim obrokom za glodavce (Teklad global 16% protein rodent diet®, BN 2916, Envigo, Udine, Italija) in pitno vodo iz pipe z dodatkom 37 % HCl (0,7 mL/L; pH 3–4, Merck, Darmstadt, Nemčija) *ad libitum*.

Po treh mesecih (od decembra do marca), pri starosti petih mesecev, so bile živali anestezirane z mešanico ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzow, Poljska; 100 µg/g telesne mase), acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 2 µg/g telesne mase) in ksilazina (Chanelle Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Irska; 10 µg/g telesne mase), stehtane in usmrčene z izkrvavitvijo.

Vsi poskusi na živalih so bili odobreni s strani Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin; številka dovoljenja U34401-31/2017/9 in izvedeni v skladu z etičnimi načeli, direktivo EU (2010/63/EU) in smernicami NIH (National Research Council, 2011).

2.2 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV

Desne stegnenice so bili fiksirane v 10 % nevtralnem puferiranem formalinu in dekalcinirane v raztopini Osteosoft® (Merck, Darmstadt, Nemčija) 8 dni. Oblikovanje vzorcev za zalivanje: dekalcinirane stegnenice so bile prečno prerezane na zgornjo in spodnjo polovico v diafizi, kjer smo odvzeli približno 3 mm debele vzorce prečnega prereza kosti ($n = 10$). Nato smo prerezali spodnjo polovico stegnenice na polovico in zalili oba dela v en parafinski blok v ustreznem položaju. Z mikrotomom (Leica SM2000R, Nussloch, Nemčija) smo narezali več serij 5 μm debelih tkivnih rezin ($n = 18$ rezin na vzorec vzdolž vzdolžne osi in $n = 9$ vzdolž prečne osi kosti). Ena serija rezin (1 predmetnica/vzorec) je bila obarvana s hematoksilin-eozinom (HE) v avtomatskem barvalniku Gemini AS slide stainer (Thermo Scientific, Cheshire, ZK), drugo serijo rezin pa smo ročno obarvali s kompletom Masson-Goldner (Merck, Darmstadt, Nemčija). Vzorci so bili pregledani pod mikroskopom (Eclipse Ni-U, Nikon, Tokio, Japonska) z digitalno kamero (DS-Fi1, Nikon, Tokio, Japonska) in slikovno programsko opremo NIS-Elements BR 4.60 (Nikon, Tokio, Japonska).

2.2.1 Masson-Goldner barvanje

Preparate smo deparafinizirani v barvalniku Gemini AS slide stainer (Thermo Scientific, Cheshire, ZK), nato pa so bili ročno obarvani po standardnem protokolu za barvanje po Masson–Goldnerju.

Postopek barvanja:

- Nanos železovega hematoksilina (5 minut),
- spiranje predmetnic pod tekočo vodo iz pipe (5 minut),
- spiranje z 1 % očetno kislino (30 sekund),
- barvanje v rdečem barvilu azofloksin (10 minut),
- spiranje z 1 % očetno kislino (30 sekund),
- barvanje v oranžnem barvilu tungstosforjeva kislina (1 minuto),

- spiranje z 1 % očetno kislino (30 sekund),
- barvanje v svetlo zelenem barvilu SF (2 minuti).

