



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Милан З. Марковић

**ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМСКИХ
МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ПЕРИАПЕКСНИХ
ЛЕЗИЈА И ФАГОЦИТА**
ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Milan Z. Marković

**CROSS-TALK BETWEEN MESENCHYMAL
STEM CELLS FROM PERIAPICAL LESIONS
AND PHAGOCYTES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Захвалност

Ова докторска дисертација је у целости реализована у лабораторијама Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. Истраживања су финансирана од стране пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ-175102) којим руководи академик Миодраг Чолић и пројекта Медицинског Факултета Војномедицинске академије, УО (МФ-ВМА/10/16-18) којим руководи проф. др Драгана Вучевић.

На првом месту велику захвалност на несебичној помоћи у реализацији ове докторске дисертације дугујем академику *Миодрагу Чолићу*, који је руководио њеном изработом, почев од планирања пројекта, дизајнирања студије, саме реализације експеримената, тумачења резултата и писања текста. Академику *Миодрагу Чолићу* такође желим да се захвалим на људским и пријатељским саветима и помоћи у превазилажењу пратећих проблема у току мог рада на пројекту што ми је помогло да стекнем нова како професионална тако и животна искуства.

Желим да се захвалим професору др *Стеви Најману*, на изузетној сарадњи током реализације овог доктората, на саветима, корекцијама, предлозима за модификацију дисертације и који се у одсутном периоду за њену реализацију прихватио улоге ментора.

Захваљујем се професорки др *Драгани Вучевић* као свом учитељу свих метода и принципа лабораторијског рада као и на крајње пријатељским животним саветима на основу којих сам огромним делом оформио своје професионалне и приватне ставове. Професорки *Драгани* бих такође желео да се захвалим на разумевању за своје грешке, што је свеукупно резултирало незаборавним успоменама којих ћу се увек радо и са топлином у срцу сећати.

Огромну захвалност такође желим да искажем професору др *Саши Василијићу* и професорки др *Биљани Божић* на пријатељским саветима, непосредној помоћи у савладавању лабораторијских техника рада.

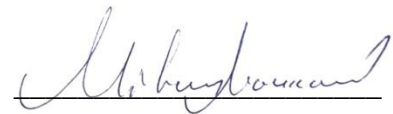
Захваљујем се доц др *Драгану Газиводи* и професору др *Милошу Дуки* који су ми помогли у сакупљању периапексних лезија за потребе истраживања као и за њихову адекватну клиничку класификацију.

Посебно се захваљујем професорки др *Вери Тодоровић* на несебичној помоћи око имунохистолошких метода.

Такође желим да се захвалим свим својим непосредним сарадницима који су својим радом допринели да мој посао око израде дисертације буде лакши: *Сергеју Томићу, Душану Михајловићу, Јелени Ђокић, Тањи Цопалић, Милијани Васиљевској, Петру Милосављевићу, Ивану Рајковићу и Драгани Змијањац.*

На крају желим да се захвалим својим родитељима и сестри као и нашим породичним пријатељима чика Раши и тетка Нади који су ми давали пуну подршку и који су пролазили кроз све проблеме заједно са мном у току реализације ове докторске тезе.

ПУНО ХВАЛА!



др Милан З. Марковић

Успех треба да се мери не толико положајем до којег је неко доспео током живота,
већ препрекама које је морао да савлада.

Букер Т. Вашингтон

*Дисертацију посвећујем
својим родитељима*

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Проф. др Стево Најман, Медицински факултет Универзитета у Нишу

Наслов:

Интеракција мезенхимских матичних ћелија из периапексних лезија и фагоцита

Резиме:

У овој тези је испитивана двосмерна интеракција мезенхимских матичних ћелија из периапексних лезија (PL-MSC) са инфламацијским ћелијама из PL и фагоцитима (гранулоцити и макрофаги) *in vitro*, праћењем фенотипских промена, продукције цитокина, диференцијације, апоптозе и NET-озе. Ефекат је процењиван у директном међућелијском контакту и индиректно у систему са полупропустљивом мембраном. У циљу опонашања *in vivo* услова, ко-културе су додатно стимулисане про-инфламацијским медијаторима.

Показано је да успостављене PL-MSC линије поседују морфолошке карактеристике фибробласта, имају висок капацитет за самообнављање, формирају колоније, показују експоненцијални ток раста, имају способност диференцијације у остеобласте, хондробласте и адипоците и испољавају маркере типичне за MSC из других денталних ткива. На основу хистолошке анализе и литературних података везаних за друге MSC, могло се претпоставити да је субпопулација перицита извор PL-MSC.

LPS, Poly I:C, Pam3CSK4 и коктел цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-6) са додатком PGE2 повећавају експресију CD73 и IDO-1 молекула, али различито модулирају продукцију цитокина од стране PL-MSC.

PL-MSC повећавају продукцију имунорегулацијских цитокина од стране укупних инфламацијских ћелија (IC) из PL. PL-MSC успостављене из клинички различитих лезија смањују продукцију проинфламацијских цитокина, а повећавају ниво имунорегулацијских цитокина од стране мононуклеарних ћелија из PL.

PL-MSC (перицити) остварују блиске контакте са гранулоцитима и макрофагима *in situ*, што може бити покретач њихових двосмерних комуникација. У том контексту, PL-MSC смањују продукцију TNF- α од стране нестимулисаних и активисаних (LPS, fMLP) гранулоцита и инхибирају њихову апоптозу, где доминантну улогу има IL-6. Са друге стране,

гранулоцити стимулишу продукцију IL-6 од стране PL-MSC.

NET различито модулира палету цитокина од стране PL-
MSC у култури, а PL-MSC немају уплив у процес NET-озе.

PL-MSC подстичу поларизацију спонтано диференцираних
макрофага (sMØ) у правцу M1, а макрофага индукованих са M-
CSF-ом (mMØ) или GM-CSF-ом (gmMØ) у правцу M2 фенотипа.

Генерално, осим доминантног анти-инфламацијског и
имуно-супресивног потенцијала, PL-MSC могу поспешити
поједине инфламацијске реакције у PL, путем двосмерних
комуникација са фагоцитима што указује на њихову
функционалну пластичност.

Научна област:	Стоматологија
Научна дисциплина:	Матичне ћелије зуба
Кључне речи:	Мезенхимске матичне ћелије, периапексне лезије, инфламација, инфламацијске ћелије, гранулоцити, екстраћелијске замке неутрофила, макрофаги, ћелијске културе
УДК:	616.314.165-002-097:577.27(043.3)
CERIF класификација:	B 730 Одонтологија, Стоматологија
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Prof dr Stevo Najman, Faculty of Medicine University of Niš

Title:

Cross-talk between mesenchymal stem cells from periapical lesions and phagocytes

Abstract:

In this PhD thesis the interactions of mesenchymal stem cells from periapical lesions (PL-MSc) with inflammatory cells and phagocytes (granulocytes and macrophages) were examined *in vitro*, through phenotypic changes, cytokines production, differentiation, apoptosis and NET-osis. The effects were investigated in direct cell-to-cell contacts and in transwell system. In order to imitate the most reliable settings like *in vivo* conditions, co-cultures were treated with pro-inflammatory stimuli.

It has been shown that PL-MSc possess fibroblast-like morphology, have great capacity for self renewing, form colonies with exponential growth rate, differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes and express markers typical for other dental MSC. Based on histological analysis and literature data about other MSC, it could be postulated that PL-MSc resides within the subpopulation of pericytes.

LPS, Poly I:C, Pam3CSK4 and cytokine cocktail (IL-1 β , TNF- α , IL-6) with PGE2 up-regulate the expression of CD73 and IDO-1 molecules, but differently modulate cytokine production by PL-MSc.

PL-MSc up-regulate the production of immunoregulatory cytokines by total inflammatory cells (IC) from PL. PL-MSc isolated from clinically different lesions, down-modulate the production of pro-inflammatory cytokines, but up-regulate the production of immunoregulatory cytokines by mononuclear cells in PL.

PL-MSc (pericytes) form close contacts with granulocytes and macrophages *in situ*, which could trigger their cross-talk interactions. Namely, PL-MSc down-modulate the production of TNF- α by native and activated (LPS, fMLP) granulocytes and inhibit their apoptosis, where IL-6 has a dominant role. On the other side, granulocytes stimulate the production of IL-6 by PL-MSc.

NET differently modulated the production of cytokines panel by PL-MSc in culture, but PL-MSc do not affect NET-osis.

PL-MSc polarized spontaneously differentiated macrophages (sM \emptyset) towards M1, and M-CSF (mM \emptyset)- or GM-CSF (gmM \emptyset)-induced macrophages towards M2 phenotype.

Generally, despite anti-inflammatory and immunosuppressive potential, PL-MSC promote certain inflammatory reactions in PL, via cross-talk with phagocytes, suggesting their functional plasticity.

Scientific
Field:

Dentistry

Scientific
Discipline:

Dental stem cells

Key Words:

Mesenchymal stem cells, periapical lesions, inflammation, inflammatory cells, granulocytes, neutrophil extracellular traps, macrophages, cell culture

UDC:

616.314.165-002-097:577.27(043.3)

CERIF
Classification:

B 730 Odontology, Dentistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Садржај

I. Списак скраћеница.....	i
1. Увод.....	1
1.1. Периапексне лезије и њихова класификација.....	1
1.2. Етиологија периапексних лезија	2
1.2.1. Улазна врата и пут ширења инфекције	3
1.2.2. Микро-флора периапексних лезија	3
1.2.3. Интеракција бактерија у периапексним лезијама	4
1.2.4. Способност микроорганизама да избегну имунски систем домаћина.....	5
1.2.5. Улога LPS-а и других микробских продуката у периапексним лезијама.....	5
1.3. Ћелијски састав периапексних лезија.....	6
1.3.1. Неутрофилни гранулоцити.....	7
1.3.2. Мононуклеарни фагоцити	7
1.3.3. Дендритске ћелије	8
1.3.4. Т и В лимфоцити	10
1.3.5. Мастоцити	11
1.3.6. Остеокласти	11
1.3.7. Маласезове епителне ћелије.....	12
1.4. Неутрофилни гранулоцити.....	12
1.4.1. Адхезија неутрофилних гранулоцита за ендотелне ћелије крвних судова у инфламацији	13
1.4.2. Миграција неутрофилних гранулоцита у ткиво	14
1.4.3. Фенотипске промене неутрофилних гранулоцита у инфламацији	15
1.4.4. Функционалне промене неутрофилних гранулоцита у инфламацији.....	15
1.4.5. Екстраћелијске замке неутрофила	16
1.5. Макрофаги	17
1.5.1. Субпопулације моноцита.....	17
1.5.2. Прелазак у ткиво и функционалне карактеристике моноцита.....	18
1.5.3. Диференцијација моноцита и М1/М2 поларизација	19
1.6. Мезенхимске матичне ћелије.....	20
1.7. Мезенхимске матичне ћелије зуба	21
1.7.1. Изолација и основне карактеристике D-MSС.....	22

1.7.2. Експресија површинских маркера D-MSС	23
1.7.3. Диференцијација у ћелије мезенхимског порекла	25
1.7.3.1. Остео/одонтогена диференцијација	25
1.7.3.2. Хондрогена диференцијација	26
1.7.3.3. Адипогена диференцијација	26
1.7.4. Диференцијација у ћелије не-мезенхимског порекла	27
1.8. MSС1/MSС2 поларизација	27
1.9. Криопрезервација MSС	29
2. Хипотезе и циљеви истраживања	30
3. Материјал и методе	32
3.1. Медијум, пуфери и агонисти	32
3.1.1. RPMI 1640 медијум	32
3.1.2. α -MEM медијум	32
3.1.3. Медијум за остеогену диференцијацију PL-MSС	32
3.1.4. Медијум за хондрогену диференцијацију PL-MSС	32
3.1.5. Медијум за адипогену диференцијацију PL-MSС	33
3.1.6. HBSS (енгл. Hank's Balanced Salt Solution) медијум	33
3.1.7. HBSS ⁺ медијум	33
3.1.8. PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline)	33
3.1.9. PBS1	33
3.1.10. PBS2	33
3.1.11. Калијум-PBS	34
3.1.12. Раствор трипсина у NaEDTA/PBS-у	34
3.1.13. Пропидијум јодид	34
3.1.14. Пропидијум јодид у хипотонном пуферу	34
3.1.15. Декстран 500	34
3.1.16. Пуфер за лизирање еритроцита	34
3.1.17. Рекомбинантни хумани фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (GM-CSF)	35
3.1.18. Рекомбинантни хумани фактор стимулације колонија макрофага (M-CSF)	35
3.1.19. Моноклонска антитела	35
3.1.20. Липополисахарид	36
3.1.21. Poly I:C	37

3.1.22. Pam3CSK4	37
3.1.23. Коктел проинфламацијских цитокина	37
3.1.24. Форбол-12-миристан-13-ацетат.....	37
3.1.25. N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин	37
3.1.26. Луминол	37
3.1.27. Комплекти за квантификацију продукције цитокина.....	38
3.2. Изолација PL-MSC	39
3.3. Способност формирања колонија - CFU-F тест.....	40
3.4. Време дуплирања ћелијске популације	40
3.5. Диференцијација PL-MSC.....	40
3.5.1. Остеогена диференцијација.....	40
3.5.2. Хондрогена диференцијација.....	41
3.5.3. Адипогена диференцијација.....	41
3.6. Проточна цитофлуориметрија	42
3.7. Третман PL-MSC са TLR агонистима	43
3.8. Третман PL-MSC са коктелом проинфламацијских цитокина.....	43
3.9. Квантификација продукције цитокина у култури PL-MSC након третмана са агонистима TLR и коктелом проинфламацијских цитокина.....	44
3.10.Изолација инфламацијских ћелија из периапексних лезија	45
3.11.Ко-култура PL-MSC и PL-IC.....	45
3.12.Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSC и PL-IC46	
3.13.Ко-култура PL-MSC и PL-MNC	46
3.14.Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSC и PL-MNC.....	46
3.15.Изолација неутрофила из периферне крви	47
3.16.Ко-култура PL-MSC и неутрофилних гранулоцита	47
3.17.Имунохистохемијска анализа	48
3.18.Припрема NET-а.....	49
3.19.Мерење NET-озе у <i>in vitro</i> ко-култури гранулоцита периферне крви са PL-MSC	49

3.20.Третман PL-MSC са NET-ом.....	50
3.21.Пролиферација PL-MSC након третмана са NET-ом.....	50
3.22.Квантификација продукције цитокина у култури PL-MSC након третмана са NET-ом	51
3.23.Апоптоза гранулоцита	51
3.24.Утицај рекомбинантног IL-6 на апоптозу гранулоцита.....	51
3.25.Реверзија апоптозе гранулоцита помоћу anti-IL-6 mAb	52
3.26.Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSC и неутрофила.....	52
3.27.Изолација моноцита и њихова диференцијација у макрофаге.....	52
3.28.Ко-култура PL-MSC и MØ	53
3.29.Фенотип MØ у ко-култури са PL-MSC	53
3.30.Детекција интрацелуларних цитокина.....	54
3.31.Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSC и MØ..	54
3.32.Статистичка анализа података.....	54
4. Резултати	55
Део I. Успостављање и карактеризација PL-MSC линија.....	55
4.1. Морфологија, клоногеност и степен пролиферације PL-MSC.....	55
4.2. Фенотипска карактеризација PL-MSC.....	56
4.3. Експресија MSC маркера у PL.....	58
4.4. Диференцијација PL-MSC.....	68
4.5. Продукција цитокина у култури PL-MSC након стимулације са TLR агонистима и коктелом проинфламацијских цитокина	69
Део II. Интеракција PL-MSC и локалних имунских ћелија	75
4.6. Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране PL-IC.....	75
4.7. Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране PL-MNC.....	78
Део III. Интеракција PL-MSC и фагоцита	86
4.8. Колокализација PL-MSC и фагоцита <i>in situ</i>	86
4.9. Интеракција PL-MSC и гранулоцита преко продукције цитокина.....	89

4.10.Ефекат PL-MSC на апоптозу гранулоцита	94
4.11.Ефекат PL-MSC на апоптозу активираних гранулоцита	95
4.12.Ефекат PL-MSC на апоптозу неутрофилних гранулоцита из PL.....	96
4.13.Улога IL-6 у антиапоптотским ефектима PL-MSC на гранулоците	97
4.14.NET модулира продукцију цитокина у култури PL-MSC	98
4.15.Утицај PL-MSC на процес NET-озе	103
4.16.Интеракција PL-MSC и MØ <i>in vitro</i>	104
4.16.1. Интеракција PL-MSC и спонтано диференцираних MØ.....	104
4.16.2. Интеракција PL-MSC и MØ диферецираних са M-CSF	109
4.16.3. Интеракција PL-MSC и MØ диференцираних са GM-SCF	119
5. Дискусија	128
5.1. Карактеризација PL-MSC	128
5.2. <i>In situ</i> локализација PL-MSC.....	133
5.3. Функционална поларизација PL-MSC	141
5.4. PL-MSC повећавају продукцију имунорегулацијских цитокина од стране PL-IC у култури.....	145
5.5. PL-MSC различито модулирају продукцију цитокина од стране локалних MNC.....	147
5.6. Интеракција PL-MSC и гранулоцита	149
5.7. Утицај NET-а на продукцију цитокина у култури PL-MSC	157
5.8. Интеракција PL-MSC и MØ	158
6. Закључци	164
7. Литература	167
8. Биографија аутора	197

I. Списак скраћеница

2-ME	2-меркаптоетанол
A1R	аденозински рецептор A1
Ab	антитело
Abs	абсорбанца
ALP	алкална фосфатаза
AT-MSC	мезенхимске матичне ћелије масног ткива
BM-MSC	мезенхимске матичне ћелије костне сржи
BMP	протеин морфогенезе кости
BSP	сијалопротеин кости
C	компонента комплемента
CD	површински молекули „ <i>cluster differentiation</i> ”
cDC	конвенционалне дендритске ћелије
CEMP1	цементни протеин
CFU-f	ћелијске колоније налик на колоније фибробласта
COL	колаген
cpm	број откуцаја у минути
DC	дендритске ћелије
DFSC	матичне ћелије денталног фоликула
D-MSC	мезенхимске матичне ћелије зуба
DMSO	диметил-сулфоксид
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
DNKaza	дезоксирибонуклеаза
DPSC	матичне ћелије зубне пулпе
DSP	сијалопротеин дентина
DSPP	дентални сијалофосфопротеин
EC	ендотелне ћелије
ECM	екстраћелијски матрикс
EGF	епидермални фактор раста
ENA-78	епителни протеин активације неутрофила
ERM	Малацезове епителне ћелије
ESC	ембрионалне матичне ћелије

EtOH	етанол
FBS	„ <i>fetal bovin serum</i> “
Fc	рецептор на површини ћелијске мембране
FCS	фетални телећи серум
FGF	фибробластни фактор раста
FITC	флуоресцеин изотиоцијанат
fMLP	N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин
GM-CSF	фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага
gmMØ	макрофаги диференцирани са GM-CSF
H ₂ O ₂	водоник-пероксид
HBSS	Хенксов пуферисани физиолошки раствор
HEMA	хидроксиетил метакрилат
HEV	активирани ендотелне ћелије венула
HGF	фактор раста хепатоцита
HIF	хипоксија индуцибилни фактор
HLA	хумани леукоцитни антиген
h-MSC	матичне ћелије из фоликула длаке
HOCl	хипохлорна киселина
HSC	хематопоетске матичне ћелије
hTERT	хумана реверзибилна транскриптаза теломераза
ICAM	интерћелијски адхезиони молекули
IFN	интерферон
IFN- γ	интерферон γ
Ig	имуноглобулин
IGF	инсулински фактор раста, соматомедин C
IL	интерлеукин
ITGA5	интегрин 5 α протеин
KPE	калијум-фосфатни пуфер са NaEDTA
LBP	LPS везујући протеин
L-MSC	мезенхимске матичне ћелије јетре
LN ₂	течни азот
LPS	липополисахарид
LTB4	леукотријен B4

mAb	моноклонско антитело
MAPK	митогеном-активирана протеинска киназа
MCP-1	моноцитни хемоатрактивни протеин
M-CSF	фактор стимулације колонија макрофага
mDC	мијелоидне дендритске ћелије
MDP	заједнички прекурсор макрофага и дендритских ћелија
MEPE	фосфорилисани гликопротеин екстраћелијског матрикса
MFI	средња вредност интензитета флуоресценце
MHC	молекули главног комплекса ткивне подударности
MIF	фактор инхибиције миграције макрофага
MIP-1 α	макрофагни инфламаторни протеин 1 α
mM \emptyset	макрофаги диференцирани са M-CSF
M \emptyset	макрофаге
Mo-DC	дендритске ћелије моноцитног порекла
MPO	мијелопероксидаза
MSC	мезенхимске матичне ћелије
Mo	моноцити периферне крви
Mo-DC	дендритске ћелије моноцитног порекла
NADPH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NaEDTA	Na етилендиаминтетраацетатна киселина
NaHCO $_3$	натријум хидроген карбонат
NaN $_3$	натријум азид
NE	неутрофилна еластаза
NET	неутрофилне екстраћелијске замке
NO	азот моноксид
NSC	матичне ћелије мозга
OCT	остеокалцин
OPN	остеопонтин
PADI4	пептидил-аргинин диаминаза 4
PAF	фактор активације тромбоцита
PBMC	мононуклеарне ћелије периферне крви
PBS	пуферисани физиолошки раствор
pc-MSC	плаценталне матичне ћелије

PCR	метода амплификације DNK
pDC	плазмоцитоидне дендритске ћелије
PDLSC	матичне ћелије периодонталног лигамента
PDt	време дуплирања ћелијске популације
PE	фикоеритрин
PHA	фитохемаглутинин
PI	пропидијум јодид
PL	периапексне лезије зуба
PL-MSc	мезенхимске матичне ћелије из периапексних лезија
PMA	форбол-12-миристат-13-ацетат
PMN	полиморфонуклеарни леукоцити
p-MSc	матичне ћелије панкреаса
PRM	обрасци за препознавање патогена
RANKL	рецепторски активатор за нуклеарни фактор kB
RNK	рибонуклеинска киселина
ROS	реактивни кисеонични радикали
rpm	број обртаја у минути
SD	стандардна девијација
SDF-1 α	стромални ћелијски фактор 1 α
SEM	скенинг електронска микроскопија
SHED	матичне ћелије екстрахираних млечних зуба
sM \emptyset	спонтано диференциране M \emptyset
S-MSc	синовијалне мезенхимске матичне ћелије
Tc	цитотоксични Т лимфоцити
TCR	Т ћелијски рецептор
TfR	трансферински рецептор
TGF- β	фактор трансформације раста β
Th	помоћнички Т лимфоцити
TLR	рецептори слични Toll-у
TNF- α	фактор некрозе тумора α
Treg	регулаторни Т лимфоцити
TRPM7	Ca-Mg јонски канал
Tw	„ <i>Transwell</i> “, инсерт

TEM	трансмисиона електронска микроскопија
UCB-MSC	мезенхимске матичне ћелије из крви пупчане врпце
VCAM	васкуларни ћелијски адхезивни молекул
VEGF	васкуларни ендотелијални фактор раста
VLA	антиген касне активације
VSMC	васкуларне глатко-мишићне ћелије
vWF	<i>Von Willebrand</i> фактор
α SMA	α -актин глатких мишићних ћелија

1. Увод

1.1. Периапексне лезије и њихова класификација

Периапексне лезије (енгл. *periapical lesions*, PL) су хронични инфламацијски процеси који се формирају у пределу врха корена зуба као последица ширења бактеријске инфекције из инфламиране пулпе (Narayanan и Vaishnavi 2010). Најчешћи узрочник инфламације пулпе зуба је каријес (латин. *caries dentis*), обољење тврних зубних ткива, које је праћено адекватном клиничком симптоматологијом. Запаљење пулпе (латин. *pulpitis*), уколико се не лечи или некомплетно и неадекватно лечи, доводи до пропагације запаљења у периапексни регион где започиње процес развоја PL. Сам процес формирања PL је сложен и последица је дејства бројних фактора, међу којима главну улогу имају бактерије које најчешће доспевају из инфициране пулпе и које посредством токсина, ензима и других биомолекула делују на одбрамбене механизме домаћина. Осим бактерија и имунских ћелија урођене и стечене имуности, у PL су присутне и бројне стромалне ћелије као што су фибробласти, ендотелне ћелије и епителне ћелије (Маласезова отрвца). Недавно је у PL показано присуство и мезенхимских матичних/стромалних ћелија (енгл. *mesenchymal stem/stromal cells*, MSC) (Liao *u cap.* 2011), чија улога у имунским механизмима и патофизиолошким процесима унутар PL још увек није расветљена. У току интеракција између бактерија, стромалних и имунских ћелија у PL долази до нарушавања ткивног интегритета периапекса, што се огледа у процесима деминерализације алвеоларне кости и разградње органског матрикса ткива. Паралелно са фазом деструкције алвеоларне кости, дентина и цемента корена зуба, у коме учествују остеокласти, одвија се процес репарације тј. ремоделације оштећених ткива. У том контексту главна одлика PL је хронична инфламација која је праћена повременим фазама акутне егзацербације, што се манифестује одговарајућом клиничком симптоматологијом (Nair 2004). На основу присуства/одсуства клиничких симптома PL могу бити симптоматске (sy) и асимптоматске (as), а према току инфламације се деле на акутне и хроничне (Marton и Kiss 2014). У односу на преминацију популације лимфоцита могу се класификовати на Т и В тип лезија (Ћолић *u cap.* 2009с). Симптоматске PL карактерише повећана експресија адхезионих молекула који су

одговорни за миграцију леукоцита из крви у периапексно ткиво (Silva *u cap.* 2005), и доминација Т „helper“1 (Th1) и Th17 имунског одговора. Истовремено долази до повећања продукције цитокина урођене имуности као што су интерлеукин (IL)-1, фактор некрозе тумора (TNF)- α и IL-6, што има за последицу интензивну ресорпцију кости (Stashenko *u cap.* 1992, Čolić *u cap.* 2006, Gazivoda *u cap.* 2009). С друге стране, код asPL је чешћа доминација Th2 и Т регуацијског (Tregs) имунског одговора у којима долази до продукције анти-инфламацијских (IL-4, IL-5 и IL-13) и имунорегулацијских цитокина као што су IL-10 и трансформишући фактор раста β (TGF)- β , а који доприносе регенерацији оштећеног ткива и смањењу инфламације (Danin *u cap.* 2000, Čolić *u cap.* 2009b, Fukada *u cap.* 2009).

1.2. Етиологија периапексних лезија

Као што је напоменуто, ако се *caries* не лечи, доводи до *pulpitis-a*, при чему се инфекција из пулпе даље може проширити у периапексни предео корена (латин. *apical periodontitis*) (Nair 2004). Главни етиолошки фактор у настанку PL је бактеријска инфекција, док остали фактори као што су морфологија зуба, хемијски састав пљувачке, ортодонтске аномалије, повреда и присуства неког системског обољења чине секундарне (доприносеће, споредне) факторе. Присуство различитих бактеријских сојева у некротичној пулпи зуба показано још пре више од једног века (Miller 1890). Нешто касније, установљено је да међу свим микроорганизмима некротичне пулпе доминантну популацију чине анаеробне бактерије, што их у основи кандидује за потенцијалне узрочнике у настанку PL (Moller 1966). На бази ових истраживања и након детаљне анализе инфициране пулпе и периапекса помоћу светлосног и електронског микроскопа, донет је коначан консензус о етиолошком фактору за *pulpitis* и *periodontitis* (Nair 1987). Обзиром да се након ендодонтског третмана канала корена зуба одређени број PL и даље развија, испитивано је да ли су и који бактеријски сојеви за то одговорни. Показано је да је међу њима 63.6% анаеробних бактерија и 36.4% факултативних анаероба. Од тога 31.8% припада *Actinomyces species*, 22.7% чини *Propionibacterium species*, 18.2% је *Streptococcus species*, 13.6% чини *Staphylococcus species*, 4.6% припада *Porphyromonas gingivalis*, 4.6% су бактерије соја *Peptostreptococcus micros* док 4.6% припада Грам негативним (G^-) ентеро-бактеријама (Abou-Rass и Bogen 1998). Из

свега наведеног се може претпоставити да бактерије формирају специфичан миеоекосистем у РЛ и да су главни етиолошки фактор за њихов настанак.

1.2.1. Улазна врата и пут ширења инфекције

Обзиром да су РЛ директна последица инфекције пулпе и индиректна последица развоја каријеса, основни пут ширења инфекције у периапесни регион је десцедентни (вертикални) преко инфицираног канала корена зуба. Пулпа зуба је смештена у главној, централној шупљини (латин. *cavum dentis*) и састоји се од круничног, вратног и коренског дела. Међутим, поред главног пулпног система, постоје ко-латералне комуникације са периодонталним лигаментом у виду акцесорних каналића, затим рамификација пулпе у пределу апекса корена зуба (тзв апикална делта) и структурни дефекти глеђи (тзв глеђне ламеле), преко којих бактерије асцедентним кретањем из плака могу доспети у пулпу. Тако на пример у случају пародонтопатије тј обољења потпорних структура зуба, које између осталог карактерише повлачења гингиве, ресорпција алвеоларне кости и експозиција глеђно-цементне границе и цемента корена зуба бактеријама из денталног плака, омогућен је и олакшан продор бактерија кроз поменуте структурне дефекте и дентинске каналиће, дуж одонтобластних продужетака (Томесова влакана) у пулпу (Wittgow и Sabiston 1975). Треба напоменути још и могућност ширења инфекције путем крви (латин. *anachoresis*) (Allard *u cap.* 1979), мада је то најређи вид инфекције пулпе и периапекса. На крају треба истаћи да иако постоји могућност ширења инфекције различитим алтернативним правцима, за инфекцију пулпе је каријес најзначајнији, а за инфекцију периапекса је одговорна некротична зубна пулпа.

1.2.2. Микро-флора периапексних лезија

За настанак и развој РЛ одговорни су бројни фактори међу којима најзначајнију улогу имају различити сојеви бактерија. Бројне студије су се бавиле проблемом хетерогености бактеријске флоре и показале да у инфицираној пулпи зуба око 70% свих бактерија чине анаеробни сојева из родова *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium* и *Peptostreptococcus* (Shah и Collins 1988, Baumgartner и Falkler 1991, Moore и Moore 1994). Када је у питању инфицирана пулпа зуба са морфолошки интактном круницом, онда број анаероба прелази и 90%

свих бактерија (Wittgow и Sabiston 1975, Abou-Rass и Bogen 1998). Осим бактерија, у PL је показано присуство спирохета и гљивица (Waltimo *u cap.* 2003), као и вируса код пацијената инфицираних вирусом хумане имунодефицијенције (Glick *u cap.* 1991). Детаљна квантификација испитиваних патогена, на првом месту бактерија, и потпунија сазнања о појединим сојевима, добијени су тек касније помоћу прецизнијих молекуларних и генетских метода (Munson *u cap.* 2002). Открићем методе за амплификацију DNK (енгл. *polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis и Faloona 1987) и њеном применом у микробиологији (Spratt *u cap.* 1999), омогућена је једноставнија и бржа детекција бактерија. Развојем и унапређењем метода и дијагностичких процедура у овој области, значајно су убрзана истраживања о повезаности различитих бактерија и њихових продуката са прогресијом PL.

1.2.3. Интеракција бактерија у периапексним лезијама

Настанак и развој PL директно зависи од врсте бактерија, њихове међусобне интеракције, степена синтезе и секреције различитих полипептидних ензима којима оне разграђују екстрацелуларни ткивни матрикс (енгл. *extracellular matrix*, ECM). Осим тога, значај има и липополисахарид (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS) и други имуномодулацијски молекули у виду мембранске или солубилне форме. Посебну пажњу привлаче резултати о међусобним интеракцијама различитих сојева бактерија, за које је установљено да у знатној мери усмеравају, опредељују али и лимитирају одбрамбене реакције домаћина. У том смислу, за настанак неких лезија одговорни су сојеви бактерија који делују самостално (селекција бактерија), док је за њихово одржање током развоја лезије, неопходно синергистичко дејство са различитим другим сојевима бактерија. Тако је на експерименталном моделу PL зуба мајмуна показано да међу свим изолованим сојевима бактерија, доминантну улогу има сој *Prevotella oralis*, који сам не доводи до формирања PL (Fabricius *u cap.* 1982), већ у интеракцији са осталим бактеријама стимулише формирање специфичног бактеријског екосистема (дентални плак), у ком постепено долази до стварања услова за иницијацију PL (Carlsson 1990). У том контексту, реакција домаћина се своди или на потпуну елиминацију инфекције (слаба бактеријска кохезија) или на ограничење процеса преко активације имунског одговора када се ствара специфична симбиоза између бактерија и њихових продуката и имунског

система. Када је равнотежа померена према микробима долази до егзацербације обољења (Čolić *u cap.* 2007).

1.2.4. Способност микроорганизама да избегну имунски систем домаћина

Као што је описано интеракција бактерија и њихова селекција представља вид заштите од имунских механизма домаћина. Осим тога поједине бактерије у циљу боље заштите од имунских механизма домаћина, продукују атипичне токсине измењене структуре. Тако на пример, LPS, кога продукује *Porphytomonas gingivalis*, не доводи до експресије Е-селектина на ендотелу капилара и посткапиларних венула крвних судова, чиме је екстравазација имунских ћелија у инфламацијом захваћено ткиво ограничена (Sundqvist 1994). Поједине G⁻ бактерије на својој површини имају исказане партикуле (енгл. *blebs*) за које се везују неспецифична антитела, која маскирају антигене што отежава њихово препознавање од стране имунских ћелија. Поред тога, неке бактерије као што је *Actinomyces israelii*, често агрегирају и на тај начин формирају велике колоније које не могу бити фагоцитоване од стране неутрофила, иако их у *in vitro* условима неутрофили веома лако елиминишу (Figdor *u cap.* 1992). Због тога у одбрани од ових микроорганизама никад није заступљен искључиво један тип имунског одговора, што се постиже изузетном пластичношћу имунског система.

1.2.5. Улога LPS-а и других микробских продуката у периапексним лезијама

Дејство бактерија на ткивне стромалне компоненте и имунске ћелије у PL првенствено се заснива на продукцији различитих солубилних и/или мембранских форми токсина, полипептидних ензима и гликолипидних макромолекула. Један од најзначајнијих молекула је LPS, бактеријски ендотоксин, који улази у састав зида G⁻ бактерија. Осим тога, LPS може постојати и у солубилној форми која настаје приликом умножавања бактерија или као финални производ њихове деструкције. LPS директно утиче на повећање експресије адхезионих молекула на ендотелним ћелијама капилара и посткапиларних венула (Gotsch *u cap.* 1994), и преко рецептора сличних Toll-у (енгл. *toll like receptor*, TLR)-4 делује на ћелије урођене имуности (гранулоцити, макрофаги, дендритске ћелије) (Aderem и Ulevitch 2000).

У узорцима инфициране пулпе зуба детектован је висок ниво LPS-а (Horiba *u cap.* 1990), који у солубилној форми лако прелази у периапекс. То у основи представља „хемијску иритацију“ и сматра се иницијалним стимулусом за настанак PL (Yamasaki *u cap.* 1992). У том контексту, недавно је показано да LPS бактерије *Porphyromonas gingivalis* стимулише ресорпцију алвеоларне кости преко активатора рецептора за нуклеарни фактор кВ лиганд (енгл. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANKL) (Kassem *u cap.* 2015). Поред LPS-а, поједини модулини у форми угљених хидрата и липида, као саставне компоненте бактеријског зида, такође доприносе развоју PL (Henderson *u cap.* 1996). Међу ензимима одговорним за ове процесе треба издвојити микробну колагеназу, хијалуронидазу, фибринолизин и неспецифичне протеазе, преко којих бактерије делују локално али могу имати и системски токсични ефекат, када се за то створе услови. Тако на пример сојеви из рода *Bacteroides* имају способност да врше неспецифичну разградњу IgG, IgM па чак и C3 и C5 компоненте комплемената (Sundqvist *u cap.* 1985). Различитим бактеријским протеинима најчешће је заједничка само једна секвенца са имуногеним својствима. Тако Pam3SCK4 (трипалмитоил липопептид, TLR2 агонист) који је синтетски аналог терминалном аминокетатном делу липопротеина G⁺ и G⁻ бактерија, индукује остеокластогенезу у култури макрофага (Yano *u cap.* 2012). Осим бактеријских продуката одговорних за настанак PL, у новијој литератури је показано да хумани фибробласти након стимулације са Poly I:C у култури доводе до повећане диференцијације и миграције Th17 ћелија (Nosokawa *u cap.* 2013). Разноврсна палета имуностимулатора продукованих од стране бактерија и вируса доприноси хетерогености и сложености бројних механизма унутар PL. То истовремено представља стални изазов за даља истраживања, а у циљу планирања ефикаснијег терапијског приступа.

1.3. Ћелијски састав периапексних лезија

У периапексним лезијама се осим бактерија и њихових продуката, налазе различите инфилтришуће и стромалне ћелије, прожете пролиферисаним епителним тракама, крвним судовима, нервима и фиброзним везивним ткивом. Популацију укупних инфилтришућих, инфламацијских ћелија (IC) чине: гранулоцити, ћелије моноцитног порекла (макрофаги и дендритске ћелије), Т лимфоцити, В лимфоцити, плазмцити (PC), мастоцити и мали проценат других атипичних ћелија (Lukić *u*

cap. 1990, Lukić *u cap.* 2006, Čolić *u cap.* 2009c). Међутим, састав IC варира у зависности од типа PL и њиховог развојног стадијума. Тако је на пример код syPL показано да су у инфилтратима најзаступљенији неутрофилни гранулоцити, док код asPL доминантну ћелијску популацију чине лимфоцити (Čolić *u cap.* 2009c). Од стромалних ћелија битну улогу у формирању PL имају: остеобласти (из коштаног система), остеокласти, фибробласти и Маласезове епителне ћелије (енгл. *epithelial cell rests of Malassez*, ERM) (Lukić *u cap.* 1990, Liapatas *u cap.* 2003, Rincon *u cap.* 2006). Овим ћелијама треба придодати и MSC чија се улога тек испитује (Liao *u cap.* 2011, Djokić *u cap.* 2012).

1.3.1. Неутрофилни гранулоцити

Неутрофилни гранулоцити су доминантна популација и прве ћелије које доспевају у ткиво у иницијалној фази инфламације и формирања PL (латин. *periodontitis exudativa*), као и у фази егзацербације хроничног запаљења (латин. *periodontitis chronica*) (Marton и Kiss 2014). Њихова улога се првенствено базира на фагоцитози бактерија, продукцији реактивних кисеоничних радикала (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), проинфламацијских цитокина и ослобађању екстраћелијских замки у виду мреже (енгл. *neutrophil extracellular traps*, NET) доприносећи појачању Th1 имунског одговора и одбрани од бактеријске инфекције (Čolić *u cap.* 2009c, Gazivoda *u cap.* 2009, Amulic и Hayes 2011). Акутну фазу инфламације карактерише Th1 имунски одговор и повећана продукција проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α и IL-6), а у фази егзацербације хроничних PL доминира Th17 имунски одговор праћен повећаном продукцијом IL-17 (Čolić *u cap.* 2007) и RANKL (Vernal *u cap.* 2006), што такође има за циљ спречавање даљег ширења бактеријске инфекције, али се као нежељена реакција јавља интензивна ресорпција алвеоларне кости.

1.3.2. Мононуклеарни фагоцити

Према најновијој номенклатури предложеној од стране Williams *u cap.* (2014) моноцити и макрофаги (M \emptyset) спадају у мононуклеарне фагоците са новим обрасцем процеса диференцијације. M \emptyset настају од моноцита периферне крви који воде порекло од мијелоидног прекурсора из костне сржи и који под дејством CCL2 хемокина доспевају у циркулацију (Shi *u cap.* 2011). Циркулишући моноцити

прелазе у ткиво посредством CCL3, CXCL2 (MIP2) и CCL12 (MCP5) хемокина, где се диференцирају у ткивно специфичне MØ (Chen *и сар.* 2008).

Основна функција ткивно специфичних MØ је фагоцитоза распадних продуката и презентација антигена у склопу молекула главног комплекса ткивне подударности (енгл. *major histocompatibility complex*, MHC) ћелијама специфичне имуности. MØ такође имају важну улогу и у репарацији ткива захваћеног инфламацијом (Mosser и Edwards 2008). У току тих процеса може доћи до наизменичног смењивања Th1, Th17, Th2 и Tregs имунског одговора, што има за последицу продукцију различитих фактора раста који утичу на поларизацију MØ у правцу проинфламацијских (M1) или имунорегулацијских (M2) ћелија. M1 преовладавају у фази доминације Th1 имунског одговора, при чему повећано продукују TNF- α и IFN- γ и имају снажну антимикуробну активност, док су IL-10 и TGF- β главни цитокини M2 типа који у склопу Tregs одговора доводе до смањења инфламације и интензивирања регенерације ткива (Mosser и Edwards 2008). MØ су врло значајни конституенти гранулома, где се њихова улога првенствено огледа не само у урођеној имуности, већ и у механизмима имунорегулације деловањем на основне про-инфламацијске механизме стечене имуности (Metzger 2000).

1.3.3. Дендритске ћелије

Дендритске ћелије (DC) су по функцији професионалне антиген презентујуће ћелије (Steinman и Cohn 1973), које одликује присуство великог броја цитоплазматских продужетака (Banchereau и Steinman 1998). У оквиру имунског одговора улога DC се огледа у преузимању и обради антигена, презентацији антигенских пептида Т лимфоцитима (Banchereau *и сар.* 2000, Shortman и Liu 2002, Shortman и Naik 2007) и активацији наивних Т лимфоцита. Оне су кључне ћелије које повезују механизме урођене и стечене имуности (Steinman и Hemmi 2006).

DC настају у костној сржи из прекурсора који потиче од хематопоетских матичних ћелија (енгл. *hematopoietic stem cells* HSC), одакле прелазе у циркулацију (непосредни прекурсори DC), а затим доспевају у ткива. По обављању програмираних функција, DC улазе у процес апоптозе (Buckwalter и Albert 2009, Mildner и Jung 2014).

DC се према типу прекурсора могу поделити на мијелоидне тј. конвенционалне DC (mDC или cDC) и лимфоидне тј. плазматоцитоидне DC (pDC).

Улога pDC се првенствено огледа у имунском одговору на вирусе, при чему оне продукују велике количине интерферона типа I (IFN) (Buckwalter и Albert 2009, Ganguly *и сар.* 2013). За разлику од њих, mDC чине бројнију популацију DC, које насељавају скоро сва ткива и органе као што су на пример: а) епидермис и слузокожа плочастослојевитог епитела, где се другачије називају Лангерхансове ћелије. Ове DC у односу на остале mDC карактерише присуство пенталамеларних интра-цитоплазматских органела тзв. Бирбекових гранула и CD206 површинског рецептора за манозу; б) дерм коже, где су присутне дермалне, интерстицијалне DC; в) и DC настале од моноцита (Mo-DC) које мигрирају у инфламацијом захваћено ткиво (Leon и Ardavin 2008, Buckwalter и Albert 2009). Овакве mDC припадају групи незрелих DC, које на својој површини испољавају рецепторе (TLR, Fc рецептори, лектински рецептори, рецептор за комплемент) за препознавање, интернализацију и обраду антигена микроорганизама (Sato и Fujita 2007, Ueno *и сар.* 2007). Тако на пример, DC преко TLR рецептора, врше препознавање различитих антигена попут бактеријског LPS-а, протеогликана, флагелина, CpG олигонуклеотида бактерија, једноланчаних и дволанчаних RNK вируса итд. Осим тога, незреле DC испољавају различите рецепторе за хемокине (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 и CXCR2) преко којих, процесом хемотаксе, доспевају у инфламацијом захваћено ткиво (Guermonprez *и сар.* 2002, Sato и Fujita 2007, Merad и Manz 2009). Тако доспеле DC, у интеракцији са антигенским компонентама микроорганизама (нпр. бактеријским LPS-ом), а у присуству про-инфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-6) сазревају уз истовремену активацију (Skoberne *и сар.* 2004, Sabatte *и сар.* 2007), што се детектује као повећање експресије CD83 (главни маркер сазревања DC), MHC-II, затим костимулаторних (CD80, CD86 и CD40) и адхезионих (CD2, CD11a, CD54, CD58, β интегрини) молекула на њиховој површини (Dalod *и сар.* 2014). Поред тога, у току сазревања DC смањује се експресија рецептора за инфламацијске цитокине а повећава експресија CCR7 и CXCR4 рецептора, за које се везују хемокини CCL19, CCL21 и CXCL12 продуковани у лимфним чворовима. Сазревање DC се постиже током њихове миграције у регионалне лимфне чворове где врше антигенску презентацију наивним Т лимфоцитима и њихову активацију (Martin-Fontecha *и сар.* 2009, Dalod *и сар.* 2014).

Присуство DC у је PL показано у моноклеарном ћелијском инфилтрату, методом проточне цитофлуориметрије (Lukić *u cap.* 2006, Čolić *u cap.* 2009c). Показано је да велики број ових DC експримира на својој површини CD86 молекуле, док свега половина њих експримира CD83, маркер зрелих DC (Čolić *u cap.* 2009c). То заправо указује на чињеницу да су у PL присутне фенотипски и зреле и незреле DC.

1.3.4. Т и В лимфоцити

Као што је раније изнето, једна од класификација PL према типу лимфоцита који доминира је њихова подела на Т и В тип лезија. Т лезије карактерише већи проценат CD4⁺ ћелија, док је проценат CD8⁺ ћелија скоро исти као и код Б лезија, при чему је показано да су Т и В лимфоцити дистрибуирани како дифузно тако и фокално у форми агрегата у PL. Установљено је да се заступљеност Т и В лимфоцита битно не разликује код syPL и asPL (Čolić *u cap.* 2009c). На основу тога али и ранијих испитивања се може закључити да је код оба типа PL заступљен и ћелијски и хуморлни имунски одговор (de Carvalho Fraga *u cap.* 2013). Т лимфоцити воде порекло из тимуса и према ефекторској функцији подељене су на помоћничке (Th, *helper*) и цитотоксичне (Tc, *citotoxic*). Th ћелије на својој површини испољавају CD4 молекуле, док су на површини Tc исказани CD8 молекули. CD4⁺ Т лимфоцити су према профили цитокина које продукују сврстани у Th1, Th2, Th17 и Tregs. Th1 ћелије продукују проинфламацијске цитокине (IL-1, TNF- α и IFN- γ), док су IL-4, IL-5 и IL-13 карактеристични за Th2 ћелије. Th17 ћелије под утицајем IL-23 продукују IL-17 који има неке функције сличне IFN- γ и делује заједно са TNF- α и IL-1 β као проинфламацијски цитокин. Кључан је за одбрану од екстрацелуларних микроорганизама и гљивица. С друге стране, В лимфоцити примају сигнале преодоминантно од стране Th2 ћелија након чега се трансформишу у ефекторске плазма ћелије (плазмоцити, PC) које продукују антитела IgE класе. Главни продукти Tregs су IL-10 и TGF- β који су битни за смањење (регулацију) имунског одговора у смислу његовог смањења (Čolić *u cap.* 2009c, Teixeira-Salum *u cap.* 2010).

1.3.5. Мастоцити

Мастоцити су ћелије богате гранулама испуњеним хистамином и хепарином. Њихова улога је описана у алергијским реакцијама и анафилакси, али и у процесима зарастања ране (Gilfillan *u cap.* 2011). Најзаступљеније су у везивним ткивима коже, слузокоже носа, дисајних путева, дигестивном тракту, вежњачи ока и оралној шупљини (Ramesh *u cap.* 2005). Међу свим инфилтришућим имунским ћелијама у PL, најмањи проценат (око 5%) припада мастоцитима, што је и показано методом имунохистохемије помоћу моноклонских антитела на c-kit и триптазу. На основу анализе, базиране на морфолошким карактеристикама, утврђено је да су мастоцити локализовани периваскуларно, између централног гранулационог ткива и периферне фиброзне капсуле (Čolić *u cap.* 2009c). Најновија истраживања показују да је проценат мастоцита у периапексним цистама значајно већи у односу на њихов удео у PL (Mahita *u cap.* 2015), што указује на могућу улогу ових ћелија у патогенези периапексних денталних цисти. Међутим, објављени су и супротни резултати (Shojaei *u cap.* 2015), што намеће потребу додатних испитивања између осталог и на већем броју узорака периапексног ткива.