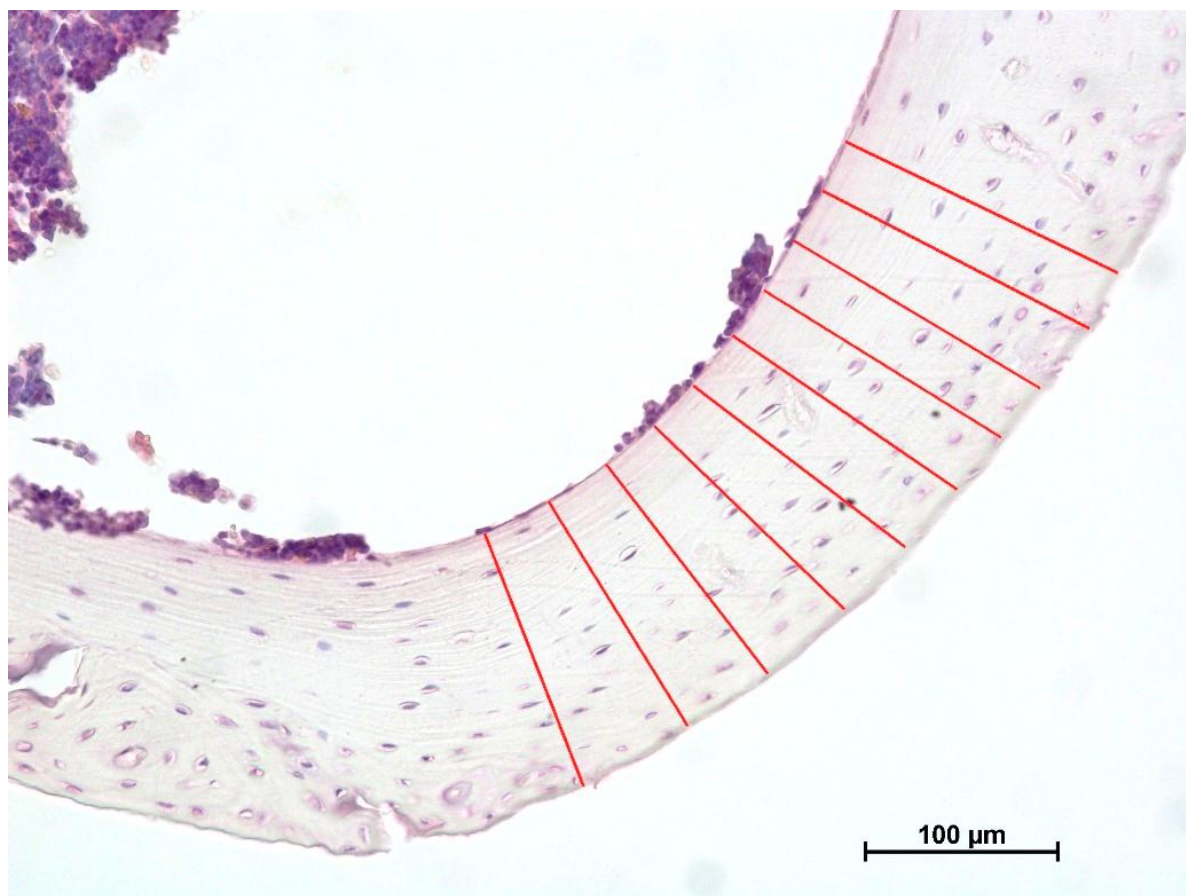
Po zadnjem barvanju smo preparate spirali 30 sekund v očetni kislini, nato pa smo jih dehidrirali v alkoholih z naraščajočimi koncentracijami. Uporabili smo etanol v koncentracijah 70 %, 96 % in dvakrat 100 %. V vsakem alkoholu so predmetnice stale 30 sekund. Nato smo jih prestavili v topilo Neo Clear, v katerem so bile potopljene 12 minut.

Nazadnje smo preparate pokapljali z umetno smolo (Leica CV Mount) in pokrili s krovnim stekelcem.

Po Masson-Goldnerju se mineralizirana kostnina obarva opečnato rdeče, nemineralizirana kostnina (osteoid) pa zeleno. Jedra se zaradi železovega hematoksilina obarvajo temno rjavo do črno. Kolagenska vlakna se barvajo zeleno, mišičnina pa svetlo rdeče (Kitzen et al., 2017).