1.3.6. Остеокласти

Остеокласти настају фузијом макрофага и њихова функција се огледа у интензивној ресорпцији кости у условима ниске вредности рН и ензимској разградњи колагеног матрикса (Teitelbaum 2000). За остеокластогенезу у знатној мери су заслужне Т ћелије које их активирају преко продукције RANKL и IFN- γ (Zhang *u cap.* 2010a). Показано је да Th1 имунски одговор у PL доводи до повећане експресије RANKL и индукције остеокластогенезе (Fukada *u cap.* 2009). Наиме, RANKL се везује за RANK на прекурсорима остеокласта и повећава експресију гена специфичних за остеокластогенезу (Menezes *u cap.* 2006). Осим тога повећана активност моноцита у PL доводи се у директну везу са повећаном продукцијом RANKL (Vernal *u cap.* 2006). Одонтокласти и цементокласти су ћелије које су према ултраструктурним и хистохемијским карактеристикама сличне остеокластима, а чија се функција огледа у ресорпцији дентина и цемента корена зуба (Sahara *u cap.* 1994). Најновија студија која је рађена на моделу PL зуба миша, показује да и цементцити у одговору на инфекцију из пулпе повећано продукују RANKL и највероватније у том смислу доприносе развоју PL (De Rossi *u cap.*

2016). Ови литературни подаци указују да је у процесу ресорпције кости у PL укључено неколико различитих типова ћелија, при чему функционално доминирају остеокласти.

1.3.7. Маласезове епителне ћелије

Маласезове епителне ћелије (ERM) су према ранијим истраживањима присутне у 26% испитиваних PL (Seltzer *и сар.* 1969). Наиме под утицајем различитих локално продукованих цитокина и фактора раста долази до појачане пролиферације ERM, што је познато као инфламацијска хиперплазија (Naig и Schmid-Meier 1986). Улога ERM је најбоље описана у склопу регенерације цемента корена зуба. Показано је да су ERM претежно лоциране у пределу периодонталног лигамента у нивоу ресорптивних лакуна, да су имунореактивне на протеин морфогенезе кости (енгл. *bone morphogenetic protein*, BMP-2), а да су у току ране фазе регенерације цемента позитивне на остеоопонтин и амелобластин (Hasegawa *и сар.* 2003). Претпоставља се да ERM могу бити укључене у процес регенерације цемента корена зуба у пределу PL.

1.4. Неутрофилни гранулоцити

Неутрофилни гранулоцити су ћелије урођене имуности које имају сегментирано једро састављено од 3 до 5 лобулуса повезаних хроматинским мостићима, због чега заједно са еозинофилима и базофилима, припадају популацији полиморфонуклеарних леукоцита (енгл. *polymorphonuclear leukocytes*, PMN). У њиховој цитоплазми се налазе два типа гранула: специфичне (пријемчиве за хематоксилин и еозин) које су испуњене ензимима као што су лизозими, колагеназа, еластаза и тзв. азурофилне грануле (лизозоми) које садрже ензиме попут мијелопероксидазе (енгл. *myeloperoxidase*, MPO), дефензине и катехолаmine. Према степену мобилности грануле су даље подељене на секреторне, желатинозне, специфичне и азурофилне грануле (Sengelov 1996). Неутрофили настају у костној сржи у процесу сазревања посредованим фактором раста гранулоцитних колонија (енгл. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF). Одређени број неутрофилних гранулоцита се посредством стромалног ћелијског фактора 1 α (енгл. *stromal cell-derived factor-1 α* , SDF-1 α) који делује преко CXCR4 хемокинског рецептора, задржава у костној сржи, што представља резерве ових ћелија. То омогућава да у

инфламацији, посредством хемокина као што је макрофагни инфламаторни протеин 2 (енгл. *macrophage inflammatory protein-2*, MIP-2), неутрофилни гранулоцити прелазе у циркулацију (10^{11} неутрофилних гранулоцита дневно), где се задржавају у просеку 5-6 сати. Неутрофилни гранулоцити мигрирају у инфламацијом захваћено ткиво у року од свега неколико минута. Ако нема инфламације долази до њихове спонтане апоптозе након чега апоптотска тела бивају фагоцитована од стране макрофага јетре или слезине (Furze и Rankin 2008).

1.4.1. Адхезија неутрофилних гранулоцита за ендотелне ћелије крвних судова у инфламацији

Екстраваскуларна миграција неутрофилних гранулоцита започиње процесом адхезије за ендотелне ћелије (енгл. *endothelial cells*, EC) посткапиларних венула коју карактеришу фазе слабе адхезије, стабилне адхезије и фаза парацелуларне или трансцелуларне миграције у ткиво (Ley и *cap.* 2007). На самом почетку, локално продуковани проинфламацијски цитокини (LPS, TNF- α и IL-1 β) и вазоактивни амини (хистамин), доводе до трансформације нормалног венуларног ендотела у проадхезивни (енгл. *high endothelial venules*, HEV) што је праћено повећањем експресије интерћелијских адхезионих молекула (енгл. *intercellular cell adhesion molecule*, ICAM) на EC (Zarbock и Ley 2008). Наиме, стимулацијом ендотела са TNF- α и IL-1 β долази до транслокације P селектина (CD62P) из цитоплазме и повећања експресија E селектина (CD62E) на луминалној површини ендотелних ћелија (Golias и *cap.* 2007). За ове молекуле (CD62P и CD62E) везује се глукокоњугат фруктозе (*sialil-LewisX*, sLeX, CD15) експримиран на површини неутрофилних гранулоцита. Осим тога, L селектин (CD62L), експримиран на неутрофилним гранулоцитима, се везује за олигосахариде на EC, што је све скупа означено као фаза нестабилне адхезије (Ley и *cap.* 2007). Затим следи фаза стабилне адхезије, коју карактерише интеракција CD11b-CD18 молекулског комплекса испољеног на неутрофилним гранулоцитима и ICAM-1 молекула на ендотелним ћелијама (Nourshargh и Alon 2014). У интеракцији неутрофилних гранулоцита и EC, преко директних међућелијских контаката, долази до активације различитих сигналних путева који су узрок конформационим променама интегринских молекула на неутрофилним гранулоцитима (Zarbock и Ley 2008). На

крају следи фаза проласка кроз зид крвног суда односно парацелуларна или трансцелуларна миграција у ткиво (Ley *u cap.* 2007).

1.4.2. Миграција неутрофилних гранулоцита у ткиво

У даљем процесу миграције неутрофилних гранулоцита у ткиво учествује низ фактора који доводе до њихове активације међу којима важну улогу имају фактор активације тромбоцита (енгл. *platelet-activating factor*, PAF) и IL-8. Тако активирани неутрофилни гранулоцити преко директних контаката утичу на ЕС што резултира променом афинитета адхезије за ICAM-1 и доводи до повећаног инфлукса јона Ca^{2+} и активације субјединице p38 митогеном-активирани протеинске киназе (енгл. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) а што је праћено активацијом миозинских филамената у ЕС. Њиховом контракцијом долази до пуцања међућелијских веза посредованих VE кадхеринима и PECAM-1. Следи реаранжирање цитоскелета неутрофилних гранулоцита и њихова парацелуларна миграција у ткиво (Ley *u cap.* 2007). Трансцелуларна миграција се дешава у деловима где дијаметар ЕС то дозвољава. Наиме лигација ICAM-1 доводи до транслокације калвеола богатих актином у предео контакта. У том процесу долази до формирања везикуло-вакуоларних органа које фузијом формирају трансцелуларни канал (Ley *u cap.* 2007). Даље се процес кретања неутрофилних гранулоцита одвија на исти начин као код парацелуларне миграције. Тако доспели у ткиво, неутрофилни гранулоцити помоћу мембранских серин протеаза (катепсин G, еластаза и протеиназа 3) у процесу кретања врше разградњу ЕСМ (Owen *u cap.* 1995). Обзиром да је локализација протеиназа мембранска, онемогућена је њихова деактивација протеазним инхибиторима као што су урокиназа и плазмин продукованих локално од стране ткивних фибробласта и МØ. Када неутрофилни гранулоцити једном доспу у ткиво њихова даља миграција се одвија посредством цитокина (IL-8) и хемоатрактаната (C5a компонента комплемента), PAF, леукотријена B4 (енгл. *leukotriene B4*, LTB4) и ептелног протеина активације неутрофила 78 (енгл. *epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*, ENA-78) (Baggiolini *u cap.* 1989). Тако активирани неутрофили додатно продукују IL-8, PAF и LTB4 што даље, по принципу позитивне повратне спреге, доноси приливу нових неутрофила (Bazzoni *u cap.* 1991, Cassatella *u cap.* 1992).

1.4.3. Фенотипске промене неутрофилних гранулоцита у инфламацији

У процесу трансендотелне миграције, неутрофилни гранулоцити бивају изложени утицају различитих фактора као што су LPS, IL-1 β , TNF- α , IL-8, PAF, пептидогликани, мурамил пептиди, липотеихоична киселина и различити глукани који доводе до промене експресије појединих маркера на њиховој површини. Тако на пример у циркулацији неутрофилни гранулоцити имају исказане рецепторе за TNF- α и IL-1 и поједине хемотаксине, док у ткиву захваћеном инфламацијом под утицајем LPS-а, који се везује за LPS везујући протеин (енгл. *LPS binding protein*, LBP) на њиховој мембрани, долази до повећања експресије CD11b-CD18 комплекса (Wright *u cap.* 1990). Осим тога, IFN- γ повећава експресију Fc γ (Fc γ RI, CD64) на неутрофилним гранулоцитима, рецептора за који се везује Fc фрагмент IgG. Поред повећане експресије CD18 (Fc γ RII) за који се веже IgG1, повећава се и експресија CD16 (Fc γ RIII) рецептора за IgG3, антитела укључених у процесе опсонизације и фагоцитозе. IFN- γ , такође, заједно са фактором раста гранулоцитних и макрофагних колонија (енгл. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), доводи и до повећања експресије HLA-DR молекула на површини неутрофила (Gosselin *u cap.* 1993, Reali *u cap.* 1996). Ове фенотипске промене неутрофилних гранулоцита су увод у њихову функционалну припрему и активацију у циљу што ефикасније елиминације патогена.

1.4.4. Функционалне промене неутрофилних гранулоцита у инфламацији

Главна улога неутрофилних гранулоцита се огледа у процесима фагоцитозе бактерија и продукције ROS и ензима. У том контексту, након њихове активације у инфламацији настају функционалне промене које између осталог карактерише повећавна продукција супероксидних јона (O²⁻) у цитоплазми, што је у литератури познато као оксидативни прасак. Супероксидни анјон реагује са азот моноксидом (NO), продукованим од стране ЕС, М \emptyset и фибробласта и гради пероксинитрит, антимикробни агенс (Segal 2005). Осим тога, неутрофилни гранулоцити продукују мијелопероксидазу (MPO) која утиче на синтезу бромоводоничне (HoBr), јодоводоничне (HOI) и хипохлорасте киселине (HOCl). Ове киселине делују на неутрофилну прометалопротеиназу и преводи је у активну ензимску форму и

хлорамина који имају антимиembroно дејство (Nathan 2006). Активирани неутрофилни гранулоцити такође повећано продукују различите протеазе (неутрофилна еластаза, катепсин G, протеаза 3 и MMP) које имају микробицидно дејство али такође доводе и до нарушавања ткивне структуре разградњом ЕСМ (Nathan 2006). Шта више, активирани неутрофилни гранулоцити повећано продукују проинфламацијске цитокине (IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12 и IFN- γ) затим MIP-1 α и MIP-1 β , и тако додатно стимулишу Th1 имунски одговор и повећавају миграцију нових неутрофилних гранулоцита и моноцита (Scapini *u cap.* 2000). Након фагоцитозе бактерија и њихове дигестије у специфичним фаголизозомима неутрофилни гранулоцити улазе у апоптозу, процес програмиране ћелијске смрти, који у основи представља заштиту околног ткива од интензивне дегранулације гранула неутрофила и аутолизе ткива (Fox *u cap.* 2010).

1.4.5. Екстраћелијске замке неутрофила

Неутрофилни гранулоцити, осим што продукују ROS и цитокине, фагоцитишу и убијају бактерије, такође могу ослобађати екстраћелијске замке састављене од DNK, хистона и антимиembroних пептида познатије као NET (енгл. *neutrophil extracellular traps*) (Vorregaard 2010). Процес формирања NET-а назива се NET-оза и зависи од активности ROS ослобођених посредством никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидазе (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH). Даље, неутрофилна еластаза (NE) из азурофилних гранула прелази у једро и заједно са MPO поспешује декондензацију хроматина (Papaannopoulos *u cap.* 2010). За разлику од апоптозе, коју карактерише фрагментација DNK и једра без руптуре плазма мембране, NET-оза је праћена руптуром мембране и ослобађањем DNK у виду мреже (Amulic и Hayes 2011). NET-оза и улога NET-а у имунским одговорима се интензивно испитује и у литератури је показано да различити фактори могу да модулирају NET-озу. Тако на пример од фактора који фаворизују NET-озу треба напоменути пептидил-аргинин диаминазу 4 (енгл. *peptidyl arginine deiminase, type IV*, PADI4) (Li *u cap.* 2010b) и кристале холестерола (Warnatsch *u cap.* 2015). Осим тога, у неким истраживањима NET-оза се посматра и као форма урођеног имунског одговора (Brinkmann *u cap.* 2004, Marin-Esteban *u cap.* 2012). У том контексту, показано је да је основна улога NET-а у хватању микроорганизама (G⁺ и G⁻ бактерија), при чему их ова специфична биолошка

мрежа чини доступнијим ефекторским молекулима неутрофилних гранулоцита. Важно је истаћи да NET такође садржи поједине обрасце за препознавање патогена (енгл. *patogen recognition molecules*, PRM) (Mantovani *u cap.* 2011). Поред тога што има антибактеријски ефекат, NET убија хифе гљиве *Candida albicans*, која с друге стране може да поспешу процес NET-озе (Urban *u cap.* 2006). Након анализе три различита соја *C. albicans* на *in vivo* моделу, показано је да међу 24 протеина који улазе у састав NET-а, хетеродимер калпротектина има најважнији ефекат у ерадикацији *C. albicans* (Urban *u cap.* 2009). NET такође доводи до инхибиције матурације DC индуковане LPS-ом, смањујући експресију HLA-DR, CD80, CD83 и CD86 молекула и смањујући продукцију TNF-а, IL-6, IL-12 и IL-23, али без битнијег утицаја на експресију толерогених гена DC. Такође, NET смањује капацитет DC да индукују пролиферацију Т лимфоцита и фаворизује Th2 имунски одговор, док истовремено супримира Th1 и Th17 имунски одговор (Barrientos *u cap.* 2014).

1.5. Макрофаги

Као што је већ истакнуто M ϕ су ћелије урођене имуности које и настају из моноцита, а моноцити из заједничке мијелоидне прекурсорне ћелије за гранулоците и моноците. Развој M ϕ протиче кроз диференцијацију монобласта, промоноцита и моноцита који преласком из крви у ткиво стичу карактеристике ткивно специфичних M ϕ . У овим процесима важну улогу имају фактори раста као што су GM-SCF и M-CSF (Hume 2008).

1.5.1. Субпопулације моноцита

Моноцити периферне крви су подељени у три субпопулације на основу експресије CD14 и CD16 (Fc γ RIII) површинских молекула на класичне (CD14⁺⁺CD16⁻), интермедијерне (CD14⁺⁺/CD16⁺) и не-класичне (CD14⁺/CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock *u cap.* 2010, Yang *u cap.* 2014). Показано је да CD14⁺⁺/CD16⁺ моноцити имају високу експресију MHC-II и CD32 (Fc γ RII) и CX3CR1, затим да имају смањену способност фагоцитозе и продукције ROS, као и ниску експресију CCR2 (Geissmann *u cap.* 2003, Gordon и Taylor 2005). Такође ове субпопулације се разликују и по експресији рецептора за CC хемокине, при чему интермедијерни моноцити експримирају CCR2, рецептор за MIP-1 α , док селективно експримирају

CCR5, рецептор за CCL5 (енгл. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES). За разлику од интермедијерних моноцита, класични моноцити имају високу експресију CCR2, а не-класични моноцити имају високу експресију CXCR1 (Ancuta *u cap.* 2003, Gordon и Taylor 2005). Разлика између субпопулација моноцита је заправо у потенцијалу за њихову диференцијацију у MØ и/или DC. Наиме, показано је да се моноцити стимулирани са GM-CSF и IL-4 диференцирају у DC (Sallusto и Lanzavecchia 1994, Sanchez-Torres *u cap.* 2001), с тим да интермедијерни имају већи потенцијал за диференцијацију у DC у односу на класичне моноците (Randolph *u cap.* 1998, Randolph *u cap.* 2002). Шта више, у односу на експресију CD64 (FcγRI) показано је да CD14⁺⁺CD16⁺CD64⁺ моноцити имају сличне карактеристике као и класични CD14⁺⁺CD16⁻ моноцити. Ове ћелије имају и висок ниво експресије CD86 и HLA-DR а повећано продукују TNF-α и IL-6, што није карактеристично за CD14⁺⁺CD16⁺CD64⁻ моноците (Grage-Griebenow *u cap.* 2001).

1.5.2. Прелазак у ткиво и функционалне карактеристике моноцита

Главни механизам прелака моноцита у ткиво заснива се на интеракцији CCR2 исказаних на њиховој површини и концентрације MCP-1 (CCL2) хемокина (Muller 2001). Као што је напоменуто, класични моноцити (CD14⁺⁺CD16⁻) имају висок ниво експресије CCR2 и CD62L (L селектин) и ниску CX3CR1 експресију. Њихова основна улога је фагоцитоза, при чему имају високу пероксидазну активност и високу продукцију IL-10 а ниску продукцију TNF-α у одговору на стимулацију са LPS-ом (Geissmann *u cap.* 2003, Cros *u cap.* 2010). Интермедијерни моноцити имају ниску пероксидазну активност али висок капацитет за продукцију IL-1β и TNF-α у одговору на LPS (Cros *u cap.* 2010). Током инфламације класични и интермедијерни моноцити прелазе у ткиво посредством интеракције CCR2/CCL2. Тачније, MCP-1 се везује за CD62L (L селектин), што је почетак фазе котрљања моноцита дуж активираних ендотелних ћелија венула (Palframan *u cap.* 2001). Паралелно са MCP-1/CD62L лигацијом долази до интеракције CCR5 на моноцитима са CCL5 на HEV, као и VLA1 (енгл. *very late activation antigen-1*) на моноцитима и VCAM-1 (енгл. *vascular cell adhesion molecule 1*) на HEV (Yang *u cap.* 2014). С друге стране, не-класични CD14⁺/CD16⁺⁺ моноцити прелазе у ткиво

посредством интеракције CX3CR1 са CCL3 и CXCL9 ослобођених под дејством IFN- γ (Janatpour *u cap.* 2001).

1.5.3. Диференцијација моноцита и M1/M2 поларизација

Класични CD14⁺⁺CD16⁻ моноцити настају у костној сржи из заједничког прекурсора за DC (енгл. *macrophage-dendritic cell progenitors*, MDP), затим прелазе у циркулацију и диференцирају се у интермедијерне и не-класичне моноците (Zawada *u cap.* 2012). Једном доспели у ткиво, моноцити се диференцирају у M \emptyset при чему у зависности од стимулуса могу попримити M1 или M2 фенотип (Martinez и Gordon 2014). Проинфламацијски M1 M \emptyset настају након активације са IFN- γ , LPS или GM-CSF, док имунорегулацијски M2 M \emptyset настају након стимулације са IL-4, IL-10 и M-CSF (Mantovani *u cap.* 2004). За M1 поларизацију је карактеристично да се у току стимулације са IFN- γ и LPS повећава експресије појединих рецептора за цитокине (CSF2RB, IL-15, IL-2RA и IL-6R), адхезионих молекула (ICAM-1, интегрин (ITG)- α L, ITG- α 4, ITG- β 7) и што је најважније продукција проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6 и IFN- β) (Hu и Ivashkiv 2009). GM-CSF, слично LPS-у, у процесу M1 поларизације поспешује презентацију антигена, фагоцитозу посредовану антителима и микробицидну активност M \emptyset и повећава продукцију проинфламацијских цитокина IL-6, IL-8, GM-CSF, M-CSF, TNF- α и IL-1 β . Осим тога, GM-CSF регулише експресију појединих површинских маркера (CD14 и CD163) на M1 M \emptyset (Krausgruber *u cap.* 2011). С друге стране, M2 поларизацију карактерише неколико подтипова (M2a-c). Тако стимулацијом са IL-4 и IL-13 долази до M2a поларизације и фузије макрофага, при чему се смањује њихова фагоцитоза (Scotton *u cap.* 2005, Martinez *u cap.* 2013). M2a активирани M \emptyset одликује висока експресија CXCR1, MHC-II и CD206, висока IL-10 и ниска продукција IL-12. Што се тиче M2b макрофага, они настају након активације са LPS и IFN- γ . Тако активирани M2b, за разлику од од M1, имају смањену IL-12, а повећану IL-10 продукцију (Anderson и Mosser 2002, Edwards *u cap.* 2006). Осим тога, M2b макрофаги имају повећану експресију MHC-II и CD86 молекула, али за разлику од M2a не експримирају CD206. M2b такође продукују IL-10, али и IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Трећи подтип M2c макрофага настаје након поларизације са глукокортикоидима у комбинацији са IL-10. Наиме, након стимулације са глукокортикоидима долази до повећане продукције IL-10 који

припада фамилији Tregs цитокина и јак је инхибитор Th1 имунског одговора (Ehrchen *u cap.* 2007). Такве макрофаге имају високо експримиран CCR2 рецептор и CD14, средњи ниво експресије CD206, док је експресија МНС-II молекула ниска. Заједничка карактеристика M2c и M2b је да имају високу IL-10, а ниску IL-12 продукцију.

1.6. Мезенхимске матичне ћелије

Мезенхимске матичне ћелије (MSC) су плурипотентне ћелије способне да се обнављају и диференцирају у друге типове ћелија мезенхимског и немезенхимског порекла. До сада су адултне MSC изоловане из различитих ткива као што су костна срж (енгл. *bone marrow-derived*, BM-MSC) (Pontikoglou *u cap.* 2011), адипозно ткиво (енгл. *adipose tissue-derived*, AT-MSC) (Bunnell *u cap.* 2008), синовијална мембрана зглоба (енгл. *synovium-derived*, S-MSC) (Harvanova *u cap.* 2011), мозак (енгл. *brain-derived neural stem cells*, NSC) (Lojewski *u cap.* 2015), јетра (енгл. *liver-derived*, L-MSC) (Wang *u cap.* 2016), панкреас (енгл. *pancreatic-derived*, p-MSC) (Seeberger *u cap.* 2006), кожа (енгл. *dermal-derived*, d-MSC) (Orciani и Di Primio 2013), фоликул длаке (енгл. *hair-derived*, h-MSC) (Morris *u cap.* 2004), плацента (енгл. *placenta-derived*, pc-MSC) (Zhu *u cap.* 2014b), крв пупчане врпце (енгл. *umbilical cord blood stem cells*, UCB-MSC) (Lee *u cap.* 2004). Недавно су MSC изоловане из PL (енгл. *periapical lesion stem cells*, PL-MSC) (Liao *u cap.* 2011) и од тада се интензивно испитују њихова имуномодулациска својства (Ђокић *u cap.* 2012, Ђокић *u cap.* 2013).

Постоји прописан минимум критеријума које је потребно да испуњава изолована ћелијска популација како би се могла сврстати у групу MSC линија (Dominici *u cap.* 2006). Према основним критеријумима за карактеризацију MSC неопходно је између осталог да поседују способност адхезије, да ниво експресије површинских молекула CD105, CD73 и CD90 буде преко 95%, затим да не експримирају CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR или да експресија ових молекула није већа од 2%, као и да се под одређеним *in vitro* условима могу диференцирати у остеобласте, адипоците и хондробласте. Од осталих маркера заједничких за већину успостављених MSC линија треба напоменути CD13, CD29, CD44 и CD10 (Lv *u cap.* 2014).

На бази критеријума експресије специфичних ћелијских маркера, показано је да су MSC у ткиву првенствено локализоване периваскуларно тј. у близини зидова крвних судова (Crisan *u cap.* 2008). Претпоставља се да су различити типови перицита могући прекурсори MSC (Vezzani *u cap.* 2016). Обзиром на периваскуларну локализацију, постоји велика вероватноћа да MSC често ступају у контакт са бројним имунским ћелијама. С тим у вези, актуелна су испитивања везана за интеракцију различитих MSC и ћелија урођене имуности као што су неутрофилни гранулоцити, МØ, DC, урођеноубилачке ћелије (енгл. *natural killer cells*, NK) и мастоцити (Le Blanc и Davies 2015), као и са ћелијама стечене имуности као што су Т и В лимфоцити (Aggarwal и Pittenger 2005, Corcione *u cap.* 2006). У том контексту показано је да MSC имају централну улогу у инфламацији (Singer и Caplan 2011) и да у зависности од типа и концентрације стимулуса модулирају имунске механизме (Gazdić *u cap.* 2015). На основу испитиваних функционалних карактеристика MSC из различитих ткива и органа, све је више публикација којима се указује на корисност коју MSC могу имати у регенеративној медицини и ћелијској терапији (Caplan 2007, Kadar *u cap.* 2009, Marchionni *u cap.* 2009, Wei *u cap.* 2013, Feng *u cap.* 2014a, Lui 2015).