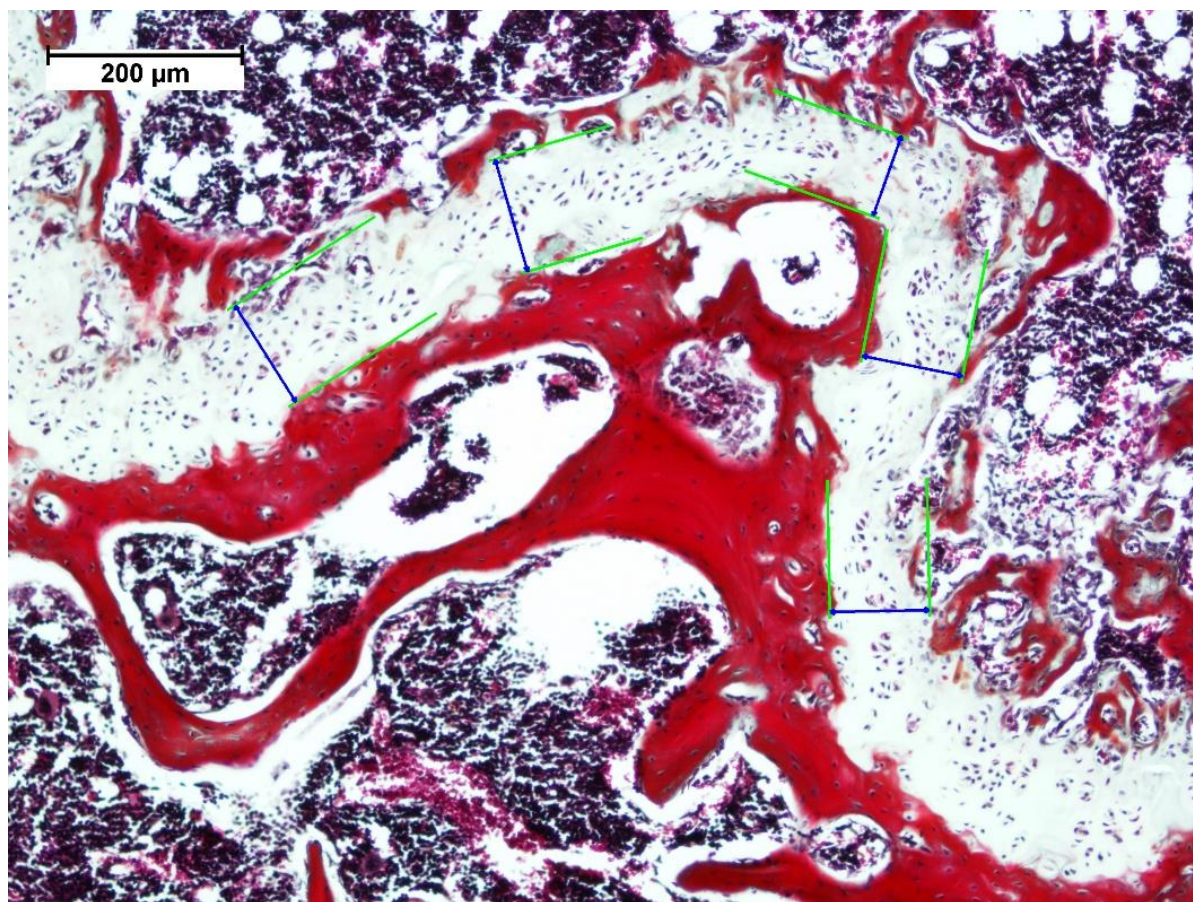
2.3 HISTOMORFOMETRIJA

Na predmetnicah, barvanih s HE, smo pregledali morfologijo kortikalne kostnine in opravili meritve prečnega prereza diafize, s čimer smo določili debelino kostnine. Za meritve smo izbrali primerljivo mesto med vzorci (Slika 1). Na vsaki reprezentativni rezini se je pod 20x povečavo opravilo serijo desetih meritev prečnega prereza, ki so bile med seboj oddaljene približno 20 do 30 μm . Eden izmed vzorcev v kontrolni skupini (Kontrola 4) je bil pri zalivanju v parafin obrnjen vzdolžno (namesto prečno), zato ga pri meritvah debeline kortikalne kostnine nismo upoštevali.



Slika 1: prikaz izvajanja meritev na prečnem rezu diafize stegenice AIRE KO miši, 20x povečava, HE barvanje.

Na predmetnicah barvanih po Masson-Goldnerju smo analizirali debelino distalnega EGP in posameznih con sklepnega hrustanca na stegneničnem čvršu ter pregledali morfologijo kostnine.



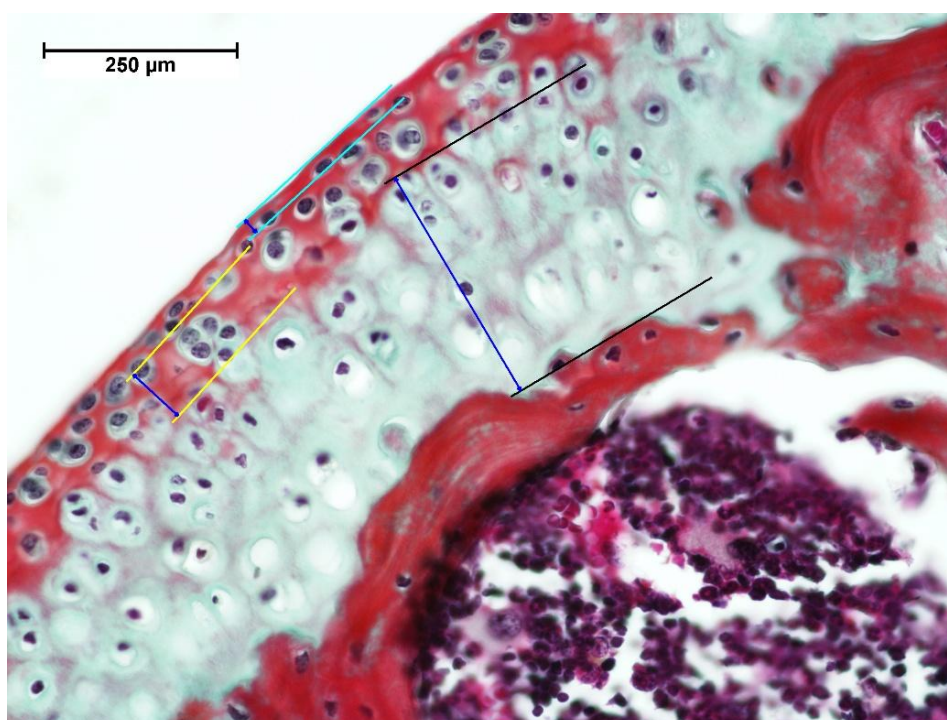
Slika 2: prikaz izvajanja meritev rastnega hrustanca na vzdolžnem rezu stegenice AIRE KO miši, 20x povečava, Masson-Goldner barvanje.

Na vzdolžnem prerezu stegenice smo za vsak osebek pod 10x povečavo opravili deset meritev debeline rastnega hrustanca. V meritve debeline so bile zajete rezervna cona, cona proliferacije in cona hipertrofije. Te so se v našem primeru po Masson-Goldnerju barvale nežno zeleno, kar je omogočilo dobro vizualizacijo meje med hrustancem in rdeče obarvanim mineraliziranim tkivom in s tem natančno merjenje (Slika 2).

Sklepni hrustanec smo merili na stegneničnem čvršu, na katerem smo določili najlažje primerljivo mesto merjenja med vzorci (Slika 3). Na 40 x povečavi smo opravili po 10 meritev površinske, vmesne in globoke plasti sklepnega hrustanca (Slika 4).



Slika 3: mesto izvajanja meritev sklepnega hrustanca na vzdolžnem rezu distalnega okrajka stegenice kontrolne miši, 4x povečava, Masson-Goldner barvanje.



Slika 4: prikaz izvajanja meritev debeline con sklepnega hrustanca na AIRE KO miši; izmerjene so površinska, vmesna in globoka cona. 60x povečava, Masson-Goldner barvanje.

2.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo smo uporabili podatke, pridobljene s histomorfometričnimi meritvami vzorcev desetih osebkov, razdeljenih v testno skupino AIRE KO in kontrolno skupino. Za vsak osebek smo izmerili debelino kortikalne kostnine, EGP in posameznih con sklepnega hrustanca.

Za vsak parameter smo opravili 10 meritev in izračunali srednjo vrednost in standardni odklon (SD) za posamezno žival, ter povprečje za AIRE KO in kontrolno skupino.

Za statistično analizo podatkov smo uporabili T test neodvisnih vzorcev v računalniškem programu Microsoft Excel (različica 2601).

Uporabili smo 95 % interval zaupanja, torej je meja za statistično pomembne razlike pri p-vrednosti manjši od 0,05.

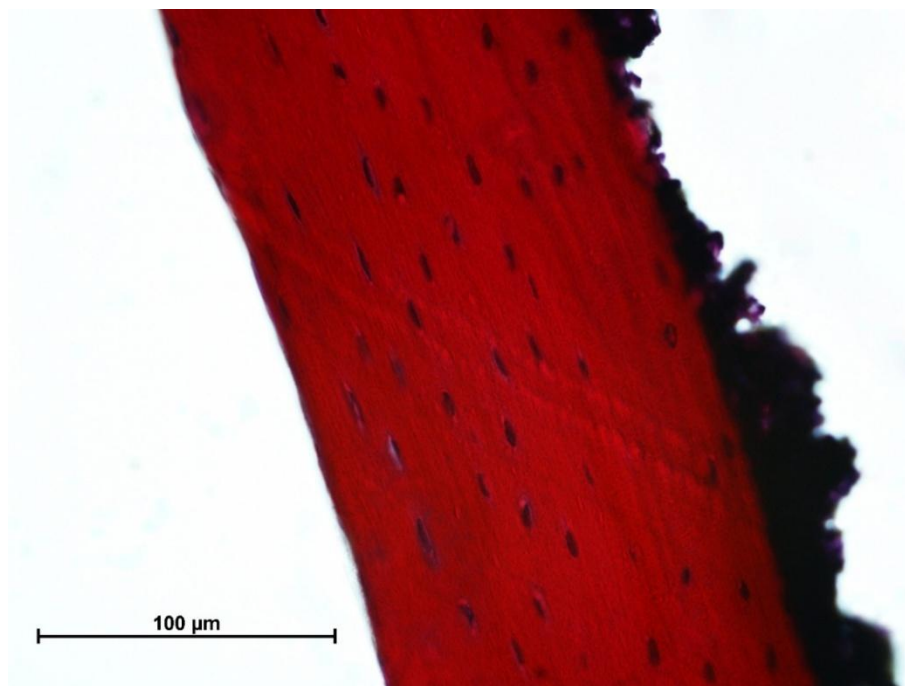
3. REZULTATI

3.1 MORFOLOGIJA KORTIKALNE KOSTNINE

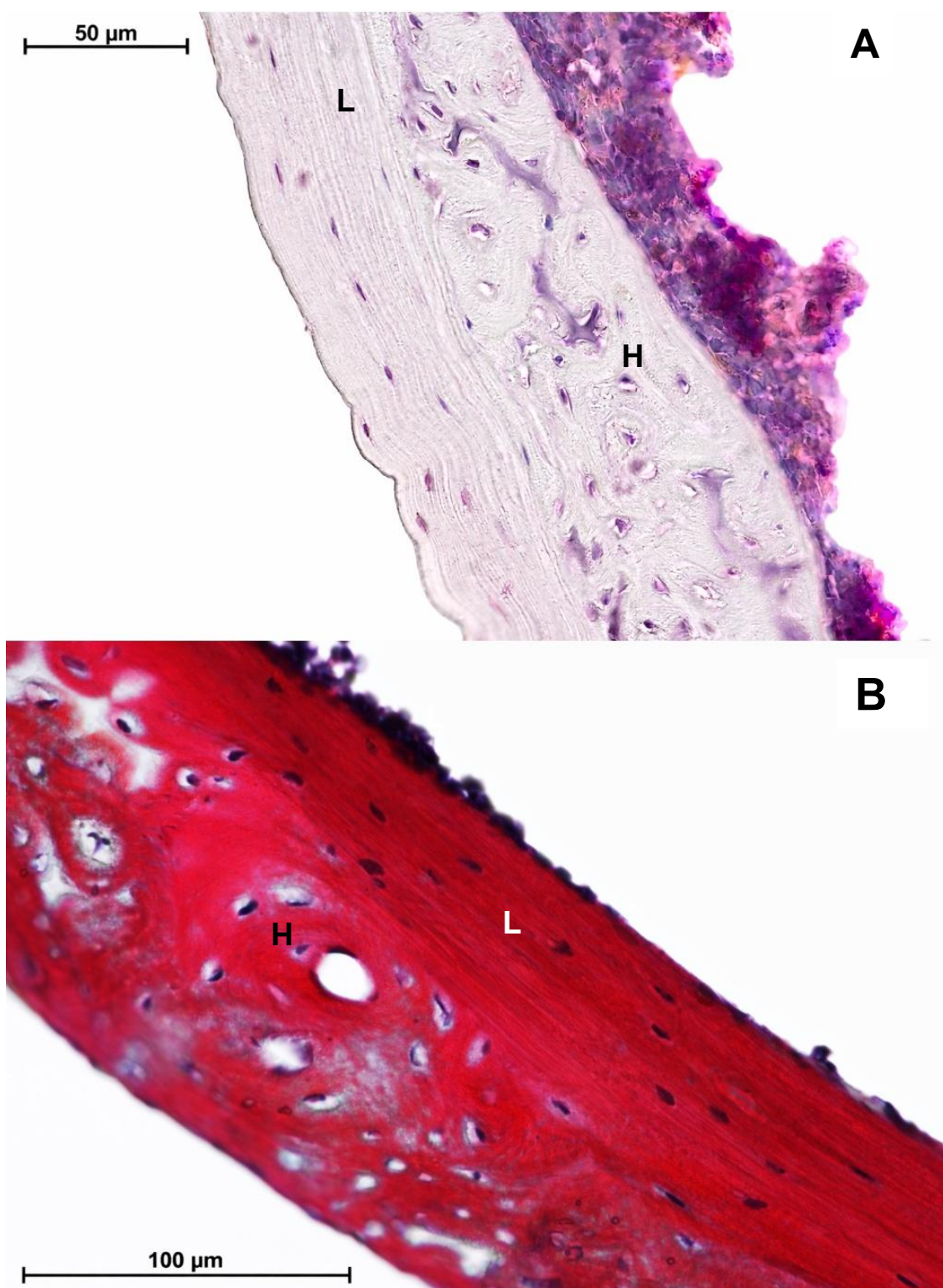
Pred izvajanjem meritev smo s svetlobno mikroskopijo opravili morfološki pregled kostnine. Pri vzorcih, barvanih s HE, smo v kortikalni kostnini vseh AIRE KO miši in 4 kontrol opazili značilno zgradbo kortikalne kostnine dolgih kosti pri miškah. Kostnina je zgrajena iz lamel, ki so koncentrično razporejene okrog medularne votline, kar se najlepše vidi na vzdolžnem prerezu diafize stegnenice (Slika 5). Na mestih je prepletena s pasovi nelamelarne kostnine, v kateri lahko opazimo posamezne Haversove sisteme ali osteone in znotraj njih Haversove kanale (Slika 6).