1.7. Мезенхимске матичне ћелије зуба

Мезенхимске матичне ћелије зуба (D-MSC) подељене су према локализацији на матичне ћелије: зубне пулпе (енгл. *dental pulp stem cells*, DPSC) (Gronthos *u cap.* 2000), екстрахираних млечних зуба (енгл. *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*, SHED) (Miura *u cap.* 2003), периодонталног лигамента (енгл. *periodontal ligament stem cells*, PDLSC) (Seo *u cap.* 2004), зубног фоликула (енгл. *dental follicle stem cells*, DFSC) (Morsczeck *u cap.* 2005) и апикалне папиле зуба (енгл. *stem cells from apical papilla*, SCAP) (Sopoyama *u cap.* 2008). За све типове D-MSC показано је да испуњавају поменуте минималне критеријуме за дефинисање матичности (Dominici *u cap.* 2006). Интересантно је напоменути да је за све D-MSC заједничка експресија CD90, CD105, CD73, CD44 и CD13, док се експресија појединих маркера разликује међу субпопулацијама. Тако на пример CD146 експримирају све D-MSC осим DFSC и PDLSC. Једино ове две субпопулације експримирају CD10 и CD59, док DFSC, за разлику до PDLSC, испољавају и CD53. Осим тога, једино је за SCAP показано да експримирају CD106 и CD24, док је експресија CD166 присутна

само код SHED (Rodriguez-Lozano *u cap.* 2011). За све изоловане D-MSC линије, осим за PDLSC, је између осталог карактеристично да експримирају неурогени маркер *Nestin*. Осим тога, DPSC и PDLSC испољавају *Scleraxis*, специфични транскрипциони фактор тетива, док је октамер-везујући транскрипциони фактор (Oct-4), од свих испитиваних маркера ембрионалних матичних ћелија (енгл. *embryonic stem cells*, ESC), испољен у највећем проценту на популацији DPSC (AlAmer *u cap.* 2016).

1.7.1. Изолација и основне карактеристике D-MSC

Мезенхимске матичне ћелије зуба се могу изоловати на два начина: методом ензимске дигестије ткива или методом експлантације (Karamzadeh *u cap.* 2012). D-MSC имају сличне морфолошке и фенотипске карактеристике са MSC линијама успостављеним из других ткива као што су UCB-MSC, BM-MSC и AT-MSC. Тако, D-MSC поседују морфологију сличну морфологији фибробласта и карактерише их висока стопа пролиферације, способност самообнављања и формирања колонија, карактеристике које се не мењају без обзира на примењену методу изолације (Gronthos *u cap.* 2011, Hilkens *u cap.* 2013). Имајући у виду релативно једноставану процедуру за изолацију D-MSC, као и чињеницу да се могу узгајати *in vitro* у медијуму погодном за MSC, испитивано је да ли промена неких од параметара може имати утицаја на њихов раст. Показано је да D-MSC имају већи степен пролиферације када се гаје у медијуму суплементованим са 1,25% хуманим (АВ) серумом у односу на стандардно коришћени 10% FBS (енгл. *fetal bovin serum*) (Ferro *u cap.* 2012). Наравно, стопа пролиферације није иста код свих типова D-MSC. Од свих субпопулација, највећа стопа пролиферације је показана у култури SHED, што се објашњава високом активношћу гена за факторе раста, као што су фибробластни фактор раста (енгл. *fibroblast growth factor*, FGF) и TGF- β (Wang *u cap.* 2012, Vishwanath *u cap.* 2013). Осим тога, на пролиферацију и миграцију D-MSC утичу различити други фактори као на пример Notch- $\delta 1$ лиганд (He *u cap.* 2009), соматомедин С (енгл. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) (Feng *u cap.* 2014b), епидермални фактор раста (енгл. *epidermal growth factor*, EGF) и FGF-2 (Lee *u cap.* 2015). Од осталих култивационих фактора, осим хуманог АВ серума, показано је да и сатурација кисеоником има утицај на пролиферацију D-MSC. Култивисане у условима сатурације са 21% O₂ D-MSC пролиферишу спорије у односу примену

3% до 6% O₂, што је најприближније физиолошким условима (El Alami *u cap.* 2014). Осим тога, интензитет пролиферације *in vitro* зависи и од пре-активације MSC *in vivo*. Наиме, D-MSC изоловане из пулпе зуба са иреверзибилним пулпитисом у односу на MSC из здравих ткива, имају нижи степен пролиферације и смањену способност формирања колонија, али зато задржавају експресију појединих маркера као што је STRO-1 (Wang *u cap.* 2010). У појединим студијама је показано да D-MSC након стимулације са LPS-ом или екстратом бактерије *Streptococcus mutans*, повећавају експресију TLR4, и да без обзира на спорију пролиферацију, долази до повећања њихове миграције (Liu *u cap.* 2014). С друге стране, стопа пролиферације D-MSC је већа након стимулације са TGF- β 1 и засађивања на тродимензионалне матрице (енгл. *scaffold*, 3D култура) (Farea *u cap.* 2014). Генерално, пролиферација већине D-MSC *in vitro* је најинтензивнија између друге и четврте пасаже, док се након девете пасаже нагло смањује, што је праћено повећањем броја хромозомских аберација и удела тетраплоидних ћелија (Suchanek *u cap.* 2013).

1.7.2. Експресија површинских маркера D-MSC

Поред тога што су морфолошки веома сличне са MSC из других ткива и органа, D-MSC имају заједничку експресију за око 4000 гена са BM-MSC, AT-MSC и UCB-MSC, што указује на то да ове ћелије имају и сличне фенотипске карактеристике (Shi *u cap.* 2001, Ponnaiyan и Jegadeesan 2014, Stanko *u cap.* 2014). У литератури је показано да D-MSC поред основних маркера CD73, CD90, CD105 експримирају и CD29, CD44, CD166, CD146 и STRO-1, док су потпуно негативне на CD14, CD34 и CD45 (Huang *u cap.* 2009, Agha-Hosseini *u cap.* 2010, Navabazam *u cap.* 2013, Vishwanath *u cap.* 2013). Осим поменутих маркера, показано је да D-MSC исказују маркере карактеристичне за ћелије крвних судова као што су маркер глатких мишићних ћелија (енгл. *alpha-smooth muscle actin*, α SMA), CD146 и перицитни антиген 3G5, али да за разлику од ЕС не експримирају *von Willebrand-ов* фактор (vWF) (Shi и Gronthos 2003). За неке молекуле D-MSC, као што је Oct-4, је показано да се њихова експресија повећава током пасажирања (Marchionni *u cap.* 2009), док се експресија других маркера (STRO-1) смањује у току пасажирања а експресија CD73, CD90, CD105 и CD166 остаје непромењена (Gao *u cap.* 2015). Од осталих маркера својствених за ESC, D-MSC експримирају SSEA-4 (Kawanabe *u*

cap. 2012). Поред експресије SSEA-4 и Oct-4, за DPSC је показано да имају повећану активност транскрипционих фактора као што су Nanog, Sox2, Lin28, c-Myc и маркер неуроектодермалних матичних ћелија Nestin, који је заправо протеин типа VI интермедијерног филамента, што је типично за ESC (Atari *u cap.* 2011). Осим тога, заједничка карактеристика DPSC и PDLSC је да експримирају ембрионске маркере Oct-4, Nanog и мезодермални маркер Vimentin, с тим да PDLSC имају слабији интензитет експресије за Nanog. Шта више, DPSC имају виши ниво експресије SSEA4, CD13 и CD166 маркера у односу на PDLSC, док је експресија CD9 маркера већа на PDLSC у односу на DPSC (Ponnaiyan *u cap.* 2012). Недавно је идентификован нови површински маркер, CD71, на мембрани хуманих D-MSC, који је по функцији рецептор за трансферин (TfR) и који је предложен као нови MSC маркер (Park *u cap.* 2013).

Мезенхимске матичне ћелије зубне пулпе у инфламацији и након криопрезервације задржавају све основне карактеристике као и MSC из здравих ткива у култури (Chen *u cap.* 2011). Међутим, свакако да постоје фенотипске разлике између ова два типа MSC. Наиме, показано је да се након стимулације са TNF- α значајно повећава експресија неких маркера као што су CD146, STRO-1, SSEA-4, Nanog и Oct-4 на DPSC (Ueda *u cap.* 2014). Поједини аутори указују да у условима запаљења DPSC имају значајну улогу у локалним регенеративним процесима. Тако је на моделу запаљења пулпе показано да се повећава пролиферација DPSC (повећана експресија Ki67 фактора) и експресија CD133 и N-CAM маркера (енгл. *neural-cell adhesion molecule*, CD56) (Ustiazhvili *u cap.* 2014). LPS, осим што лигацијом преко TLR4 утиче на повећану продукцију IL-8 од стране DPSC, такође доводи и до значајног повећања експресије TLR4 на њиховој мембрани (He *u cap.* 2013). Експресија маркера на D-MSC успостављених из инфламраних ткива је између осталог одређена и интеракцијом са различитим инфилтришућим ћелијама, што се може испитивати на различитим моделима *in vitro*. Тако је показано да DPSC у интеракцији са фитохемаглутинином (PHA) активираним CD3 Т лимфоцитима у култури повећавају експресију хуманог леукоцитног антигена (HLA)-G, фактора раста хепатоцита (HGF)- β 1, IL-6, IL-10, ICAM-1, VCAM-1 и васкуларног ендотелијалног фактора раста (VEGF) (Demircan *u cap.* 2011). На основу изнетих података се може закључити да D-MSC из ткива у инфламацији поседују сличне карактеристике као и MSC из здравих ткива зуба али

да се у погледу експресије појединих маркера значајно разликују. То може бити последица њихове активације под утицајем бројних инфламацијских агенаса као и директне интеракције са различитим инфилтришућим ћелијама.

1.7.3. Диференцијација у ћелије мезенхимског порекла

Према минимуму прописаних критеријума које треба да испуњава ћелијска линија да би се могла прогласити за MSC линију, неопходно је између осталог да поседују способност диференцијације у најмање три линије ћелија мезенхимског порекла *in vitro* (остеобласте, хондроците и адипоците) (Dominici *u cap.* 2006). Показано је да све субпопулације D-MSC могу диференцирати у сва три типа ових ћелија, независно од примењене методе за изолацију (Miura *u cap.* 2003, Gay *u cap.* 2007, Huang *u cap.* 2009, Karamzadeh *u cap.* 2012, Hilkens *u cap.* 2013). Наиме, када се гаје у медијуму за остеогену диференцијацију D-MSC експримирају маркере карактеристичне за остеогенезу (колаген тип I; коштани сијалопротеин, ВРМ; остеокалцин, OCN), у медијуму за хондрогену диференцијацију оне продукују колаген и уочавају се 3D сфере колагеног ткива што се може детектовати хистохемијском методом (Alcian blue), а у медијуму за адипогену диференцијацију се уочавају интрацелуларне Oil red O⁺ грануле и повећана синтеза липопротеинске липазе.

1.7.3.1. Osteo/одонтогена диференцијација

Као што је напоменуто сви типови D-MSC се под одређеним условима диференцирају у остеобласте. Међутим, постоје разлике у афинитету појединих субпопулација за остео/одонтогену диференцијацију (Vezzani *u cap.* 2016). Сумирајући истраживања аутора Gronthos *u cap.* (2000) и Huang *u cap.* (2009) указано је да све субпопулације, осим DFSC, у току процеса остеогенезе продукују алкалну фосфатазу (енгл. *alkaline phosphatase*, ALP) и фосфорилисани гликопротеин ECM (енгл. *matrix extracellular phosphoglycoprotein*, MEPE), затим да све, осим SHED, експримирају сијалопротеин кости (енгл. *bone sialoproteine*, BSP), док је експресија дентинског сијалопротеина и Cbfa1/Runx2 карактеристична за DPSC, SHED и SCAP. Осим тога, експресија остеокалцина (енгл. *osteocalcin*, OCT) карактеристична је за SHED, PDLSC и DFSC, а OSX (енгл. *osterix*) од стране SHED и DFSC, док је остеонектин (енгл. *osteonectin*, OCN) експримиран једино у култури

DPSC. Такође је показано да различити фактори попут физичких услова (температура), затим фактори раста (EGF-2, IGF-1 и TGF- β 1) и витамин D3 могу утицати на процес остеогенезе (Vezzani *u cap.* 2016).

Одонтогену диференцијацију D-MSC карактерише експресија дентин специфичних протеина: сијалопротеина дентина (енгл. *dental sialoprotein*, DSP) и денталног сијалофосфопротеина (енгл. *dental sialophosphoprotein*, DSPP), као и повећана депозиција минерала и формирање минералних нодуса налик дентину, окружених одонтобластима (Вакоролу *u cap.* 2011). Интересантно је напоменути да активност Ca-Mg (TRPM7) јонског канала битно утиче на процес остео/одонтогене диференцијације DPSC (Cui *u cap.* 2014). Наиме, shRNK за TRPM7 супримира синтезу ALP, BSP, Runx, OSX и DSPP у култури DPSC.

Осим способности да се диференцирају остео/одонтогене ћелијске линије *in vitro*, у литератури је показано да D-MSC (субтип SHED), на моделу остеогене дистракције мандибуле зеца, доводе до комплетне регенерације кости *in vivo* (Alkaisi *u cap.* 2013), што их чини погодним за ћелијску терапију.

Поред диференцијације у функционалне одонтобласте, D-MSC се такође могу диференцирати и у цементобласте у условима хипоксије. Наиме, показано је да хипоксија утиче на повећање продукције цементног протеина (CEMP1) преко хипоксија индуцибилног фактора (HIF-1) на D-MSC (Choi *u cap.* 2014).

1.7.3.2. Хондрогена диференцијација

Као што је напоменуто хондрогену диференцијацију карактерише способност синтезе колагена на првом месту колагена типа I (COL1), колагена типа III (COLIII) и Scleraxis. Од свих субпопулација, DPSC експримирају сва три типа колагена, док и DFSC у процесу хондрогенезе експримирају COL1, а PDLSC експримирају Scleraxis (Huang *u cap.* 2009, Vezzani *u cap.* 2016).

1.7.3.3. Адипогена диференцијација

Адипогену диференцијацију карактерише накупљање интрацитоплазматских Oil red O+ липидних капљица, што заправо корелира са повећаном експресијом PPAR- γ (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) и липопротеинске липазе, а представља почетак адипогенезе. За све подтипове D-MSC је показано да поседују способност адипогене диференцијације, али да је она у односу на

остеогену и адипогену диференцијацију, најслабије изражена (Ђокић *u cap.* 2012). Тако се приближно 5% SHED након 5-недељне индукције у адипогеном медијуму диференцира у адипоците (Miura *u cap.* 2003).

1.7.4. Диференцијација у ћелије не-мезенхимског порекла

Поред способности да се диференцирају у ћелије мезенхимског порекла као што су остеобласти, одонтобласти, хондроцити, адипоцити и ћелије екто-мезенхимског порекла (одонтобласти), D-MSC се могу под одређеним условима такође диференцирати ћелије не-мезенхимског порекла као што су нервне ћелије (Gervois *u cap.* 2015). У литератури је показано да у процесу неурогене диференцијације D-MSC испољавају маркере ране и касне фазе неурогенезе као што су нестин, $\beta 3$ тубулин, S100 протеин, синаптофизин и протеин микротубула 2 (енгл. *microtubule-associated protein 2*, MAP2) (Martens *u cap.* 2012, Isobe *u cap.* 2016). Осим диференцијације у нервне ћелије, D-MSC се такође могу диференцирати у мишићне ћелије (Zhang *u cap.* 2008), паренхимске ћелије јетре (Chen *u cap.* 2013), ћелије ендокриног и екзокриног панкреаса (Carnevale *u cap.* 2013, Ishkitiev *u cap.* 2013), из чега се може закључити да оне у будућности могу постати терапија избора у регенеративној медицини.

1.8. MSC1/MSC2 поларизација

Као што је напоменуто MSC из различитих ткива и органа првенствено су локализоване у близини крвних судова (Shi и Gronthos 2003), као и да су различите популације перицита њихови највероватнији прекурсори (Vezzani *u cap.* 2016). Сумирајући податке о интеракцији различитих MSC и инфилтришућих ћелија, показано је да MSC у инфламацијом измењеном ткиву могу да стимулишу Th1 и/или Th17 имунски одговор што их чини проинфламацијским (MSC1) ћелијама, док под одређеним околностима могу да инхибирају Th1/17 а стимулишу Th2 и Tregs имунске одговоре, што је одлика имунорегулацијских (MSC2) ћелија (Gazdić *u cap.* 2015).

На почетку инфламације TNF- α и IFN- γ , преко својих рецептора (TNFR и IFNR), као и LPS преко TLR4 исказаних на ћелијској мембрани MSC, доводе до повећања продукције IL-8 и фактора инхибиције миграције макрофага (енгл. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF) од стране MSC (Chang *u cap.* 2005,

Gazdić *u cap.* 2015), што утиче на прилив неутрофилних гранулоцита у инфламацијом захваћено ткиво (Brandau *u cap.* 2010). Шта више, Poly I:C преко TLR3 рецептора доводи до повећане продукције IL-6, IFN- β и GM-CSF продукованих од стране MSC што има за последицу смањење апоптозе неутрофила (Raffaghello *u cap.* 2008, Cassatella *u cap.* 2011). Осим тога, повећана је продукција MIP-1 α , MIP-1 β и RANTES од стране MSC (Bernardo и Fibbe 2013), што доводи до повећане миграције и активације Т ћелија и повећања продукције TNF- α и IFN- γ . Овако активирание MSC1 стимулишу Th1 имунски одговор. Осим тога, IFN- γ утиче на повећану продукцију CXCL6 и CXCL12 хемокина од стране MSC, који у повратној спези утичу на повећану миграције других MSC (Strojny *u cap.* 2015) Даљим повећањем титра TNF- α и IFN- γ долази до поларизације у MSC2 тип ћелија, које сада имају имунорегулацијско дејство у интеракцији са имунским ћелијама (Gazdić *u cap.* 2015). Наиме, MSC2 повећано продукују IL-6, IL-10, IDO-1 и PGE2, преко којих утичу на поларизацију M ϕ у правцу M2 (Nemeth *u cap.* 2009, Francois *u cap.* 2012) и повећавају удео толерогених DC (Ђокић *u cap.* 2012). У интеракцији са Т ћелијама MSC2 испољавају антипролиферативни ефекат у култури са CD3(+) Т лимфоцитима активираних са фитохемаглутинином (Ueda *u cap.* 2014). Том приликом, доводе до смањења продукције проинфламацијских цитокина (IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17A, TNF- α) а повећавају продукцију индуцибилног протеина 10 (IP-10; CXCL10) као и удео Treg (CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺) у популацији РНА активираних CD3+ Т лимфоцита (Demircan *u cap.* 2011).

Поједини материјали који се користе у ресторативној стоматологији могу имати утицај на поларизацију MSC. Тако 2-хидроксиетил метакрилат (HEMA) повећава продукцију IL-6 и IL-8 у култури MSC, што доводи до MSC1 поларизације (Trubiani *u cap.* 2012). С друге стране, у максилофацијалној и оралној хирургији је честа употреба 3D вештачки синтетисаних колагених матрица које поспешују миграцију ћелија и неоваскуларизацију коштаных дефеката (Asanbe *u cap.* 2014). Засађивање MSC на овакве тродимензионе колагене моделе мења профил цитокина појединих субпопулација D-MSC, као на пример SCAP које у том случају продукују 10 пута више TGF- β 3 у односу на продукцију у стандардним условима у 2D култури ћелија, а што све заједно указује на поларизацију у правцу MSC2 (Somoza *u cap.* 2015).

1.9. Криопрезервација MSC

Криопрезервација је метод за дуготрајно чување ћелија на веома ниским температурама у стерилним условима. На овај начин се праве резерве ћелија које се поново могу користити у експериментима. Најчешћи и уједно најефикаснији метод за криопрезервацију је смрзавање ћелија у 10% диметил-сулфоксиду (DMSO) раствору феталног телећег серума (енгл. *fetal calf serum*, FCS) у течном азоту LN₂ (енгл. *liquid nitrogen*, LN₂) на -196⁰С. Показано је да D-MSC након процеса криопрезервације задржавају све карактеристике матичних ћелија (пролиферација, клоногеност, експресије маркера, способност диференцијације) (Zhang *u cap.* 2006, Park *u cap.* 2014). Неки аутори истичу да осим чувања у течном азоту, смрзавање у 10%DMSO/FCS на -80⁰ С такође нема негативних последица по биолошке карактеристике MSC, што овај метод такође чини погодним за њихову криопрезервацију (Kumar *u cap.* 2015).

2. Хипотезе и циљеви истраживања

Као што је већ дефинисано, PL представљају хронично запаљење у пределу апекса корена зуба, које карактеришу процеси егзацербације (симптоматске) и регресије (асимптоматске) лезије (Marton и Kiss 2014). Састоје се од некротичног супстрата, бактерија и њихових продуката као и гранулационог ткива у коме су у стромалне компоненте инфилтрисане имунске ћелије (лимфоцити, плазма ћелије, гранулоцити, ћелије мононуклеарног фагоцитног система, мастоцити и друге ћелије) (Nair 1987, Lukić *u cap.* 1990, Liapatas *u cap.* 2003, Čolić *u cap.* 2009c, Park *u cap.* 2011). Симптоматске PL се карактеришу повећаном експресијом адхезионих молекула, повећаном продукцијом Th1 и Th17 цитокина као и цитокина који поспешују инфламацију и ресорпцију кости: IL-1, TNF- α , IL-6 и RANK/RANKL (Silva *u cap.* 2005, Gazivoda *u cap.* 2009, Marton и Kiss 2014). С друге стране, код асимптоматских PL преовладава Th2 имунски одговор и Tregs, које карактерише повећана продукција Th2 (IL-4, IL-5 и IL-13) и имунорегулацијских (IL-10 и TGF- β) цитокина. Ови цитокини ограничавају инфламацију и поспешују процесе зарастања и регресије PL (Fukada *u cap.* 2009, Marton и Kiss 2014). Поред тога, присуство IL-27 и IL-6, који имају особине про-инфламацијских али и анти-инфламацијских цитокина, доприноси сложености имунолошких механизма хроничних PL (Čolić *u cap.* 2009a).

Имајући у виду да приближно две трећине људи развије неки облик PL, то чини PL веома погодним ткивом за изолацију MSC, обзиром да се оно одстрањује рутинским терапијским процедурама (апикотомија или екстракција зуба). Међутим, да би ова биотехнологија била клинички релевантна, неопходно је детаљно истражити физиолошке и патофизиолошке карактеристике PL-MSC и њихову комуникацију са околним ћелијама у инфламацијском инфилтрату, посебно са ћелијама урођене имуности. О овим интеракцијама скоро да нема никаквих публикованих података у доступној литератури.

На основу досадашњих сазнања о карактеристикама и имунобиологији MSC изолованих из инфламраних ткива, као и публикованих података о интеракцијама између MSC из других ткива са ћелијама имунског система, постављене су следеће

ХИПОТЕЗЕ:

1. PL-MSС остварују двосмерне комуникације са фагоцитним ћелијама (гранулоцитима и макрофагима) путем директних контаката и солубилних медијатора.
2. PL-MSС испољавају анти-инфламацијска, анти-апоптотска и имунорегулацијска својства у интеракцији са инфламацијским ћелијама из периапексних лезија и фагоцитима у култури, која зависе од врсте ћелија и њиховог активационог статуса.
3. Фагоцити и њихови продукти модулирају фенотипска својства и продукцију цитокина од стране PL-MSС.

За проверу ових хипотеза постављени су следећи

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА:

- 1) Изоловати и испитати фенотипске карактеристике PL-MSС, њихову способност за самообнављање, динамику раста, способност формирања колонија и диференцијацију у друге типове ћелија мезенхимског порекла.
- 2) Одредити *in situ* локализацију PL-MSС и блиске контакте између PL-MSС и гранулоцита, односно PL-MSС и МØ.
- 3) Испитати утицај PL-MSС на продукцију про-инфламацијских и имунорегулацијских цитокина од стране укупних инфламацијских и моноклеарних ћелија из PL у култури и њихову повезаност са клиничким типом PL.
- 4) Одредити степен апоптозе и ниво продукције цитокина од стране гранулоцита у директном и индиректном контакту са PL-MSС.
- 5) Испитати утицај гранулоцита и NET-а на пролиферацију и продукцију цитокина од стране PL-MSС као и механизме укључене у ове интеракције.
- 6) Испитати ефекат проинфламацијских цитокина и агониста TLR на фенотипска својства и продукцију цитокина од стране PL-MSС.
- 7) Упоредити ефекат PL-MSС на фенотипска и функционална својства МØ добијених од моноцита различитим поступцима *in vitro*, и ефекат ових типова МØ на продукцију цитокина од стране PL-MSС у оквиру двосмерних комуникација.

3. Материјал и методе

3.1. Медијум, пуфери и агонисти

3.1.1. RPMI 1640 медијум

RPMI 1640 медијум (Sigma ALDRICH, Минхен, Немачка) са 1% гентамицином (Галеника, Београд, Србија) и 7.5% NaHCO₃ (Институт за фармацију ВМА, Београд, Србија) коме је додато 10% феталног телећег серума (енгл. *fetal calf serum*, FCS; PAA Laboratories, Келбе, Немачка), 50μМ 2-меркаптоетанола (2-ME, Sigma), 50 i.j./ml пеницилина и 50mg/ml стрептомицина (Галеника) коришћен је за култивацију РВМС и МØ и представља комплетан RPMI медијум.

За изолацију РВМС коришћен је RPMI 1640 медијум (Sigma) без додатка серума, а коме је у финалној концентрацији додат 1% гентамицин (Галеника), 7.5% NaHCO₃ и 0,02% Na-етилендиаминотетраацетат (NaEDTA) (Sigma) припремљен у Институту за фармацију ВМА.

3.1.2. α-MEM медијум

За култивацију, тестове пролиферације и формирања колонија PL-MSC коришћен је α-MEM медијум (Sigma) коме је додато 10% FCS, 50μМ 2-меркаптоетанола (2-ME) (Sigma), 50 i.j./ml пеницилина (Галеника) и 50mg/ml стрептомицина (Галеника).

3.1.3. Медијум за остеогену диференцијацију PL-MSC

За индукцију остеогене диференцијације PL-MSC коришћен је комерцијални медијум (Lonza, Атланта, САД).

3.1.4. Медијум за хондрогену диференцијацију PL-MSC

За индукцију хондрогене диференцијације PL-MSC коришћени су некомплетни медијум (Lonza) и комплетни медијум припремљен од некомплетног медијума и 10ng/ml TGF-β3 (R&D Systems, Минеаполис, САД).

3.1.5. Медијум за адипогену диференцијацију PL-MSC

За индукцију адипогене диференцијације коришћени су индукциони медијум (Lonza) и медијум за одржавање адипогенезе (Lonza) PL-MSC.

3.1.6. HBSS (енгл. Hank's Balanced Salt Solution) медијум

HBSS медијум је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,26mM CaCl₂ (Merck, Њујорк, САД), 5,37mM KCl (Serva, Хајделберг, Немачка), 0,81mM MgSO₄ x7H₂O (Merck), 140mM NaCl (Merck), 0,36mM KН₂PO₄ (Merck), 0,34mM Na₂HPO₄ (Merck), 4,17mM NaHCO₃ (Merck), 5,55mM D-глукоза (Merck) у дестилованој води. pH вредност медијума је подешена на 7,4 коришћењем концентроване HCl (Merck) или 5M NaOH (Merck), а стерилизација је извршена аутоклавирањем. Овај медијум је коришћен за изолацију и култивацију гранулоцита периферне крви.

3.1.7. HBSS⁺ медијум

HBSS⁺ медијум је HBSS са додатим 0,05% FCS и 10nM HEPES-ом (Flow Laboratories, Ирвин, Шкотска). Овај медијум је коришћен за култивацију гранулоцита периферне крви у појединим експериментима.

3.1.8. PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline)

PBS (pH 7,4) је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,06mM KН₂PO₄, 155,17mM NaCl, 2,97mM Na₂HPO₄ у дестилованој води. Коришћен је за испирање ћелија.

3.1.9. PBS1

PBS1 је PBS са додатком 0,01% NaN₃ (Sigma, Немачка) у PBS.

3.1.10. PBS2

PBS2 је раствор PBS1 у који је додат 2% FCS.

3.1.11. Калијум-PBS

K-PBS је направљен коришћењем следећих супстанци: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ у дестилованој води. Овај пуфер је према упутству произвођача коришћен за ELISA (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*) тестове.

3.1.12. Раствор трипсина у NaEDTA/PBS-у

Раствор трипсина у NaEDTA/PBS-у је чинио 0.25% трипсин (Sigma) и 0.02% раствор NaEDTA (Sigma) у PBS-у у еквивалентној запремини. Овај раствор је коришћен за деадхеренцију (одлепљивање) PL-MSC из култура.

3.1.13. Пропидијум јодид

Пропидијум јодид (PI) (ICN, Санта Ана, САД) је растворен у дејонизованој води у концентрацији од 1mg/ml (15mM) и чуван на +4°C до употребе.

3.1.14. Пропидијум јодид у хипотонном пуферу

PI у хипотонном пуферу је направљен на следећи начин: 250μL 15mM воденог раствора PI (Sigma), 2,2ml 0.75M воденог раствора натријум цитрата (Merck) и 50μL Triton X-100 (Serva) је помешано и допуњено са дестилованом H₂O до 50ml.

3.1.15. Декстран 500

Декстран 500 (Merck) је растворен у физиолошком раствору тако да је добијен 20% шток. Овај раствор је аутоклавиран и чуван на собној температури, а 5% раствор (радна концентрација) направљен од штока је коришћен за изолацију гранулоцита из периферне крви.

3.1.16. Пуфер за лизирање еритроцита

Пуфер за лизирање еритроцита садржи следеће супстанце: 1,5M NH₄Cl (Merck), 0,1M NaHCO₃, 1mM NaEDTA (Sigma, Немачка) у дестилованој води. Овај пуфер који је 10x концентрован за прављење радне концентрације је разблажен у

дестилованој води. Коришћен је за лизирање контаминирајућих еритроцита у току изолације гранулоцита.

3.1.17. Рекомбинантни хумани фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (GM-CSF)

Рекомбинантни хумани GM-CSF (rhGM-CSF; Leucotax, специфичне активности 4.44×10^6 U; Sandoz-Schering Plough, Швајцарска) је растваран под стерилним условима у дестилованој води у концентрацији од 100 $\mu\text{g/ml}$ и чуван на -80°C , до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 100ng/ml.

3.1.18. Рекомбинантни хумани фактор стимулације колонија макрофага (M-CSF)

Рекомбинантни хумани M-CSF (rhM-CSF; R&D Systems, специфичне активности 1.68×10^5 U; Минеаполис, САД). Растворен је под стерилним условима у PBS-у концентрацији од 100 $\mu\text{g/ml}$ и тако чуван на -80°C , до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 100ng/ml.

3.1.19. Моноклонска антитела

Табела 1. Антитела коришћена за анализу фенотипа PL-MSC, гранулоцита и МØ

Антитело	Коњугат	Клон	Кат. бр.	Порекло	Произвођач	Разбл.
CD146	FITC	128018	FAB932F	Миш	R&D Systems, САД	1:10
CD146	/	N1238	ab49492	Миш	Abcam, САД	1:25
CD90	FITC	F15-42-1	MCA90F	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10
CD90	/	EPR3132	ab92574	Зећ	Abcam, САД	1:100
CD105	FITC	SN6	MCA1557F	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10
CD105	/	CN6h	M3527	Миш	Dako, Данска	1:2000
CD73	PE	606112	FAB5795P	Миш	R&D Systems, САД	1:10
CD73	/	Sc-32299	/	Миш	Santa Cruz, Немачка	1:100
CD166	FITC	3A6	MCA1926F	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10
CD44	PE	MEM-85	21270444	Миш	Immunotools, Немачка	1:10
CD56	FITC	MEM-188	MCA2046F	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10

CD39	PE	eBioA1 (A1)	12-0399	Миш	eBioscience, САД	1:10
STRO-1	/	Stro-1	39-8401	Миш	ThermoFisher, САД	1:10
SSEA-4	PE	MC-813-70	FAB1435p	Миш	R&D Systems, САД	1:10
MPO	FITC	CLB-MPO-1	IM1874U	Миш	Immunotech, Француска	1:10
CD16	PE	3G8	MCA1569PE	Миш	Serotec, Велика Британија	1:10
CD206	Biotin	15-2	MCA2155	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10
CD68	Biotin	514H12	MA1-80133	Миш	ThermoFisher, САД	1:10
CD169	Biotin	HSn 7D2	MA1-16891	Миш	ThermoFisher, САД	1:10
CD45	/	T29/33	C723001	Миш	Dako, Данска	1:10
CD34	/	BIRMA-K3	M7081	Миш	Dako, Данска	1:10
CD34	/	QBEnd-10	M7165	Миш	Dako, Данска	1:25
CD14	FITC	MEM-18	MCA2185F	Миш	BIO-RAD, Велика Британија	1:10
HLA-DR	Biotin	L243	347361	Миш	BD Bioscience, САД	1:50
CD1a	PCy5	BL6	IM3610	Миш	Immunotech, Француска	1:10
CD11c	FITC	3.9	FP10125002	Миш	Caltag, Велика Британија	1:10
CD80	FITC	2D10.4	11-0809	Миш	eBioscience, САД	1:10
CD86	PE	IT2.2	12-0869	Миш	eBioscience, САД	
CD209	Biotin	eB-h209	13-2099	Миш	eBioscience, САД	
TNF-α	FITC	6401R	MAB2101R	Миш	R&D Systems, САД	1:10
TGF-β	Biotin	9016	MAB240	Миш	R&D Systems, САД	
IL-10	FITC	127107	IC2171F	Миш	R&D Systems, САД	1:10
IL-12p40	PE	C8.6	12-7129-82	Миш	eBioscience, САД	1:10
IL-4	FITC	MP4-25D2	RHCIL401	Миш	Caltag, Велика Британија	1:10
IL-13	PE	85BRD	12-7136	Миш	eBioscience, САД	
ILT3	PE	ZM4.1	333007	Миш	BioLegend, САД	1:10
ILT4	PE	42D1	338705	Миш	BioLegend, САД	1:10
IDO-1	Biotin	2E2/IDO1	654003	Миш	Caltag, Велика Британија	1:20

3.1.20. Липополисахарид

LPS (Sigma) из *Escherichiae coli* је растворен у RPMI 1640 медијуму у концентрацији од 1mg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацији од 250ng/ml.

3.1.21. Poly I:C

Poly I:C (Sigma) је растворен у RPMI 1640 медијуму у финалној концентрацији 10mg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији 25µg/ml.

3.1.22. Pam3CSK4

Pam3CSK4 (Sigma), агонист TLR2 рецептора, растворен је у RPMI 1640 медијуму у финалној концентрацији 10µg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији 100ng/ml.

3.1.23. Коктел проинфламацијских цитокина

Коктел проинфламацијских цитокина (rhIL-1β, rhTNF-α, rhIL-6) и PGE2, (Sigma) припремљен је од штокова поменутих агониста концентрација 10ng/ml за rhIL-1β, rhTNF-α и rhIL-6 и 1 µg/ml за PGE2 растворених у RPMI 1640 медијуму у финалној концентрацији 25µg/ml (rhIL-1β), 100µg/ml (rhTNF-α), 5ng/ml (rhIL-6) и 0,5µg/ml (PGE2).

3.1.24. Форбол-12-миристан-13-ацетат

Форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA) (Sigma) је растворен под стерилним условима у DMSO (Sigma) у концентрацији од 160µM и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацијама од 16nM, 32nM и 48nM.

3.1.25. N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин

N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин (fMLP) (Sigma) је растворен под стерилним условима у DMSO у концентрацији од 10mM, аликвотиран и чуван на -40°C до употребе. fMLP је у експериментима коришћен у концентрацији од 1µM.

3.1.26. Луминол

Луминол (Fluka, Бухс, Швајцарска) је растворен у свеже припремљеном 0,1M воденом раствору NaOH до концентрације од 50mM. У експериментима је

коришћена концентрација од 50 μ M, добијена разблаживањем штока непосредно пре експеримената. Коришћен је за мерење концентрације NET-а добијених из гранулоцита.

3.1.27. Комплекти за квантификацију продукције цитокина

Табела 2. Комерцијални комплекти за квантификацију продукције цитокина у ћелијским културама

ELISA	Тип	Каталогски број	Произвођач
IL-1 β	DuoSet	DY201-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
TNF- α	DuoSet	DY210-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
TNF- α	Quantikine	DTA00C	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-12p70	DuoSet	DY1270-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-6	DuoSet	DY206-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-6	Quantikine	D6050	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IFN- γ	DuoSet	DY285-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-4	DuoSet	DY204-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-13	DuoSet	DY213-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-10	DuoSet	DY217B-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
TGF- β	DuoSet	DY240-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД
IL-27	DuoSet	DY2526-05	R&D System Inc., Минеаполис, САД

FlowCitomix TM	Продукт	Каталогски број	Произвођач
Multiplex Kits	Th1/Th2 11plex	BMS810FF	Bender MedSystems, Беч, Аустрија

Све остале супстанце су коришћене као што су добијене од произвођача и то су:

- Limforgrer градијент (РАА Laboratories), специфичне густине 1,077g/ml;
- Радиоактивно обележен тимидин - [³H]-тимидин (Amersham International, Амершам, Велика Британија), специфичне активности 6.7 Ci/mmol;
- Triton X-100 „laboratory grade“ (Sigma);
- Диметил-сулфоксид – DMSO (Merck), стерилан, $\geq 99.7\%$;
- 4% формалин растворен у фосфатном пуферу и 4% формалин растворен у етанолу (Апотека ВМА);
- Tissue-tek O.C.T (Sigma);

- H₂SO₄ (Merck), 95-97%;
- HCl (Merck), 37%;
- Ca²⁺ јонофор (A23187, Sigma), 1μM.

3.2. Изолација PL-MSC

MSC су изоловане из PL донора са Клинике за стоматологију (Одељење за оралну хирургију) Војномедицинске академије (ВМА) у Београду, након апикотомије или екстракције зуба. Донори ткива (старосне доби 22-54 године, без системских обољења) су дали писани пристанак а студија је одобрена од стране Етичког одбора ВМА. Укупно је успостављено 17 PL-MSC линија а карактеристике сваке од њих су дате у поглављу „Резултати“. Непосредно пре изолације ћелија, PL су преинкубиране 2 сата у комплетном медијуму за културе ћелија у који је осим антибиотика додато 2.5μg/ml амфотерицина В. Након тога, PL су испране у физиолошком раствору и помоћу хируршког скалпела исецкане на комадиће величине око 1mm³. Потом је вршена дигестија ткива помоћу мешавине ензима колагеназа тип I (1mg/ml; Sigma, Немачка) и DNK-аза (25mg/ml; Sigma, Немачка) у медијуму без додатка серума (α-MEM) 30 минута на 37⁰C у инкубатору са 5% CO₂ уз перманентно мешање магнетом. Након периода дигестије, ензимска активност је блокирана додатком 10% FCS-а и ћелије су испране центрифугирањем на 1400^{rpm}/5min/+4⁰C. Након тога 10⁴ ћелија/cm² је засађено у флашкове за ћелијске културе (T25; 25cm²) (Sarstedt, Нимберг, Немачка). Ћелије су култивисане у комплетном α-MEM медијуму са додатком 10%FCS, 0.05mM 2-меркапто-етанола-а, 2μM L-глутамин, 0.1μM L-аскорбат-2-фосфата уз додатак антибиотика (пеницилин, Галеника; стрептомицин, Панфарма; у концентрацији од по 1% за сваки) на 37⁰C у инкубатору са 5% CO₂. Након 24-часовне инкубације, ћелије су испране три пута у стерилном фосфатном пуферу (phosphate-buffered saline, PBS, Sigma, Немачка) и наливен је свеж медијум. Ћелије су трипсинизоване након достизања 95% конфлуентности, помоћу раствора 0.25% трипсина у NaEDTA (Sigma, Немачка) и тако гајене до 8 ћелијске пасаже. У експериментима су најчешће коришћене PL-MSC из 3. и 4. пасаже.

3.3. Способност формирања колонија - CFU-F тест

Тест способности формирања колонија рађен је тако што су PL-MSC засађиване (25, 50, 100 или 200 по базену плоче са 6 места) (Sarstedt, Нимберг, Немачка) у комплетном медијуму за ћелијске културе (медијум је мењан два пута недељно), према већ добро познатој описаној процедури (Pochampally 2008). Након 14-тог дана теста, колоније су испране у PBS-у, осушене на ваздуху и бојене помоћу May Grünwald-Giemsa (MGG). Колоније су бројане на светлосном микроскопу при чему је преко 50 груписаних ћелија сматрано колонијом. Процент клоногених PL-MSC одређен је према формули $N_c/N_t \times 100$ (N_c , број колонија; N_t , број засађених ћелија по базену).

3.4. Време дуплирања ћелијске популације

У циљу одређивања времена за које долази до дуплирања популације ћелија (енгл. *population doubling time*, PDt) PL-MSC су засађиване у концентрацији 1×10^3 ћелија по базену плоче са 96 места (површина једног базена је 0.32 cm^2) у трипликатима у медијуму за културе ћелија. У наредних 12 дана ћелије су трипсинизоване сваког дана и бројане у физиолошком раствору трипан боје. Време дуплирања популације је рачунато по формули $T_{1/2} = (t_i - t_{i-1}) \times \log 2 / \log (N_i - N_{i-1})$ ($T_{1/2}$, време дуплирања; N_i и N_{i-1} , број сакупљених ћелија у интервалу i). Укупно PDt време рачунато је као средња вредност трипликата.

3.5. Диференцијација PL-MSC

3.5.1. Остеогена диференцијација

Након достизања 90% конфлуентности PL-MSC су трипсинизоване и засађене у плоче са 24 места (Sarstedt, Нимберг, Немачка) за ћелијске културе (3×10^3 ћелија по базену), у 1ml медијума за матичне ћелије (α -MEM). Након 24-часовне инкубације медијум је замењен комерцијалним остео-индуктивним медијумом (Lonza), док су контролне ћелије и даље гајене у α -MEM медијуму. Период култивације PL-MSC према протоколу за остеогену диференцијацију трајао је 4 недеље, при чему је медијум мењан 2 пута у току недеље. Након диференцијационог периода, ћелије су бојене помоћу 1% воденог раствора ализарин црвене боје (енгл. *alizarin red*, Sigma-Aldrich). Овом методом је вршена

детекција ализарин позитивних минерализованих језгара. Помоћу микроскопа вршена је анализа величине и процентуалне заступљености „alizarin-red“ позитивних ћелија на сукцесивних 10 видних поља. Након диференцијације, ћелије су трипсинизоване и направљени су цитоспин препарати на којима је остеогена диференцијација детектована имуноцитохемским бојењем на алкалну фосфатазу. Детекција је вршена помоћу супстрата са Fast Red (1mg/ml; Sigma, Немачка), раствореног у нафтол-диметил формаמידу (10mg/ml; Sigma) и Tris-хидроксиметил аминометан (TRIS; pH=8.3; Sigma) мешавини (1:50). Цитоспинови су инкубирани 1 сат на 37°C у инкубатору у присуству 5% CO₂. Анализа бојених цитоспинова рађена је на светлосном микроскопу (Olimpus IX51) са камером (Nikon DXM1200C), а добијени резултати у виду фотографија су анализирани у NIS-element D 2.30 софтверском програму.

3.5.2. Хондрогена диференцијација

За тест хондрогене диференцијације, PL-MSC су гајене у стерилним полипропиленским криотубама у облику ћелијског пелета. PL-MSC су најпре испране у некомплетном хондрогеном медијуму (без TGF-β3, Lonza) центрифугирањем на 1200^{rpm}, 5 минута. Након тога уклоњени су супернатанти и ћелије су ресуспендоване у 1ml комплетног медијума за хондрогену диференцијацију (Lonza) суплементованим са TGF-β3 (10ng/ml; R&D Systems, Минеаполис, САД), центрифугиране 5 минута на 1200^{rpm} и култивисане 4 недеље, док су контролне ћелије гајене у α-MEM медијуму. Медијуми су мењани 2 пута у току недеље. Након диференцијацијоног периода ћелије у пелету су укалупљене у *Tissue tek O.C.T* (Sigma) и смрзнуте у течном азоту. Потом су направљени криопресеци дебљине 7-10μm помоћу криотома (CM1850-Criostat) (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Хајделберг, Немачка) осушени на ваздуху 2 сата, бојени методом „Alcian blue“ и анализирани на светлосном микроскопу.

3.5.3. Адипогена диференцијација

За адипогену диференцијацију PL-MSC су засађене на стерилне полипропиленске дискове (енгл. *coverslip*) (2.5x10⁴ ћелија на cm²) који су потом убачени у базене плоче са 24 места. Тако су PL-MSC култивисане у α-MEM медијуму на 37°C у инкубатору са 5% CO₂. Након достизања 100%

конфлуентности, ћелије су гајене у медијуму за адипогену диференцијацију у току наредних 3 недеље. Сам процес адипогене диференцијације се одвијао у циклусима од по 3 дана, при чему су ћелије 3 дана гајене у медијуму за адипогену диференцијацију, а наредна три дана у медијуму за одржавање („adipogenic differentiation maintenance medium“). Контролне ћелије су гајене само у медијуму за одржавање. Након 3 недеље, полипропиленски листићи су испрани у стерилном PBS-у, осушени и третирани са 60% изопропил алкохолом 1 минут. Тако припремљене ћелије бојене су 15 минута са Oil Red O (Sigma-Aldrich, Немачка) методом за детекцију адипогених гранула и резултати су анализирани помоћу микроскопа.

3.6. Проточна цитофлуориметрија

Анализа фенотипских карактеристика PL-MSC вршена је на проточном цитофлуориметру, помоћу моноклонских антитела (mAb) специфичних за CD90, CD105, CD166, CD146 и CD56 (Табела 1) обележених са флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC), као и mAb коњугованих са фикоеритрином (PE) која препознају CD39, CD44, CD73 и SSEA4 (Табела 1). Поред методе директне флуоресценце (директно коњугована антитела), рађена је и метода индиректне флуоресценце помоћу anti-STRO-1 mAb (Табела 1) на чију се инкубацију настављала инкубација са секундарним анти-мишјим IgG1-FITC Ab (Serotec, Оксфорд, Велика Британија). Адекватне контроле за FITC и PE флуорохроме су биле мишја IgG1a-FITC и IgG1a-PE антитела (оба добављена од Serotec-a). PL-MSC су сакупљене, испране у PBS са 2% FCS и 0.1% натријум азида (NaN₃). Након тога, ћелије су инкубирани са примарним антителом раствореним у PBS1 1 сат на 4⁰C, према упутству произвођача. За индиректну имунофлуоресценцу инкубација са секундарним антителом трајала је 30 минута такође на 4⁰C. Након обележавања ћелија антителима, анализа је вршена на проточном цитометру (CellFlow CUBE6, PARTEC, Герлиц, Немачка). Након добијања резултата на апарату, снимљени фајлови су анализирани у FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053.) програмском софтверу.

3.7. Третман PL-MSC са TLR агонистима

PL-MSC су засађене у плочама са 6 места (2×10^5 PL-MSC по базену). Након достизања конfluентности од 95% додати су агонисти TLR4 (LPS), TLR3 (Poly I:C) и TLR2 (Pam3CSK4) (концентрација штокова и радна концентерација су дате раније у оквиру овог поглавља). Третман је ређен у дупликату са три донора PL-MSC. Након 24-часовне стимулације сакупљени су супернатанти у којима је мерена продукција цитокина ELISA методом и помоћу комерцијалног *Flow Cytomix* теста, а ћелије су трипсинизоване, избројане и мерена је експресија CD73, CD166, HLA-DR, ILT3, ILT4 и IDO-1 (Табела 1) помоћу методе проточне цитофлуориметрије. Интрацелуларна експресија IDO-1 у PL-MSC је детектована у пермеабелизованим ћелијама помоћу комерцијалног комплета за пермеабелизацију (Fix&Perm, Invitrogen, An Der Grub, Аустрија). PL-MSC су према протоколу произвођача испране у PBS-у ($1400^{ob}/5min/+4^0C$), потом је на пелет додат *Reagens A* (Fix&Perm A) 40 μ l и инкубиране 15 минута на собној температури. Потом су PL-MSC испране у PBS2 ($1400^{ob}/5min/+4^0C$) и на пелет је додат *Reagens B* (Fix&Perm B) са IDO-1 (1:20) и инкубиран 20 минута. Ћелије су након тога још једном испране у PBS2 и инкубиране са секундарним антителом обележеним FITC-ом. По завршетку инкубације резултати су читани на проточном цитофлуориметру, како је описано раније код детекције мембранских маркера.