Po Masson-Goldnerju so vidna blede zeleno obarvana področja, ki nakazujejo prisotnost nemineralizirane kostnine. Gre za področja osteoida, ki so vidna predvsem izven lamelarne kostnine v okolici Haversovih sistemov in intersticijskih lamel (Slika 6). Razlik v strukturi kosti med AIRE KO in kontrolnimi miškami nismo opazili.

Na vzdolžnem prerezu kortikalne kostnine je struktura kosti urejena, lamelarna, enakomerno obarvana in osteoid ni viden (Slika 5).



Slika 5: vzdolžni prerez diafize stegnenice miši, stare 5 mesecev, 40x povečava, Masson-Goldner barvanje.



Slika 6: prečni prerez diafize stegenice AIRE KO miši, stare 5 mesecev. Na sliki sta vidna lamelarna kostnina (L) in sistem Haversovih kanalov (H). (A) HE barvanje, (B) Masson-Goldner barvanje, 40x povečava.

3.2 HISTOMORFOMETRIJA KORTIKALNE KOSTNINE, RASTNEGA IN SKLEPNEGA HRUSTANCA

V tabeli 1 so predstavljeni rezultati histomorfometričnih meritev posameznih parametrov in rezultati statistične analize med skupinama.

Pri debelini kortikalne kostnine meritve kontrolne živali št. 4 nismo vključili v statistično obdelavo. Pri vsakem parametru smo naredili najmanj 10 meritev in izračunali povprečje za posamezno žival in za poskusno skupino.

Pri meritvah debeline kortikalne kostnine v diafizi stegenice in debeline EGP se AIRE KO in kontrolne miške niso razlikovale. Prav tako ni bilo razlik v debelini površinske, vmesne in globoke plasti sklepnega hrustanca na distalnem čvršu stegenice.