3.8. Третман PL-MSC са коктелом проинфламацијских цитокина

PL-MSC су засађене у плочама са 6 места (2×10^5 PL-MSC по базену). Након достизања конfluентности од 95% PL-MSC су стимулисане коктелом проинфламацијских цитокина (rhIL-1 β , rhTNF- α , rhIL-6 и rhPGE2) у дупликату са три донора PL-MSC. Након 24-часовне стимулације сакупљени су супернатанти и мерена је продукција цитокина *Citomix* методом. PL-MSC су трипсинизоване, избројане одређена су њихова фенотипска својства на основу експресије CD73, CD166, CD39, HLA-DR, ILT3, ILT4 и IDO-1 помоћу методе проточне цитофлуориметрије.

3.9. Квантификација продукције цитокина у култури PL- MSC након третмана са агонистима TLR и коктелом проинфламацијских цитокина

Ниво продукованих цитокина од стране PL-MSC третираних са агонистима TLR и коктелом проинфламацијских цитокина, мерен је у супернатантима помоћу комерцијалних тестова FlowCytomix (eBioscience) и ELISA комплета (R&D Systems, DuoSet) према упутству произвођача. Детекција помоћу FlowCytomix комплета заснива се на реакцији куглица типа А (дијаметра 4 μ m, обложених са anti-IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-4 и IL-10 антитела коњугованих биотином) и куглица типа В (дијаметра 5 μ m, обложених са anti-TNF- α , IL-8, IL-12 и IL-5 антителима коњугованих биотином) са цитокинима из тестираних супернатаната. Након инкубације куглице су испране у PBS-у и инкубиране са стрептавидин-PE. Детекција продукције је вршена на проточном цитофлуориметру (CellFlow CUBE6, PARTEC) а квантификација цитокина помоћу FCS Express 5 RUO Edition програмског софтвера на основу већ познатих концентрација цитокина у овом комплекту.

Детекција продукције TGF- β и IL-27 вршена је помоћу ELISA комерцијалних тестова. У полистиренске плоче са 96 базена које су преходно обложене поликлонским anti-TGF- β и anti-IL-27 антителима (инкубација преко ноћи), додавано је по 100 μ l супернатанта култура. Након инкубације у трајању од 2 часа плоче су испране комерцијалним пуфером за испирање, након чега је следила инкубација са секундарним антителима према овим цитокинима коњугованих биотином у трајању од 2 часа. После испирања, инкубација је завршена са стрептавидином коњугованим Рх (1:200) а затим супстратом за Рх (двокомпонентни систем из комплета који се припрема у размери 1:1). Интензитет бојене реакције, који је пропорционалан концентрацији цитокина, је одређиван на ELISA читачу (Synergy HT, BIO-ТЕК, Вермонт, САД). Концентрација цитокина је изражена у pg/ml културе ћелија и одређена је помоћу цитокина познатих концентрација који су саставни део комплета, а на основу којих је конструисана стандардна крива.

Комплетан процес детекције цитокина је био у складу са препоруком произвођача.

3.10. Изолација инфламацијских ћелија из периапексних лезија

Инфламацијске ћелије (IC) су изоловане из PL (n = 12) добијених од пацијената са Клинике за стоматологију (Одељење за оралну хирургију) ВМА у Београду, након апикотомије или екстракције зуба. Осам PL су припадале групи асимптоматских лезија а 4 су припадале групи са клиничким манифестацијама симптоматских лезија. PL-IC су изоловане методом ензимске дигестије ткива помоћу ензима колагеназе типа I (1mg/ml; Sigma) и DNK-азе (25 mg/ml; Sigma) у трајању од 30 минута у инкубатору на 37⁰C и 5%CO₂. Ћелије су потом испране у RPMI 1640 медијуму и избројане. Од тако добијених PL-IC направљени су цитоспинови на цитоцентрифуги (Shandon, CytoSpin 4, ThermoFisher SCIENTIFIC, Валтам, САД), који су затим бојени помоћу MGG и анализирани на светлосном микроскопу. PL-IC су коришћене и за изолацију моноклеарних ћелија (MNC). MNC су издвојене из PL-IC центрифугирањем на густинском градијенту (LymphoPrep, Nycomed, Осло, Норвешка) (2000^{rpm}/15min/+23⁰C) и избројане. Такође су направљени цитоспинови који су обојени MGG методом и анализирани помоћу светлосног микроскопа. Идентификација субпопулација PL-MNC је вршена на основу класичних морфолошких критеријума. Анализирано је укупно 500 ћелија по сваком цитоспину, при чему су типови MNC представљени као процентуални удео у укупном броју анализираних ћелија.

3.11. Ко-култура PL-MSC и PL-IC

Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране алогених PL-IC испитиван је у ко-култури са директним контактом ћелија и индиректном контакту коришћењем уметака са полупропустљивом мембраном (енгл. „*Transwell*“ system). PL-IC (1x10⁵ ћелија по базену) су додате у ко-културу са PL-MSC (1x10⁴ ћелија по базену) у плоче са 96 места (PAA Laboratories, Беч, Аустрија). Експеримент је рађен у дубликату ко-култура једне PL-MSC линије изоловане из асимптоматске лезије са 4 различитих PL-IC, све изоловане из асимптоматских лезија. Контроле су чиниле појединачне културе PL-IC и PL-MSC. Ниво продукције цитокина у ко-култури PL-MSC/PL-IC упоређиван је са збиром продукованих цитокина у појединачним културама.

У делу експеримента са уметком, PL-MSC (5×10^4 ћелија по уметку) је засађено у горњем компартмену система тј у уметку ($0.4 \mu\text{m}$ дијаметар пора) (Falcon) у плочи са 24 места, док су PL-IC (5×10^5 ћелија по ml културе) додати у базен плоче испод уметка. Након 24-часовне култивације ћелија у оба система, културе су додатно стимулисане са PMA (20ng/ml ; Sigma) и Ca^{2+} јонофором (A23187, $1 \mu\text{M}$; Sigma) у току наредна 24 сата, након чега су сакупљени супернатанти у којима је мерена концентрација цитокина.

3.12. Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL- MSC и PL-IC

Ниво продукваних цитокина у култури PL-IC и PL-MSC (IL-10, IL-27 и TGF- β), мерена је у супернатантима помоћу комерцијалних тестова (ELISA комплет, R&D Systems, DuoSet) (Табела 2). Концентрације су рачунате према стандардним кривама прописаним од стране произвођача и изражене у pg/ml културе ћелија.

3.13. Ко-култура PL-MSC и PL-MNC

Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране алогених PL-MNC је испитиван у ко-култури са директним контактом ћелија. PL-MNC (1×10^5 ћелија по базену) и PL-MSC (1×10^4 ћелија по базену) је додато у плочу са 96 места и култивисано 48 часова, с тим што је додатна стимулација са PMA (20ng/ml) и Ca^{2+} јонофором (A23187, $1 \mu\text{M}$) вршена у последњих 24 сата. Контроле су биле појединачне културе PL-MNC и PL-MSC, односно збир цитокина ових појединачних култура. Ниво продукваних цитокина у ко-култури упоређиван је са збиром продукваних цитокина од стране појединачних култура PL-MSC и PL-MNC. Експеримент је рађен у дупликату са 8 линија PL-MNC (4 симптоматске и 4 асимптоматске) које су култивисане са једном PL-MSC ћелијском линијом успостављеном из асимптоматске и једном PL-MSC ћелијском линијом успостављеном из симптоматске лезије.

3.14. Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL- MSC и PL-MNC

Концентрација цитокина у ко-култури PL-MSC и PL-MNC (IL-1 β , TNF- α , IL-10 и TGF- β), мерена је у супернатантима помоћу комерцијалних тестова (ELISA

комплет, R&D Systems, DuoSet) како је раније описано. Концентрације су израчунате на основу стандардних кривих конструисаних према познатим концентрацијама цитокина и изражане у pg/ml.

3.15. Изолација неутрофила из периферне крви

Гранулоцити су изоловани из пуне крви пацијената, добровољних давалаца из Института за трансфузиологију и хемобиологију ВМА, уз њихову писмену сагласност. Додавањем 5% декстрана (Sigma, Немачка) извршена је седиментација еритроцита у току 45 минута на собној температури. Супернатанти изнад талога еритроцита, који се састојао од леукоцита и тромбоцита, су сакупљени и стављени на градијент Lymphoprep густине 1.077g/ml (Nycomed, Осло, Норвешка) на 2200^{rpm}/20min/23⁰C, ради одстрањења моноклеарних ћелија и тромбоцита. Ћелије из пелета (гранулоцити) су ресуспендоване у раствору HBSS-а а затим два пута испране у истом раствору центрифугирањем на малим брзинама у циљу елиминације заосталих тромбоцита. Тако добијени гранулоцити су коришћени у експериментима са PL-MSC.

3.16. Ко-култура PL-MSC и неутрофилних гранулоцита

PL-MSC (1×10^5 ћелија) и гранулоцити (5×10^5 ћелија) по базену плоче са 24 места су постављене у ко-културу (директан контакт и систем са уметком) како је описано код PL-MSC/PL-IC и PL-MSC/PL-MNC ко-култура. Осим ове комбинације, постављен је и систем ко-културе PL-MSC и гранулоцита које су третиране са LPS (250ng/ml) или fMLP (100nmol). Контролне групе чиниле су појединачне културе ћелија PL-MSC и гранулоцита (нестимулисане ћелије, ћелије стимулисане са LPS и fMLP), као и културе гранулоцита са додатком 50% кондиционираног медијума (CM) PL-MSC које су биле додатна контрола за контрола за културе са уметком. CM је сакупљен након 24-часовне културе конфлуентних PL-MSC. Време трајања ко-културе било је 24 часа, након чега су ћелије сакупљене у циљу анализе њихових фенотипских својстава, проучавања апоптозе и детекције продукције цитокина у супернатантима. У овом делу експеримента коришћене су 3 PL-MSC линије и 3 донора гранулоцита.

3.17. Имунохистохемијска анализа

За имунохистохемијску анализу припремљени су крио- и парафински пресеци PL (гранулома зуба) (n=20) који су добијени са Клинике за стоматологију (Одељење за оралну хирургију) ВМА у Београду, након апикотомије или екстракције зуба. Донори ткива (старосне доби 22-54 године, без системских обољења) уз писани пристанак. После екстракције, ткива су укалупљена у гелу за фиксацију (*Tissue-tek O.C.T.*) а затим смрзнута у криотому или су пребачена у течни азот. Криопресеци дебљине 7-10 μ m су прављени на криотому (СМ1850-Criostat) (Leica), затим осушени на ваздуху 2 сата и фиксирани у хладном ацетону 10 минута на -20 $^{\circ}$ С. Тако припремљени, пресеци ткива су испрани у пуферском раствору Tris-а (TBS; Sigma) 5 минута, а затим је блокирана ендогена пероксидаза помоћу 0.3% H₂O₂ (Sigma) 10 min. Након тога следила је инкубација са примарним (1h), а потом са секундарним (30min) антителима на температури од 37 $^{\circ}$ С. Секундарна антитела су била коњугована или са пероксидазом (P_x) или са алкалном фосфатазом (AP). За детекцију и визуелизацију реакције додавани су DAB kit (P_x бојење) или АРААР супстрат (AP бојење) (Дакo, Глоструп, Данска). Препарати су на крају контрастирани хематоксилином (само за једноструко бојење), након чега су монтирани у Keiser-гелу и анализирани на микроскопу.

За парафинске пресеке ткива PL су фиксирани у 4% формалдехиду 24 часа, а потом, након стандардног поступка дехидратације и просветљавања, калупљени у парафинске калупе. Направљени су пресеци дебљине 4-6 μ m помоћу микротоме. Препарати су потом осушени на собној температури преко ноћи. Након тога урађена је депарафинизација у 100% ксилену (5min), а потом рехидратација сукцесивним инкубирањем препарата у 100% EtOH, 90% EtOH и 70% EtOH. Демаскирање антигена рађено је помоћу пепсина (2-5min), након чега су препарати испрани 2x у PBS-у на собној температури (5min), затим 1x у раствору MgCl₂/PBS такође 5 минута на собној температури, 10 минута у MgCl₂/PBS/формалдехид раствору, 5 минута у PBS, и на крају по 3 минута у 70%, 90% и 100% EtOH. На тако припремљеним препаратима, рађено је имунохистохемијско бојење помоћу моноклонских антитела на хумане антигене PL-MSС, комерцијалним EnVisionTM GI2 kit-ом, према протоколу препорученом од стране произвођача.

Колокализација PL-MSС и неутрофила, као и PL-MSС и M \emptyset анализирана је методом двоструког имунохистохемијског бојења на крио- и парафинским

пресецима PL, помоћу mAb на маркере PL-MSK (CD146), неутрофила (CD16 и MPO) и MØ (CD68) (Табела 1). Као секундарна антитела коришћена су анти-мишје IgG-HRP (Dako) и зечије анти-мишје IgG (Dako). За анализу на конфокалном микроскопу коришћена су антитела обележена флуорохромима (FITC, PE) и/или антитела коњугована биотином (Табела 1) на које је касније додато анти-мишје IgG-Alexa488 (Dako) или IgG-Alexa546 (Dako). Једра ћелија бојена су (контрастирана) помоћу SYTO59 (Thermo Fisher Scientific, САД) разблажења 1:1000 (5µM) у пуферу без фосфата.

3.18. Припрема NET-а

Гранулоцити су изоловани из пуне венске крви (према већ описаној процедури), а потом засађени у базене плоче за ћелијске културе са 24 места (1x10⁶ ћелија по базену) и стимулирани са PMA (50nM) у току 4h. Након стимулације, гранулоцити су два пута испрани топлим раствором HBSS-а и третирани ензимом DNK-аза (10U/ml) раствореним у RPMI-1460, 20 минута у инкубатору на 37⁰C у 5% CO₂. Након завршене ензимске фазе, сакупљени су супернатанти, центрифугирани на 2000^{ob}/7min/+4⁰C, а концентрација DNK материјала у супернатантима је мерена помоћу спектрофотометра на 260nm и рачуната по формули C(µg/ml)=AbsxRx50 (Abs, апсорбанца; R, разблажење, 50 је константа).

3.19. Мерење NET-озе у *in vitro* ко-култури гранулоцита периферне крви са PL-MSK

NET-оза је мерена помоћу флуориметријске методе која се заснива на квантификацији количине екстрацелуларне DNK помоћу PI, ћелијске непропустљиве, флуоресцентне боје која се везује за DNK (Vong *и сар.* 2013) сразмерно интензитету NET-озе. Гранулоцити (n=3) су распоређени у базене плоче са 96 места са равним дном израђене од црне пластике (Costar, Њујорк, САД) у концентрацији од 1x10⁵/базену/200µl HBSS⁺ медијума. У поједине базене су најпре култивисане PL-MSK (n=1, 4. пасажа) до достизања пуне конфлуентности а потом су у те базене додати гранулоцити и ко-култивисани са PL-MSK у трајању од 1 сата на 37⁰C. У посебним базенима гранулоцити су стимулирани са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSK и са rhIL-6 (5ng/ml, Sigma). NET-озе је индукована са PMA (48nM), а у одређене базене је додат Triton X-100 како би се измерила

количина укупне DNK. Након 2-часовне инкубације на 37°C, у инкубатору за културе ћелија, у присуству 5% CO₂, у одговарајуће базене је додата DNK-аза и инкубација је настављена још 45 минута под истим условима. Након тога је у све базене додат PI (20µg/ml). Интензитет флуоресценце је прочитан после 15 минута на читачу за микроплоче (Synergy HT, ВЈО-ТЕК, Вермонт, САД).

Количина екстрацелуларне DNK (изражена као проценат тоталне DNK) је израчуната на основу следеће једначине (приказан је пример са PMA где је IF=интензитет флуоресценце; Gr=гранулоцити)

$$\text{Процент тоталне DNK} = \frac{\text{IF (Gr+PMA)} - \text{IF (Gr+PMA+DNKаза)}}{\text{IF (Gr+TritonX-100)}} \times 100\%$$

3.20. Третман PL-MSС са NET-ом

У циљу испитивања двосмерне комуникације PL-MSС и неутрофила испитиван је ефекат NET-а на продукцију цитокина од стране PL-MSС културе. За ово испитивање коришћене су три PL-MSС ћелијске линије. PL-MSС су засађене у плоче са 24 места (1x10⁵ ћелија по базену). Почев од тренутка достизања конфлуентности од 100% па у наредних 24 сата PL-MSС су стимулирани са NET-ом (2.5ng/ml), припремљеним из неутрофила према већ описаној процедури. Након периода инкубације, сакупљени су супернатанти и мерена је продукција цитокина.

3.21. Пролиферација PL-MSС након третмана са NET-ом

У посебном експерименту испитиван је утицај NET-а на пролиферацију PL-MSС линије. PL-MSС (1x10⁴ ћелија по базену) су засејане у плочи са 96 места са равним дном у α-MEM (Sigma) медијуму (трипликати култура) и остављене да адхерирају наредних 6 сати. Потом су ћелије третиране са NET-ом у концентрацији од 2.5ng/ml у наредна 3 дана. Контролне ћелије су биле PL-MSС култивисане без NET-ом. Након инкубације у културе је додат радиоактивни тимидин (3H⁺) (1µCi по базену) (оригиналне концентрације 6.7Ci/mmol, Bioscience, Амершам) у последњих 18 сати. Након тога ћелије су трипсинизоване а преузимање радионуклида мерено је на сцинтилационом β бројачу (Beckman, LS5000TB). Резултати су добијени као број откуцаја у минути (CPM) а прерачунати су као релативни проценти у односу на контролу (100%).

3.22. Квантификација продукције цитокина у култури PL- MSC након третмана са NET-ом

Ниво продукованих цитокина од стране PL-MSC третираних са NET-ом, мерен је у супернатантима помоћу комерцијалних тестова FlowCytomix (Bender MedSystems) (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN-12, IFN- γ , IL-4, IL-5 и IL-10) и ELISA комплета (R&D Systems, DuoSet) (TGF- β и IL-27) (Табела 2). Детекција цитокина у супернатантима култура је раније описана а концентрације су изражене у pg/ml.

3.23. Апоптоза гранулоцита

У циљу одређивања ефекта PL-MSC на апоптозу гранулоцити су инкубирани са PL-MSC у односу 5:1, у систему са и без директног ћелијског контакта у току 24 часа, како је раније описано. Гранулоцити су сакупљени лаганим пипетирањем а њихова апоптоза је одређивана помоћу Annexin-V-FITC/пропидијум јодида (PI) комплета (BD Bioscience) према упутству произвођача. Апоптоза је анализирана на цитофлуориметру CellFlow CUBE6 (PARTEC), а добијени дигитални подаци анализирани у FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053.) програмском софтверу. Апоптоза је такође одређивана морфолошким методом након бојења ћелија у Türk-овом раствору. Помоћу светлосног микроскопа бројане су апоптотични неутрофили које карактерише одсуство мултилобуларности једра, кондензација хроматина без нарушавања интегритета ћелијске мембране и фрагментација кондензованих једара. Процент апоптозе је одређиван након бројања укупно 500 неутрофила по препарату.

3.24. Утицај рекомбинантног IL-6 на апоптозу гранулоцита

У циљу испитивања могућег ефекта IL-6 продукованог од стране PL-MSC на инхибицију апоптозе гранулоцита, гранулоцити су изоловани из периферне крви према већ описаној процедури и постављени у базене плоче са 24 места са равним дном (5×10^5 ћелија по базену). Након тога третирају се са рекомбинантним хуманим IL-6 (Sigma, Немачка) у концентрацији 2.5ng/ml, 5ng/ml 7.5ng/ml и 10ng/ml. Као посебна контрола коришћен је кондиционирани медиум (CM) PL-MSC у току наредна 24 сата. Након тога је одређивана апоптоза неутрофила у раствору Türk-а помоћу светлосног микроскопа на основу морфолошких показатеља како је већ описано.

3.25. Реверзија апоптозе гранулоцита помоћу anti-IL-6 mAb

У циљу тестирања анти-апоптозног ефекта IL-6 у ћелијске културе е додавано блокирајуће anti-IL-6 моноклонско антитело (R&D Systems). Коришћене су културе гранулоцита са рекомбинантним IL-6 или CM сакупљеног од PL-MSK, по истом моделу како је горе наведено. Након инкубационог периода одређивана је апоптоза неутрофила у раствору Türk-а помоћу светлосног микроскопа на основу морфолошких критеријума.

3.26. Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSK и неутрофила

Нивои цитокина гранулоцита (IL-6, TNF- α , TGF- β и IL-27) мерени су супернатантима култура ћелија сакупљених након 24 сата, помоћу ELISA комерцијалних тестова DuoSet и Quantikine (R&D Systems) (Табела 2), према упутству произвођача. Концентрације су израчунате на основу стандардних концентрационих криви и изражене су у pg/ml.

3.27. Изолација моноцита и њихова диференцијација у макрофаге

Моноцити су изоловани из концентрата периферне крви (*buffy coat*) добровољних давалаца крви из Института за трансфузиологију и хемобиологију ВМА уз њихову писмену сагласност. Концентрат пуне венске крви је разблажен 3 пута у раствору 0,02% NaEDTA у RPMI 1640 (Sigma, Немачка) и нанет на градијент густине Lymphoprep (1.077g/ml; Nycomed, Oslo, Norway) на 2200^{rpm}/20min/23⁰C. Затим су сакупљени „прстенови“ ћелија на граници према градијенту и испрани 2 пута у RPMI 1640 медијуму. На крају су ћелије ресуспендоване у RPMI медијуму са додатком 10%FCS, 0.05mM 2-меркапто-етанола, 2 μ M L-глутамин и антибиотика. MNC су потом култивисане 2 сата у циљу адхеренције моноцита (1×10^6 ћелија по cm² базена плоче за културе ћелија). Након тога, пажљиво су покупљене неадхерентне ћелије, а адхерентни моноцити су били подељени у три групе за даљу диференцијацију. Прву групу су чинили макрофаги диференцирани без додатка фактора раста (спонтана диференцијација) (sM \emptyset), другу групу су чинили M \emptyset диференцирани у присуству M-CSF-а (100ng/ml; R&D Systems) (mM \emptyset), а трећу M \emptyset диференцирани у присуству GM-CSF-а

(100ng/ml; R&D Systems) (gmMØ). Период диференцијације је трајао 5 дана након чега су ћелије пажљиво испране у стерилном PBS-у загрејаном на 37⁰C. Тако добијене MØ коришћене су у експериментима са PL-MSC претходно припремљеним према већ описаној процедури.

3.28. Ко-култура PL-MSC и MØ

PL-MSC (2x10⁵ ћелија по базену) и MØ (5x10⁵ ћелија по базену) постављене су у ко-културу (директан контакт ћелија или систем са полупропустљивом мембраном). У појединим експериментима MØ су такође третиране 24 сата кондиционираним медијумом PL-MSC (CM50%) у циљу праћења ефекта солубиних фактора на фенотип и продукцију цитокина у међусобној интеракцији PL-MSC и MØ. Такође су постављене и адекватне контролне групе које су чиниле појединачне културе PL-MSC и MØ. Време трајања ко-културе било је 5 дана, након чега су сакупљени супернатанти а ћелије трипсинизоване, урађен фенотип на M1 и M2 маркере као и интрацелуларна продукција проинфламацијских и имунорегулацијских цитокина MØ и PL-MSC. У овом експерименту коришћене су три PL-MSC линије и три културе MØ различитих донора.

3.29. Фенотип MØ у ко-култури са PL-MSC

Фенотипске карактеристике MØ из ко-културе са PL-MSC анализирани су на проточном цитофлуориметру, помоћу FITC-коњугованих mAb на anti-CD45, CD80, CD14 и CD11c, као и PE-коњугованих anti-CD16, CD73, CD39 и TLR4 и антителима коњугованих биотином anti-HLA-DR, CD206, CD68, CD169 и CD209 (Табела 1) на које су додавани стрептавидин-FITC или стрептавидин-РeCy5 (Serotec). Процедура је раније детаљно описана. За детекцију експресије интрацелуларног CD68 рађена је пермеабилizација ћелија помоћу комерцијалног комплета за пермеабилizацију ћелија (Flow Cytometry Fixation and Permeabilization Kit I; R&D Systems, Inc. 1-800-343-7475) према упутству произвођача. Након обележавања ћелија антителима, анализа експресије маркера је вршена на проточном цитометру CellFlow CUBE6 (PARTEC). Популације MØ и PL-MSC су идентификоване према параметрима за „forward“ и „side scatter“, затим је ниво експресије појединачних маркера анализиран у популацији CD45+ односно HLA-

DR+ ћелија. Добијени „фајлови“ су обрађени помоћу FCS Express 5 RUO Edition програмског софтвера.

3.30. Детекција интрацелуларних цитокина

У циљу детекције експресије интрацелуларних цитокина у ко-културама PL-MSK и MØ вршена је пермеабилација ћелија помоћу комерцијалног комплета (Flow Cytometry Fixation and Permeabilization Kit I; R&D Systems) а према упутству произвођача. Најпре су ћелије третиране монезином (3 μ M, Sigma) у трајању од 5 сати, након чега су фиксиране и пермеабилзоване а потом инкубиране са анти-мишјим mAb према хуманим цитокинима TNF- α , IL-4 и IL-10 (FITC), затим IL-12p40 и IL-13 (PE) и anti-TGF- β и IDO-1 (Biotin), приклаваних у табели 1. За индиректну флуоресценцу са антителима коњугованих биотином обележавање је рађено помоћу стрептавидин-PerCy5 (Serotec, Oxford, UK). За испирање ћелија коришћени су комерцијални Fixation и Permeabilization buffer. Експресија интрацелуларних цитокина у ко-култури PL-MSK и MØ мерена је на проточном цитофлуометру а њихова квантификација у MØ (CD45+/HLA-DR+) и PL-MSK (CD45-/HLA-DR-) рађена је помоћу FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053.) софтвера.

3.31. Квантификација продукције цитокина у ко-култури PL-MSK и MØ

Ниво продукованих цитокина у ко-култури PL-MSK и MØ мерен је у супернатантима помоћу комерцијалних тестова FlowCytomix (eBioscience) (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN-12, IFN- γ , IL-4, IL-5 и IL-10) и ELISA комплета DuoSet и Quantikine (R&D Systems) (TGF- β и IL-27) као што је већ описано.

3.32. Статистичка анализа података

У анализи података коришћени су *Studentov t* тест, анализа варијансе (ANOVA) са одговарајућим пост-тестом (*Bonferroni* пост-тест или *Dunnett* пост-тест). Анализа података је рађена у GraphPad Prism 5.0 програмском софтверу. Статистичке значајности су означене звездицама и њихово значење је * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ или тарабицама и њихово значење је # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ у поређењу са одговарајућом контролом.

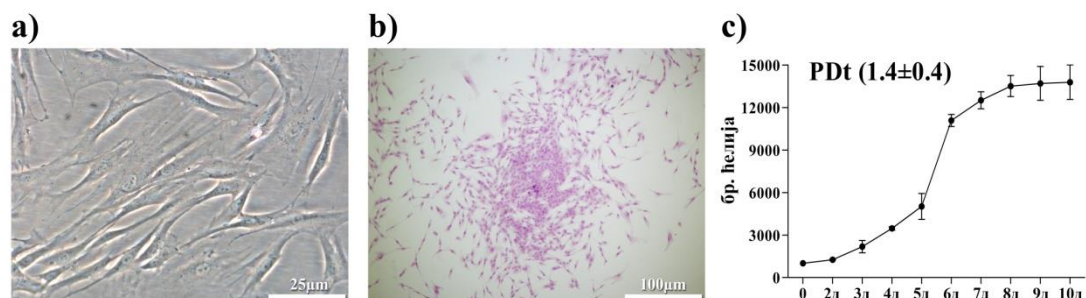
4. Резултати

Део I. Успостављање и карактеризација PL-MSC линија

4.1. Морфологија, клоногеност и степен пролиферације PL- MSC

У првом делу овог истраживачког рада успостављене су четири MSC ћелијске линије добијене из PL различитих донора, а према већ устаљеној процедури за њихову изолацију (Ђокић *и сар.* 2012) а која је детаљно приказана у поглављу Материјал и методе. Циљ ових експеримената је био анализа морфолошких карактеристика, способност формирања колонија и динамика раста PL-MSC.

Анализом на инвертном микроскопу показано је да је морфологија PL-MSC слична морфологији фибробласта (Слика 1a). Све ћелијске линије су формирале колоније (CFU-f) у култури (Слика 1b). На основу динамике раста је показано да PL-MSC имају високу стопу пролиферације која је сигмоидног карактера (Слика 1c), при чему је њихов раст у првих 4 дана био спорији, након чега је следио период интензивне пролиферације између 4. и 7. дана (експоненцијална фаза раста). Када су ћелије достигле густину око 80% конфлуентности уочен је други период успореног раста (плато), који се најчешће јављао након 7. дана култивације.



Слика 1. Морфологија, клоногеност и степен пролиферације PL-MSC. PL-MSC су гајене у медијуму за мезенхимске матичне ћелије (α -MEM). **a)** Слика PL-MSC из 4. пасаже у култури, добијена помоћу инвертног микроскопа, показује њихову фибробластоидну морфологију, увећање 10x, даљинар 25 μ m. **b)** CFU-f тест, колонија PL-MSC (бр. ћелија већи од 50), MGG бојење, увећање 40x, даљинар 100 μ m. **c)** Крива раста PL-MSC (сигмоидни карактер); **Pdt**, време за које долази до дуплирања популације.

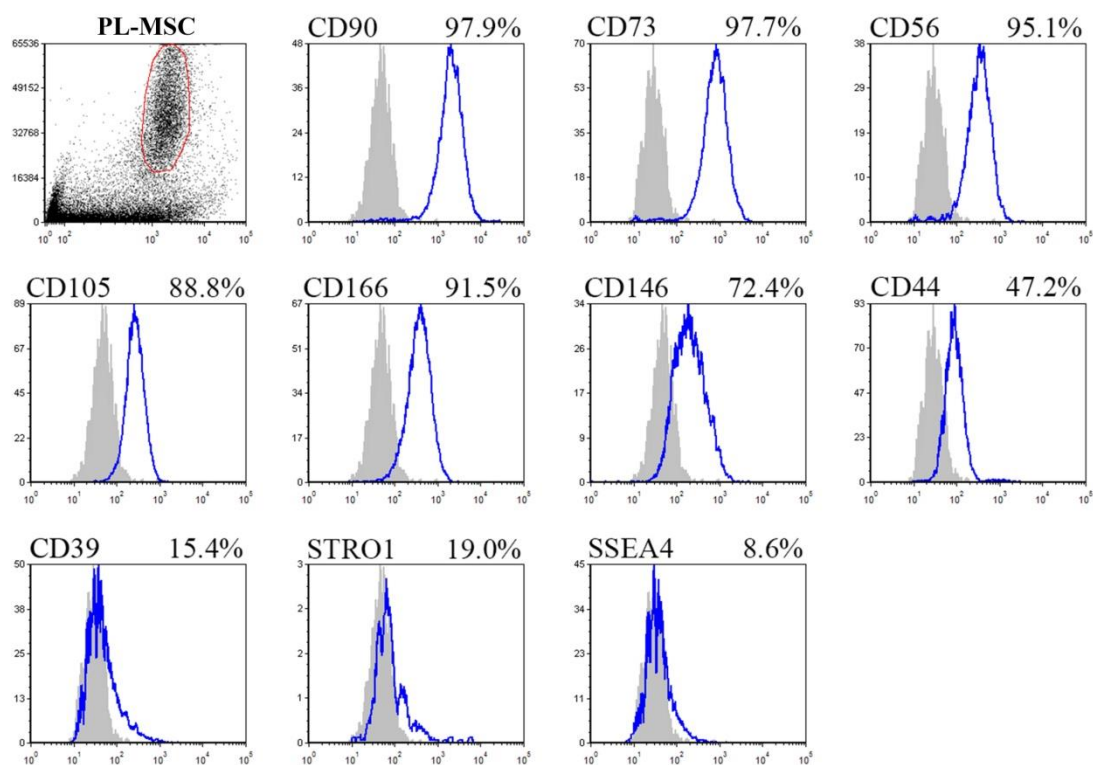
4.2. Фенотипска карактеризација PL-MSC

Након првог дела морфолошких и пролиферативних испитивања, анализиран је фенотип успостављених PL-MSC линија на проточном цитофлуориметру. Показано да PL-MSC експримирају типичне MSC маркере као што су CD90, CD73 и CD105 (за сваки маркер је показана експресија већа од 95% за све анализирани хелијске линије), што је у сагласности са минималним критеријумима за њихову класификацију (Dominici *u cap.* 2006). Осим тога, ове PL-MSC линије такође су у високом проценту експримирале CD166, CD56 и CD146. Интересантно је напоменути да је експресија CD44 била хетерогена и варирала је у опсегу 9.1% - 55.5%. Најнижа експресија је била за STRO1 (18.1±3.4%), CD39 (14.0±1.9%) и SSEA4 (6.3±1.8%) (Табела 3 и Графикон 1).

Табела 3. Фенотипске карактеристике PL-MSC

Маркери	Експресија (%) ± SD
CD90	97.3±1.7
CD73	94.8±4.7
CD56	93.9±1.6
CD105	90.2±5.7
CD166	87.8±3.7
CD146	71.0±8.9
CD44	26.6±19.6
CD39	14.0±1.9
STRO-1	18.1±3.4
SSEA4	6.3±1.8

PL-MSC (n=4) из 4. пасаже су припремљене за анализу на проточном цитофлуориметру према протоколу описаном у поглављу Материјал и методе. Популација PL-MSC анализирана је према параметрима за *forward/side scatter*, а ниво експресије сваког појединачног маркера одређиван је као проценат позитивних ћелија у анализираном узорку у односу на контролу. Резултати су приказани у виду средње вредности % позитивних ћелија ± SD.



Графикон 1. Профилни хистограми једне од репрезентативних PL-MSC линија. Плавом бојом су означени узорци анализирани за сваки појединачни маркер, а сивом бојом контролне ћелије. Разлика у преклапању узорака и контроле представљена је у виду процента позитивних ћелија за дати маркер.

4.3. Експресија MSC маркера у PL

У циљу идентификације ћелија које испољавају маркере MSC на цитофлуориметрији, желели смо да проверимо каква је експресија ових маркера у PL *in situ*. У том циљу су рађена имунохистохемијска бојења серије криостатских и парафинских пресека ткива PL (гранулома) (n=20) помоћу моноклонских антитела катактеристичних за маркере MSC (CD146, CD90, CD105, CD73, CD166, CD271, CD56, α -SMA, STRO-1 и SSEA4). Резултати експресије анализираних маркера приказани су на сликама 2-10. и табели 4. У табели су приказане позитивно обојене структуре за анализиране маркере MSC и семиквантитативни степен њихове експресије.

На слици 2 је приказана експресија CD146 *in situ*. Позитивност је детектована првенствено на ендотелу крвних судова капилара и посткапиларних венула. Осим тога, периваскуларни (перицитни) региони капилара и посткапиларних венула су такође CD146 позитивни (Слика 2D), али се уочавају и крвни судови (капилари и посткапиларне венуле) са негативним перицитима. Експресија CD146 *in situ* је умереног до јаког интензитета (Слика 2).

Позитивност на CD90 је била присутна како на васкуларним елементима тако и у строми PL (Слика 3). Интензитет пребојености структура је варирао од умерено јаке до јаке пребојености. Артериоле, капилари и пост-капиларне венуле, су показивале интензивну пребојеност како ендотела тако и зидова крвних судова, док је експресија CD90 у периваскуларном региону умереног интензитета (Слика 3B и 3D). Позитивност перицита се тешко уочава у осталу на остале елементе крвних судова. У строми гранулома се такође уочава велики број CD90⁺ фибробласта, као и појединачних ћелија фибробластоидне морфологије (Слика 3A и 3C).

Експресија CD105 маркера у PL је била заступљена на крвним судовима, али је у односу на CD146 била мање изражена и углавном је ограничена на ендотел крвних судова (артериоле, капилари, пост-капиларне венуле) (Слика 4). Пребојене структуре су умерено јаког интензитета. Уочава се велики број пост-капиларних венула са CD105⁺ ендотелом и CD105⁻ перицитима (Слика 4D), а у строми се такође уочавају CD105⁺ ћелије фибробластоидног изгледа и макрофаги (Слика 4C). На парафинским пресецима симптоматских гранулома у региону са

инфилтришућим инфламацијским ћелијама такође су уочене појединачне CD105⁺ ћелије (Слика 4C).

Експресија CD73 *in situ* је била умереног интензитета и заступљена на васкуларним елементима (Слика 5A), доминантно у строми али и на појединачним ћелијама у инфилтрату (Слика 5C). На криостатским пресецима експресија CD73 је била умерено до умерено слабог интензитета присутна на пост-капиларним венулама (Слика 5B). На парафинским пресецима запажен је велики број CD73⁺ ћелија које морфолошки личе на макрофаге и инфилтришућих ћелија у околини крвних судова (Слика 5D).

Испољеност CD166 у PL је била слабог до умереног интензитета (Слика 6). Овај маркер је био често дистрибуиран у региону пролиферисаних епителних трака (Маласезова епителна острваца) и показивао мрежасту форму. Унутар региона ограничених ланцем CD166⁺ ћелија (каоко је приказано на слици 6B) уочавају се крвни судови (артериоле) дискретне позитивности.

Сличну дистрибуцију CD166 у ткиву гранулома је имао и CD271 (Слика 7). На слици се очављују CD271⁺ пролиферисане епителне траке јаког интензитета пребојености. Међутим за разлику од CD166, у строми гранулома бојених на CD271 и на крвним судовима није детектована позитивност.

Експресија CD56, умереног интензитета, је била присутна на крвним судовима мањег дијаметра (капилари) (Слика 8A). Осим тога у строми су уочене појединачне CD56⁺ ћелије (Слика 8B).

Експресија α -SMA је била јаког интензитета и присутна на већим крвним судовима (артериоле и венуле) и пост-капиларним венулама (Слика 9A). Уочен је велики број α -SMA⁺ артериола са α -SMA позитивним и негативним перипитима (Слика 9B).

Експресија STRO-1 присутна је само у појединим регионима слабог интензитета. Позитивне су појединачне ћелије крвних судова (најчешће капилара) и око крвних судова (највероватније перипити) као и у строми гранулома (Слика 10). Позитивност перипита није била јасна.

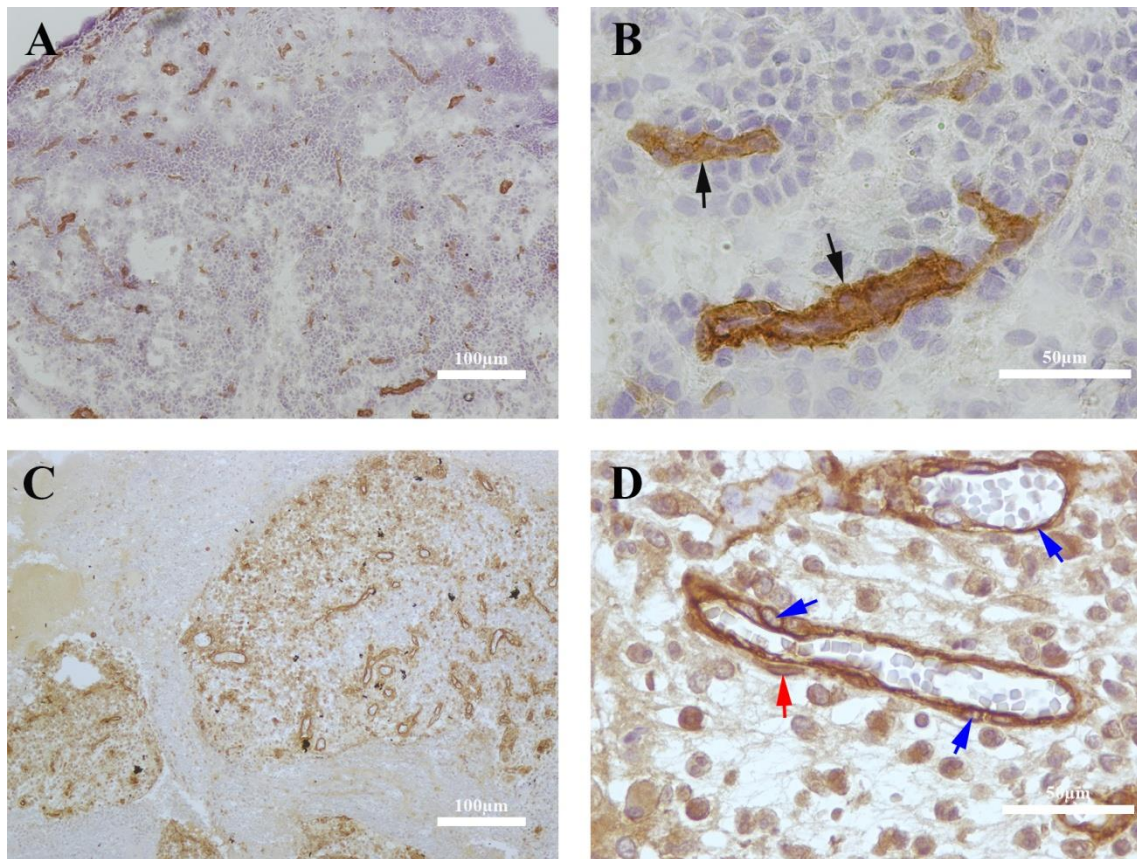
Експресија SSEA4, је попут дистрибуције CD166 и CD271, је била присутна на пролиферисаним епителним тракама умереног интензитета (Слика 11A). Међутим, SSEA4 је експримиран и на бројним појединачним ћелијама у строми

гранулома као и у близини зидова крвних судова који морфолошки и топографски одговарају перицитима (Слика 11В).

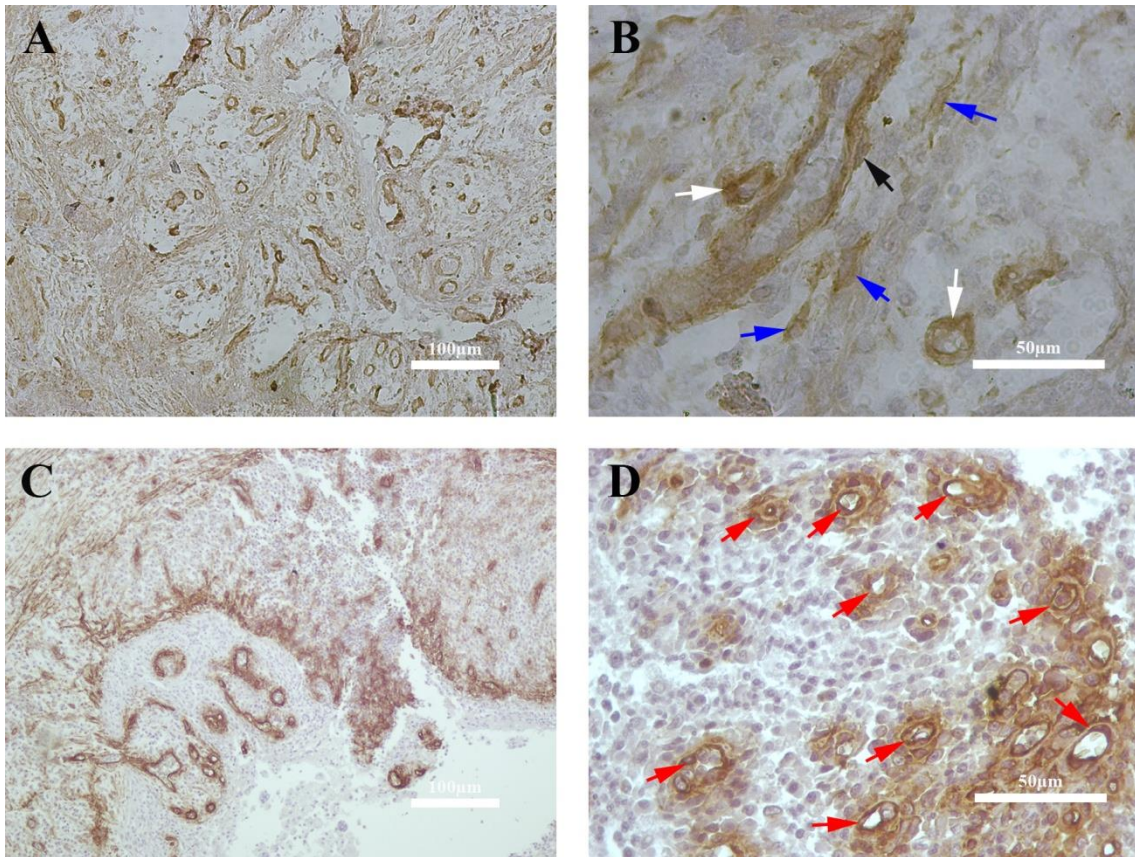
Табела 4. Експресија MSC маркера у PL *in situ*

Маркер	Експресија	Интензитет експресије
CD146	Ендотелне ћелије капилара, пост-капиларних венула; перицити	++++
CD90	Ендотелне ћелије артериола, капилара, пост-капиларних венула; фибробластодне ћелије	++++
CD105	Ендотелне ћелије артериола, капилара, пост-капиларних венула; фибробласти; макрофаги; поједине инфилтришуће ћелије	+++
CD73	Ендотелне ћелије пост-капиларних венула, макрофаги, већина инфилтришућих ћелија	++
CD166	Ендотелне ћелије артериола; пролиферисане епителне траке	++
CD271	Пролиферисане епителне траке	++++
CD56	Ендотелне ћелије капилара; појединачне стромалне ћелије	++
α -SMA	Ендотелне ћелије и ћелије зидова артериола, венула, пост-капиларних венула; перицити	++++
STRO-1	Појединачне стромалне ћелије; перицити	+
SSEA4	Појединачне стромалне ћелије; перицити; пролиферисане епителне траке	++

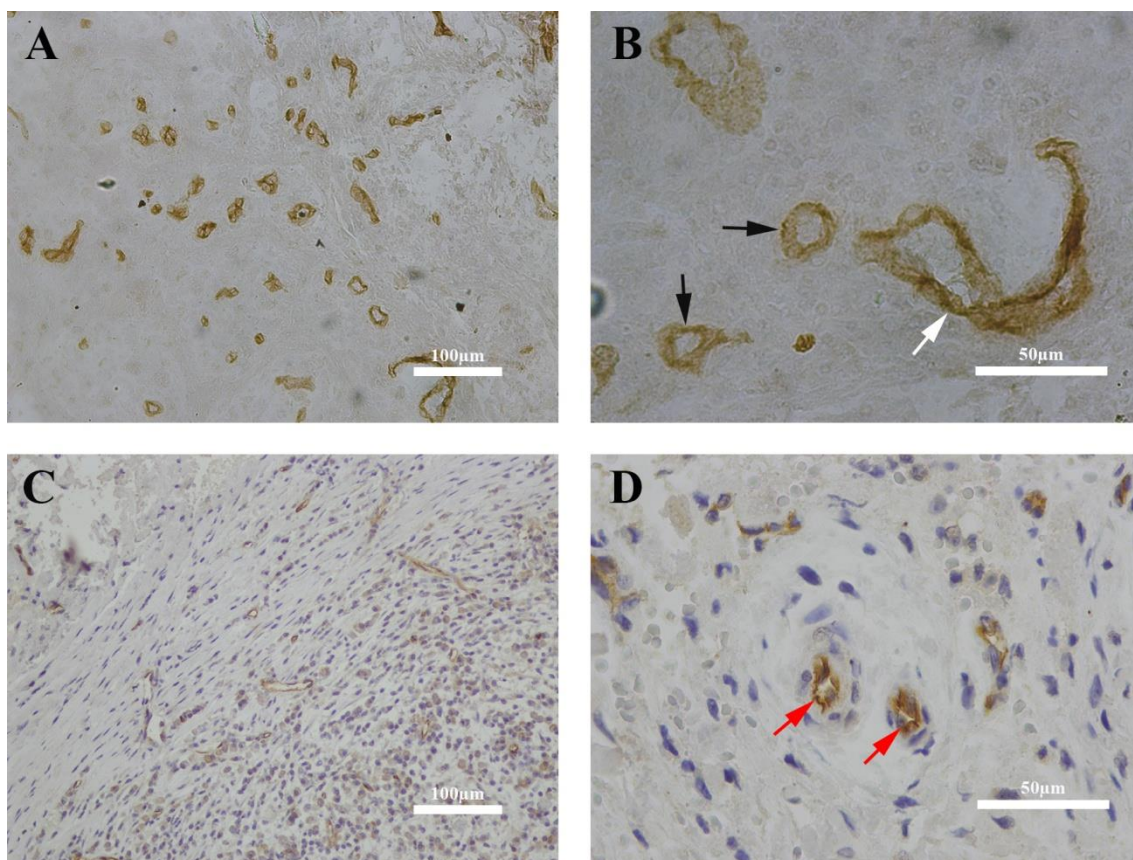
Експресија маркера MSC у PL је одређена према степену (интензитету) пребојености позитивних структура и ћелијских елемената семиквантитативно. +++++, јак интензитет бојења; +++, умерен до јак интензитет бојења; ++, слаб до умерен интензитет бојења; +, слаб интензитет бојења.