Tabela 1: Primerjava histomorfometričnih meritev debeline kostnine in rastnega ter sklepnega hrustanca med kontrolno in AIRE KO skupino miši (srednje vrednosti in standardni odklon)

Parameter Vzorec	Debelina diafize stegenice (µm)	Debelina EGP (µm)	Debelina površinske plasti sklepnega hrustanca (µm)	Debelina vmesne plasti sklepnega hrustanca (µm)	Debelina globoke plasti sklepnega hrustanca (µm)
Kontrola 1	147,8 ± 10,9	91,7 ± 47,9	5,34 ± 0,63	33,5 ± 2,03	30,6 ± 5,24
Kontrola 2	128,2 ± 10,9	126,6 ± 16,9	4,64 ± 0,91	25,6 ± 4,46	39,7 ± 10,3
Kontrola 3	112,7 ± 15,5	97,3 ± 8,94	5,41 ± 0,82	33,4 ± 7,19	34,9 ± 9,48
Kontrola 4	100,4 ± 25,7*	101,9 ± 26,1	5,21 ± 0,91	31,4 ± 10,2	37,4 ± 6,94
Kontrola 5	121,8 ± 18,2	105,8 ± 15,4	5,84 ± 1,07	31,6 ± 7,78	33,5 ± 9,78
Kontrole (n=5)	127,6 ± 14,9 (n=4*)	104,7 ± 13,4	5,29 ± 0,43	31,1 ± 3,23	35,2 ± 3,51
AIRE 1	114,8 ± 8,92	100,6 ± 21,8	5,16 ± 1,02	26,1 ± 4,55	34,9 ± 5,68
AIRE 2	124,1 ± 17,7	107,2 ± 18,4	5,07 ± 0,97	31,9 ± 5,11	40,1 ± 9,52
AIRE 3	112,5 ± 20,4	108,1 ± 14,8	5,55 ± 1,04	31,1 ± 5,39	38,7 ± 10,7
AIRE 4	114,5 ± 8,23	122,9 ± 21,7	5,48 ± 0,64	27,4 ± 2,94	36,6 ± 4,93
AIRE 5	117,7 ± 20,1	105,9 ± 16,0	5,67 ± 0,66	32,3 ± 5,52	35,9 ± 6,17
AIRE (n=5)	116,7 ± 4,52	108,9 ± 8,33	5,39 ± 0,23	29,8 ± 2,82	37,2 ± 2,12
p – vrednost	0,287	0,560	0,675	0,505	0,302

Za statistično obdelavo smo uporabili T-test neodvisnih vzorcev. AIRE: eksperimentalni model miši s knockout genom avtoimunskega regulatorja. EGP: epifizni rastni hrustanec. *: te meritve nismo upoštevali pri statistični obdelavi podatkov.

4. RAZPRAVA

V raziskavi smo ugotavljali morebitne spremembe kortikalne kostnine, EGP in sklepnega hrustanca pri AIRE KO miškah, s čimer smo želeli ugotoviti, ali odsotnost AIRE gena privede do sprememb, ki se odražajo na teh tkivih. Spremembe na kostnini so opisane pri nekaterih primerih humanih pacientov z APECED, na miših pa raziskava, ki bi se osredotočila na to področje, še ni bila izvedena. Želeli smo ugotoviti, ali so AIRE KO miške primeren model za preučevanje manifestacij bolezni, ki se odražajo na kostnini ali hrustancu. Naši rezultati niso pokazali razlik med skupinama, zato smo ovrgli vse delovne hipoteze in sprejeli ničelno hipotezo, da med skupinama ni razlik v opazovanih parametrih.

Morfološko na kortikalni kostnini nismo opazili sprememb ali nepravilnosti. Debelina kortikalne kostnine se med skupinama miši ni razlikovala, zato smo ovrgli delovno hipotezo, da je kortikalna kostnina AIRE KO miši v primerjavi s kontrolami tanjša.

Kljub temu, da mišji model ni pokazal razlik, Laakso in sod. (2023) poročajo o stanjšani trabekularni kostnini pri treh APECED pacientih. Predpostavili so, da bi lahko spremembe izhajale iz motenj v mineralizaciji, pri čemer ni bilo mogoče določiti, ali so nastale zaradi motenj modelacije v odraščanju, ali remodelacije v odrasli dobi. V omenjeni študiji so bili vsi opisani primeri odrasli ljudje s številnimi kliničnimi manifestacijami bolezni. Zaključili so, da se strukturne spremembe kostnine pri APECED pacientih pojavljajo predvsem zaradi hipoparatiroidizma, ki vodi v zmanjšano obnavljanje kostnine in posledično stanjšanje gobaste kostnine. Vpliv imajo lahko tudi drugi dejavniki, kot so primarni ali sekundarni hipogonadizem, nadomestna terapija z glukokortikoidi zaradi adrenokortikalne insuficience, spremenjena ledvična funkcija in malabsorpcija. (Laakso et al., 2023, Mäkitie et al., 2006). Študij, ki bi pri ljudeh ali miših z APECED raziskovale kortikalno kostnino, nismo uspeli najti.

Upoštevati moramo tudi razlike med človeškim in murinim skeletom. V odraslem človeškem skeletu je tvorba kosti povezana z resorpcijo kostnine v procesu, ki ga imenujemo remodeliranje, modeliranje pa je proces tvorbe in resorpcije kosti na določenem mestu in se odvija predvsem med odraščanjem. Glavni vzrok kortikalne poroznosti pri ljudeh je povečano haversovo remodeliranje. Skelet podgane kaže

postopen prehod od modeliranja k remodeliranju, ki je povezan z napredovanjem starosti, in se v proksimalni metafizi golenice pojavi med 6. in 9. mesecem starosti. Glede na starost naših testnih žival je pri njih v tem časovnem obdobju verjetno še vedno prevladovalo modeliranje. Glodavci prav tako nimajo dobro razvitega haversovega sistema, saj za oskrbo kortikalne kostnine zadostuje difuzija (Vielreicher et al., 2021). Miši so bile morda premlade, da bi se na kostnini izrazile spremembe v rasti ali pa se odsotnost AIRE gena pri raziskovanih miših ni fenotipsko izrazila v spremembah rasti dolгих kosti.

Rastni hrustanec je bil med testnima skupinama enake debeline, zato smo delovno hipotezo ovrgli. Pri tej starosti miši je rast kosti v dolžino že zaključena, toda rastni hrustanec ne izgine in ga je še možno izmeriti, četudi ni več v aktivni fazi. Na predmetnicah, barvanih z Masson Goldnerjem, se je na hrustančne celice in kolagena vlakna (tip 1) svetlo zeleno barvilo SF slabo vezalo, kar nam je dalo videz skoraj neobarvanega EGP. To nam je omogočilo dobro vizualizacijo meje med kalcificiranim kostnim tkivom, ki se je obarvalo intenzivno rdeče, in hrustančevino. Rastni hrustanec smo izmerili od vrha rezervne cone do dna hipertrofične cone hondrocitov. Na isti način so rastni hrustanec merili tudi Chan in sod. (2012), ki so predpostavili, da je mišji model primeren za primerjalne študije hrustančevine miši in ljudi. Izmerili so rastni hrustanec pri 4 mesečnih miškah in ugotovili debelino 0,10 mm, kar je tudi skladno z našimi ugotovitvami (Chan et al., 2012).

V naši študiji smo se na rastni hrustanec osredotočili predvsem zaradi poročanja o pojavu redke manifestacije APECED, reverzibilne metafizne displazije, ki jo je opisal Harris s sod. (2003) pri dveh najstnikih z mutacijo AIRE gena. Pri naših miših temu podobnih sprememb nismo zaznali, četudi so bile starostno primerljive s humanimi pacienti. Predpostavljamo, da je bil raziskovani vzorec premajhen, da bi se izrazile fenotipske spremembe, ki so bile opisane pri človeku (Harris et al., 2003).

V debelini sklepnega hrustanca AIRE KO miši nismo ugotovili sprememb, njegova debelina pa sovpada z dosedanjimi študijami na miših (Chan et al., 2012).

Vnetni artritis, čeprav zelo redek pri primerih APECED, je lahko zgodnja manifestacija bolezni (Aytac et al., 2023). Sklepni hrustanec smo pregledali z namenom ugotavljanja

pojavnosti osteoartroze, saj je pri drugih avtoimunskih obolenjih, kot je revmatoidni artritis, hrustančno tkivo pogosto močno prizadeto (Wen et al., 2025). Kolikor nam je znano, tovrstna raziskava na AIRE KO modelu miši do sedaj še ni bila izvedena, prav tako pa v literaturi nismo zasledili primerljivih študij pri ljudeh. Osteoartritis povzroča več dejavnikov, kot so staranje, neprimerna mehanična obremenitev in sistemsko vnetje v organizmu. Sox9 je eden izmed esencialnih transkripcijskih regulatorjev oblikovanja sklepnega hrustanca med razvojem (Goldring, 2012). V serumu pacientov z APECED so bila ugotovljena številna avtoprotitelesa, med drugim tudi proti faktorju Sox9, torej bi tudi hrustanec lahko predstavljal tarčno tkivo za avtoimunski odziv (Harris et al., 2003). Glede na to, da cone niso bile spremenjene, niti morfološko niti v debelino, predpostavljamo, da odsotnost AIRE gena pri 5 mesečnih miškah ne vpliva na proliferacijo ali metabolizem hrustančnih celic v sklepnem hrustancu.

Rezultati histomorfometrične analize niso pokazali razlik med AIRE KO miškami in kontrolno skupino, zato lahko iz njih sklepamo, da odsotnost AIRE gena pri uporabljenem mišjem modelu v opazovanem starostnem obdobju ne povzroča merljivih morfoloških sprememb v kostnini ali hrustančnem tkivu. Interpretacijo rezultatov omejuje več dejavnikov, med drugim majhno število preiskovanih živali, metodološke omejitve histomorfometrije ter dejstvo, da mišji modeli ne poustvarijo vseh fenotipskih značilnosti človeške bolezni APECED (Besnard et al., 2021, Levolas et al., 2008). Poleg tega lahko na razvoj skeletnih manifestacij vplivajo tudi dodatni genetski in okoljski dejavniki, ki jih v eksperimentalnih pogojih ni mogoče v celoti reproducirati. Za natančnejšo opredelitev vpliva odsotnosti AIRE gena na strukturo kostnine in hrustančnega tkiva so potrebne nadaljnje raziskave na večjem številu živali v različnih starostnih obdobjih.

5. SKLEPI

Na podlagi izvedenih histomorfometričnih meritev lahko zaključimo:

1. Debelina kortikalne kostnine pri AIRE KO miškah ni manjša kot pri kontrolah, zato H1 ovržemo.
2. Debelina sklepnega hrustanca se med skupinama ne razlikuje, zato H2 ovržemo.
3. Debelina con rastnega hrustanca pri AIRE KO skupini ni debelejša kot pri kontrolni skupini, zato H3 ovržemo.

6. ZAHVALA

Zahvalila bi se rada mentorici asist. dr. Jani Brankovič, dr. vet. med., za vso potrpežljivost, pomoč in usmeritve pri pisanju raziskovalnega dela.

Prav tako bi se rada zahvalila ga. Jasni Šporar, vet. tehn., za strokoven prikaz in pomoč pri barvanju histoloških preparatov.

Posebna zahvala gre prof. Alenki Pavlič iz Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in prof. Milki Vrecl Fazarinc za idejno zasnovo raziskave in finančna sredstva za izvedbo raziskave (ARIS programa P3–0374 and P4–0053).

7. LITERATURA IN VIRI

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395–1401.

Aytac G, Guven B, Aydin I, et al. An extraordinary case of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) syndrome misdiagnosed as juvenile idiopathic arthritis on admission. *Case Rep Immunol* 2023; 2023. doi: <https://doi.org/10.1155/2023/2363760>

Besnard M, Padonou F, Provin N, Giraud M, Guillonnet C. Aire deficiency, from preclinical models to human apeced disease. *Dis Model Mech* 2021; 14(2). doi: <https://doi.org/10.1242/dmm.046359>

Chan EF, Harjanto R, Asahara H, et al. Structural and functional maturation of distal femoral cartilage and bone during postnatal development and growth in humans and mice. *Orthop Clin North Am* 2012; 43(2): 173–185. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2012.01.005>

Cinque L, Angeletti C, Orrico A, et al. Novel pathogenic variants of the AIRE gene in two autoimmune polyendocrine syndrome type I cases with atypical presentation: role of the NGS in diagnostic pathway and review of the literature. *Biomedicines* 2020; 8(12): 1–12. doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120631>

Constantine GM, Lionakis MS. Lessons from primary immunodeficiencies: autoimmune regulator and autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Immunol Rev* 2019; 287(1): 103–120. doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12714>

Dutta S, Sengupta P. Men and mice: relating their ages. *Life Sci* 2016; 152: 244–248. doi: [10.1016/j.lfs.2015.10.025](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025)

Fazarinc G, Pogačnik A. Slikovni priročnik iz splošne histologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1997.

Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; 4(4): 269–285. doi: <https://doi.org/10.1177/1759720X12448454>

Harris M, Kecha O, Deal C, et al. Reversible metaphyseal dysplasia, a novel bone phenotype, in two unrelated children with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: clinical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(10). doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030089>

Hassler S, Ramsey C, Karlsson MC, et al. Aire-deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* 2006; 108: 1941–1948. doi: [10.1182/blood-2006-04-019679](https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-019679)

Kitzen J, Schotanus MGM, Plasschaert HSW, Hulsmans FJH, Tilman PBJ. Treatment of thoracic or lumbar burst fractures with balloon assisted endplate reduction using tricalcium phosphate cement: histological and radiological evaluation. *BMC Musculoskelet Disord* 2017; 18(1). doi: <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1770-3>

Laakso S, Borchers J, Toiviainen-Salo S, Pekkinen M, Mäkitie O. Severe phenotype of APECED (APS1) increases risk for structural bone alterations. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00109>

Levolas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008; 58(5): 424–430.

Mäkitie O, Sochett EB, Bondestam S, Sipilä I, Perheentupa J. Bone health in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED): findings in 25 adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(5): 489–494. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02495.x>

Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, et al. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. Hum Mol Genet. 2002 Feb 15;11(4):397-409. doi: [10.1093/hmg/11.4.397](https://doi.org/10.1093/hmg/11.4.397)

Rauch F. Bone growth in length and width: the yin and yang of bone stability. J Musculoskelet Neuronal Interact 2005; ul-Sep;5(3):194-201.

Ravnihar K. Vpliv lokalnih anestetikov na sklepni hrustanec v kolenu. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2018. Doktorska disertacija. <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-MS4GWLT1>

Vielreicher M, Bozec A, Schett G, Friedrich O. Murine metatarsus bone and joint collagen-I fiber morphologies and networks studied with SHG multiphoton imaging. Front Bioeng Biotechnol 2021; 9. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.608383>

Vogel A, Strassburg CP, Deiss D, Manns MP. A novel AIRE mutation in an APECED patient with candidiasis, adrenal failure, hepatitis, diabetes mellitus and osteosclerosis. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2003 May;111(3):174-6. doi: [10.1055/s-2003-39790](https://doi.org/10.1055/s-2003-39790)

Wen J, Liu J, Wan L, Wang F. New insights into the role of cellular senescence and rheumatic diseases. Front Immunol 2025; 16. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1557402>