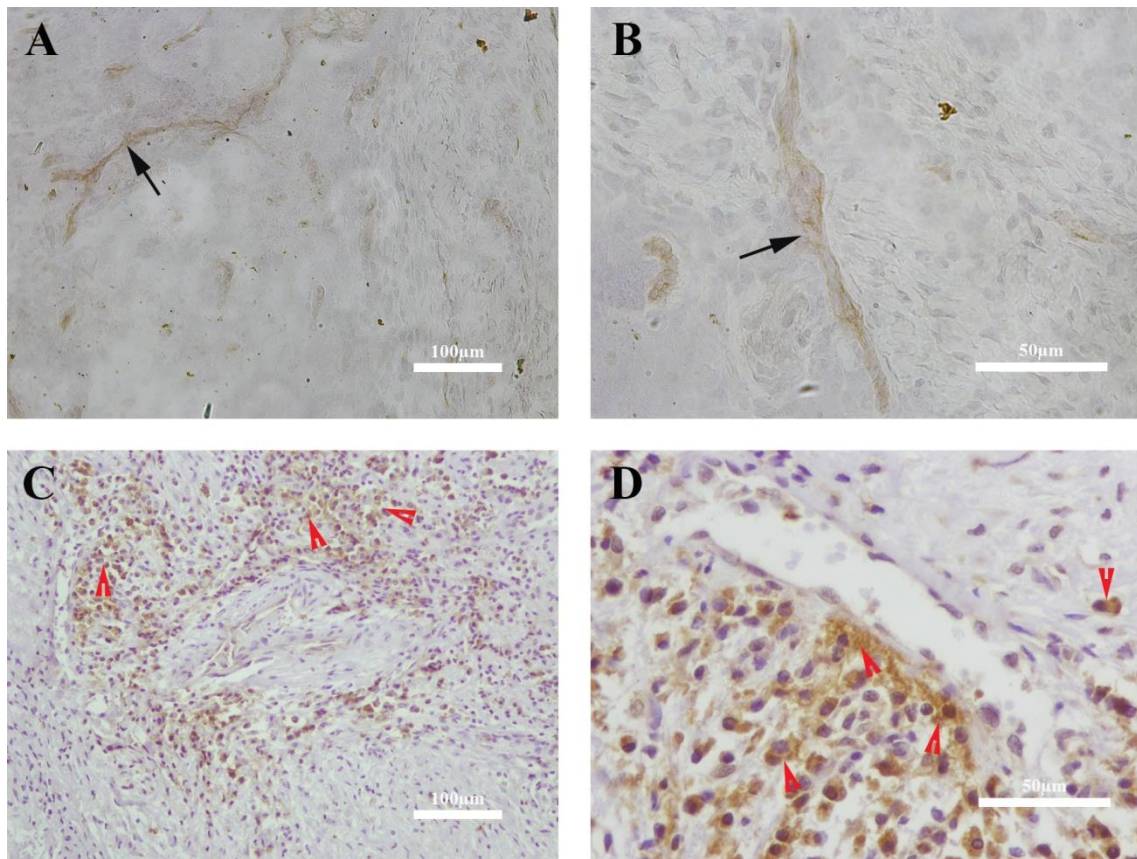
Слика 2. Експресија CD146 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција маркера CD146 детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, црна стрелица приказује CD146⁺ посткапиларне венуле; **C** и **D**, парафински пресеци гранулома, плава стрелица показује CD146⁺ ендотелне ћелије, а црвена стрелица показује CD146⁺ перицит; **A** и **C**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B** и **D**, увећање 40x, даљинар 50µm.



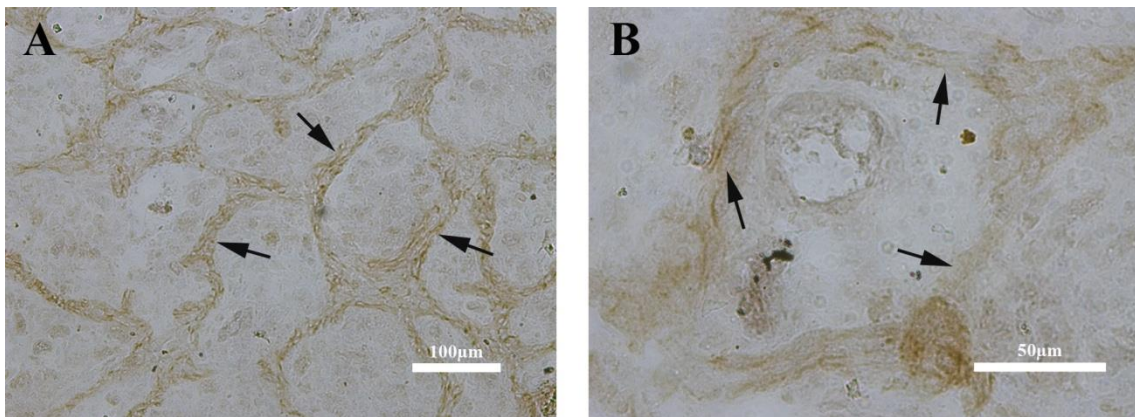
Слика 3. Експресија **CD90** маркера у **PL**. На слици је приказана *in situ* дистрибуција маркера **CD90** детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, црна стрелица показује **CD90⁺** ендотелне ћелије посткапиларних венула, бела стрелица показује **CD90⁺** ендотелне ћелије артериола, плава стрелица показује **CD90⁺** ћелије фибробластидне морфилогије; **C** и **D**, парафински пресеци гранулома, црвена стрелица показује **CD90⁺** ендотелне ћелије капилара; **A** и **C**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B** и **D**, увећање 40x, даљинар 50µm.



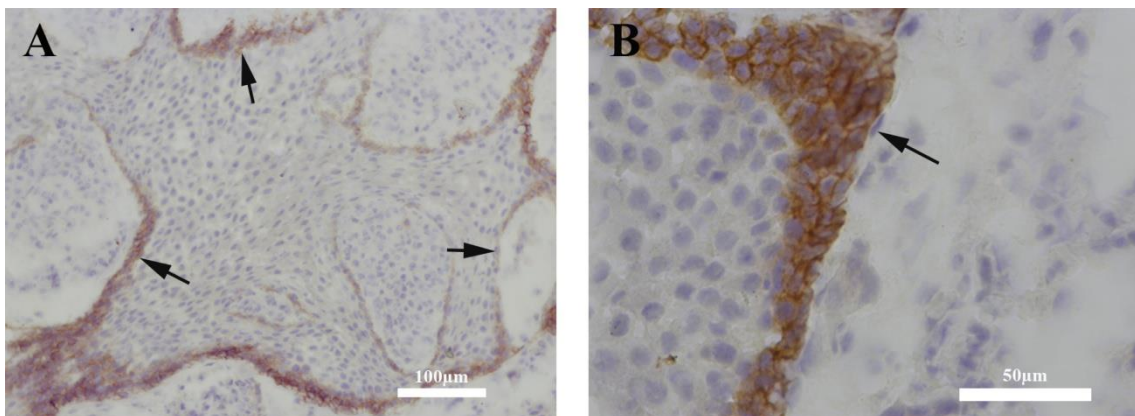
Слика 4. Експресија CD105 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција маркера CD105 детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, црна стрелица показује CD105⁺ ендотелне ћелије артериола а бела стрелица показује CD105⁺ ендотелне ћелије посткапиларних венула; **C** и **D**, парафински пресеци гранулома, црвена стрелица показује CD105⁺ ендотелне ћелије капилара; **A** и **C**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B** и **D**, увећање 40x, даљинар 50µm.



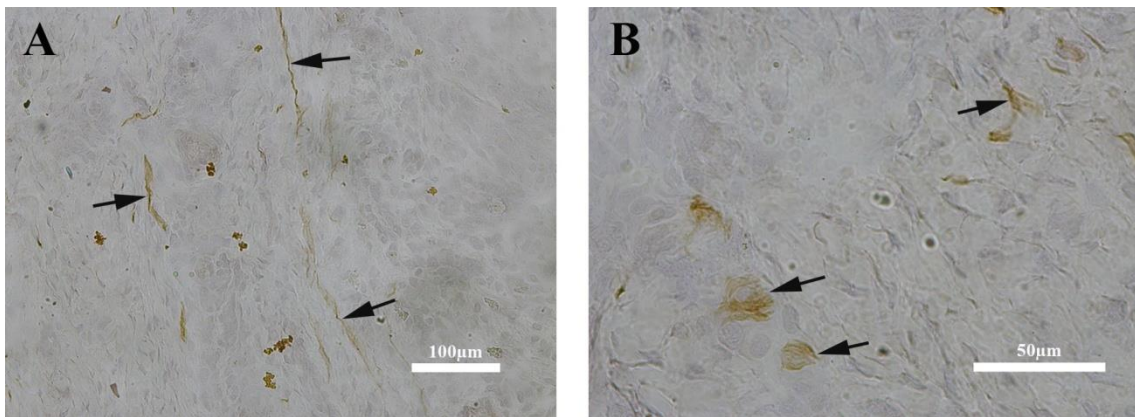
Слика 5. Експресија CD73 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција CD73 маркера детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, црна стрелица показује CD73⁺ ендотелне ћелије посткапиларних венула; **C** и **D**, парафински пресеци гранулома, црвена стрелица показује CD73⁺ инфилтришуће ћелије; **A** и **C**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B** и **D**, увећање 40x, даљинар 50µm.



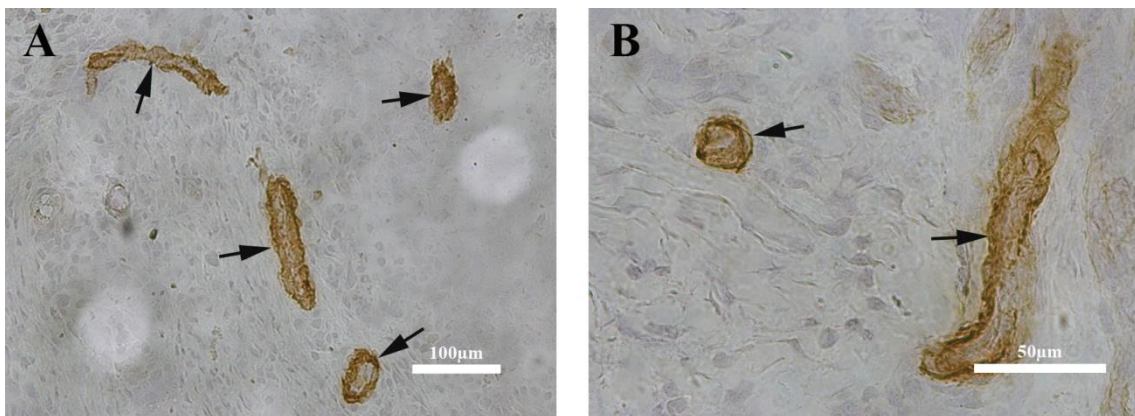
Слика 6. Експресија CD166 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција CD166 маркера детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, стрелица показује CD166⁺ пролиферисане епителне траке; **A**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B**, увећање 40x, даљинар 50µm.



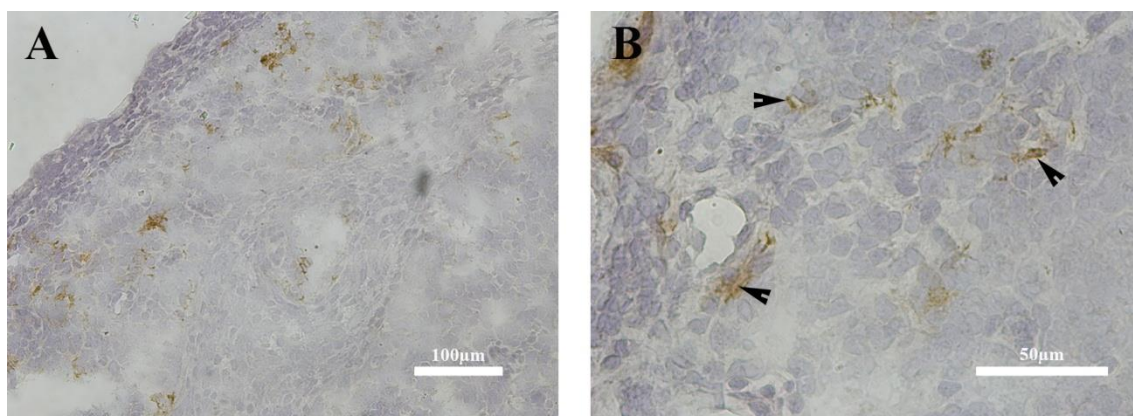
Слика 7. Експресија CD271 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција маркера CD271 детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, стрелица показује CD271⁺ пролиферисане епителне траке; **A**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B**, увећање 40x, даљинар 50µm.



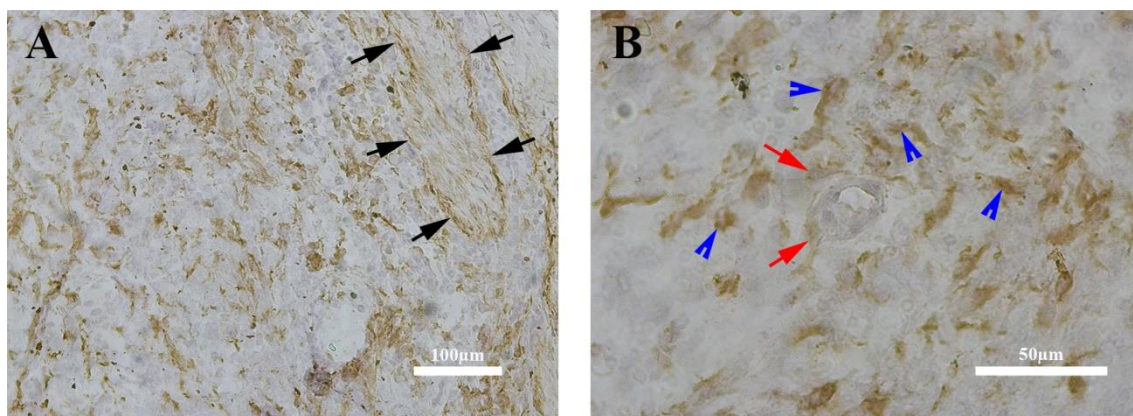
Слика 8. Експресија CD56 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција маркера CD56 детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома; На слици **A** стрелица показује CD56⁺ ендотелне ћелије, увећање 10x, даљинар 100µm; На слици **B** стрелица показује CD56⁺ појединачне ћелије, увећање 40x, даљинар 50µm.



Слика 9. Експресија α-SMA маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција α-SMA маркера детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома, стрелица показује α-SMA⁺ ћелије зидова крвних судова укључујући и периците; **A**, увећање 10x, даљинар 100µm; **B**, увећање 40x, даљинар 50µm.



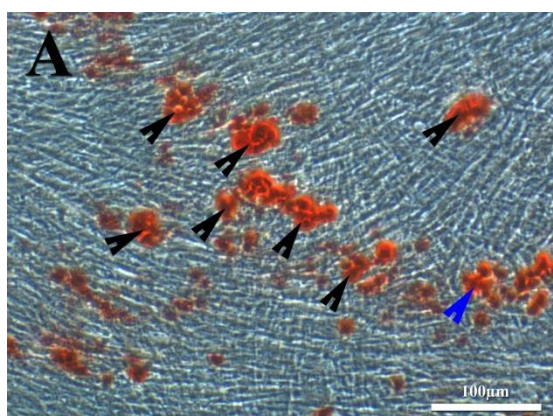
Слика 10. Експресија STRO-1 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција STRO-1 маркера детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије, предоминантно малих крвних судова; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома; **A**, увећање 10x, даљинар 100µm; На слици **B** стрелица показује STRO-1⁺ појединачне ћелије, увећање 40x, даљинар 50µm.



Слика 11. Експресија SSEA4 маркера у PL. На слици је приказана *in situ* дистрибуција SSEA4 маркера детектована имунохистохемијском методом (Px). Браон боја - позитивно пребојене структуре и ћелије, предоминантно малих крвних судова; плава боја – једра ћелија контрастирана са хематоксилином. **A** и **B**, крио-пресеци гранулома; На слици **A** црна стрелица показује SSEA4⁺ пролиферисане епителне траке, увећање 10x, даљинар 100µm; На **B** плава стрелица показује SSEA4⁺ појединачне ћелије, а црвена стрелица показује SSEA4⁺ периците, увећање 40x, даљинар 50µm.

4.4. Диференцијација PL-MSC

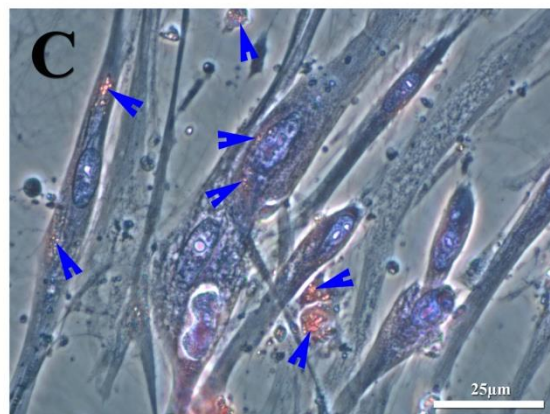
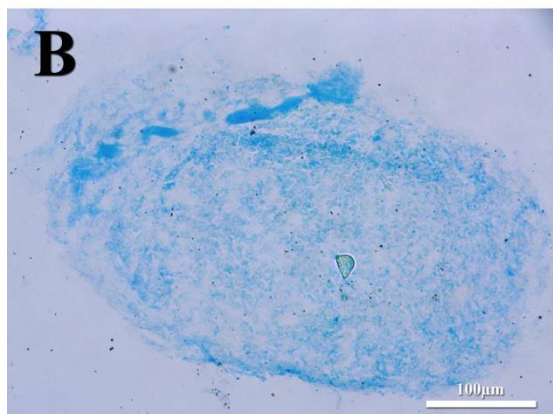
У наредним експериментима тестирали смо способност PL-MSC да се под одређеним условима диференцирају у друге ћелије мезенхимског порекла. У том циљу PL-MSC су гајене у индуктивним медијумима за остеогену, адипогену и хондргену диференцијацију како је описано у поглављу Материјал и методе. Након периода диференцијације, показали смо да се PL-MSC могу диференцирати у све три ћелијске линије, с тим што је потенцијал диференцијације у остеобласте био највећи а потенцијал диференцијације у адипоците најмањи (Слика 12).



А - остеогена диф.

В - хондрогена диф.

С - адипогена диф.



Слика 12. Диференцијација PL-MSC у друге ћелије мезенхимског порекла. На слици **А** приказана је остеогена диференцијација PL-MSC, црна стрелица показује *alizarin red* позитивна минерализована језгра, увећање 10х, даљинар 100µm; На слици **В** приказана је хондрогена диференцијација PL-MSC (пелет), увећање 10х, даљинар 100µm; На слици **С** приказана је адипогена диференцијација PL-MSC, плава стрелица показује *Oil Red O* позитивне адипогене грануле, увећање 40х, даљинар 25µm.

4.5. Продукција цитокина у култури PL-MSC након стимулације са TLR агонистима и коктелом проинфламацијских цитокина

У оквиру истраживања функцијских карактеристика PL-MSC најпре је испитан ефекат агониста TLR (LPS, Poly I:C и Pam3CSK4) који представљају модел за проучавање ефекта бактерија, вируса и њихових токсина у PL. Анализом фенотипа PL-MSC показано је да Pam3CSK4, агонист TLR2, смањује експресију CD166 док друга два молекула, LPS (агонист TLR4) и Poly I:C (агонист TLR3) нису показивали модулацијски ефекат на експресију овог маркера. Сва три TLR агониста су довела до повећања експресије CD73 и IDO-1 молекула на PL-MSC, а нису битније утицали на иначе ниску експресију HLA-DR. Експресија ILT-3 и ILT-4 молекула на контролним PL-MSC је била ниска (<0.1%) и није се мењала под дејством ни једног од испитиваних TLR агониста (резултати нису приказани).

Коктел проинфламацијских цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6 и PGE₂), често коришћени стимулус за матурацију DC и модулацију функције имунских ћелија, је повећао експресију CD73 и IDO-1 а није битније мењао експресију других маркера (Табела 5).

Табела 5. Модулација експресије маркера PL-MSC након третмана са TLR агонистима и коктелом проинфламацијских цитокина

	CD73 (%)	CD166 (%)	HLA-DR (%)	IDO-1 (%)
Контрола	73.2±8.1	71.0±3.5	8.4±2.1	11.0±7.0
LPS	86.7±4.6*	69.9±7.7	9.0±2.1	23.0±2.9*
Poly I:C	89.9±0.3**	74.2±2.8	10.2±0.1	33.2±2.9***
Pam3CSK4	87.5±0.8**	59.2±3.1*	8.7±0.1	28.0±3.6**
Проинфл. коктел	84.6±2.2*	68.1±5.1	10.6±2.0	28.0±9.9**

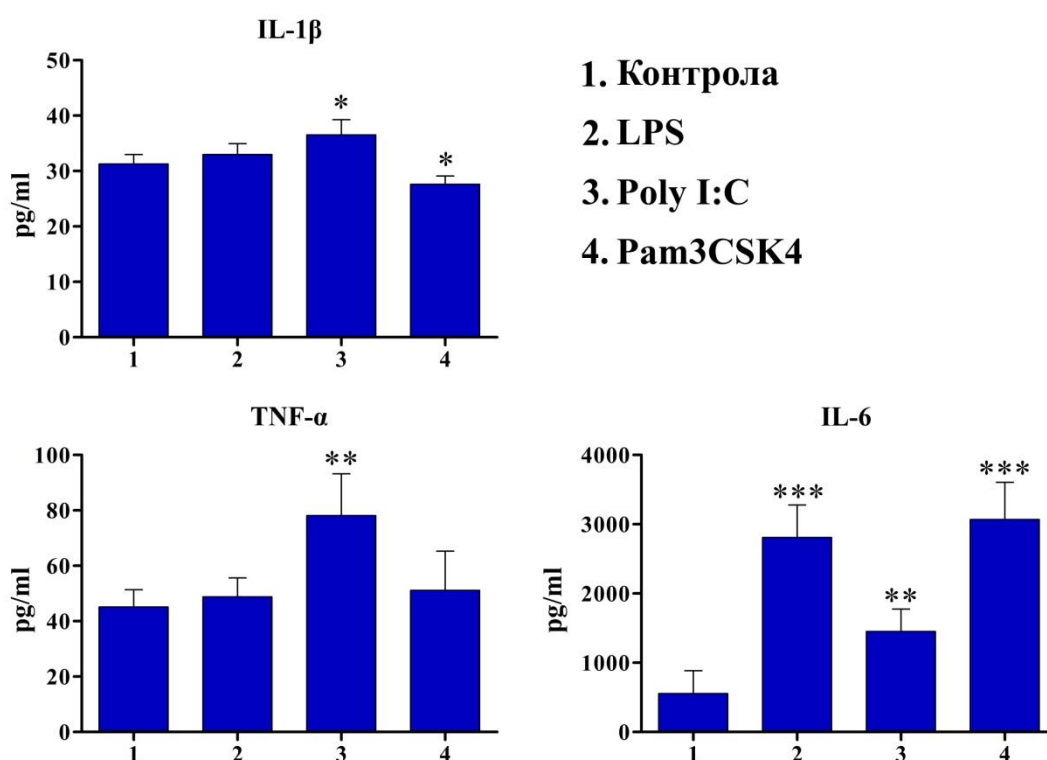
PL-MSC су инкубиране са TLR агонистима или коктелом проинфламацијских цитокина у току 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност процента експресије \pm SD (n=3 различите ћелијске линије). One-way ANOVA *Dunnnett* пост-тест, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 у односу на одговарајуће вредности у контроли.

Анализом продукованих цитокина у култури PL-MSC након третмана са TLR агонистима и коктелом проинфламацијских цитокина нађено је да Poly I:C стимулише продукцију IL-1 β (36.5 ± 2.8 pg/ml) у односу на контролу (31.3 ± 1.7 pg/ml), TNF- α (78.1 ± 15.1 pg/ml) у односу на контролу (45.1 ± 6.2 pg/ml) и IL-6 (1451.0 ± 323.2 pg/ml) у односу на контролу (555.3 ± 330.7 pg/ml). LPS је стимулисао продукцију IL-6 (2806.7 ± 472.4 pg/ml). Pam3CSK4 је стимулисао продукцију IL-6 (3069.8 ± 536.8 pg/ml), а инхибирао продукцију IL- β (27.6 ± 1.5 pg/ml) у односу на одговарајуће контроле (Графикон 2).

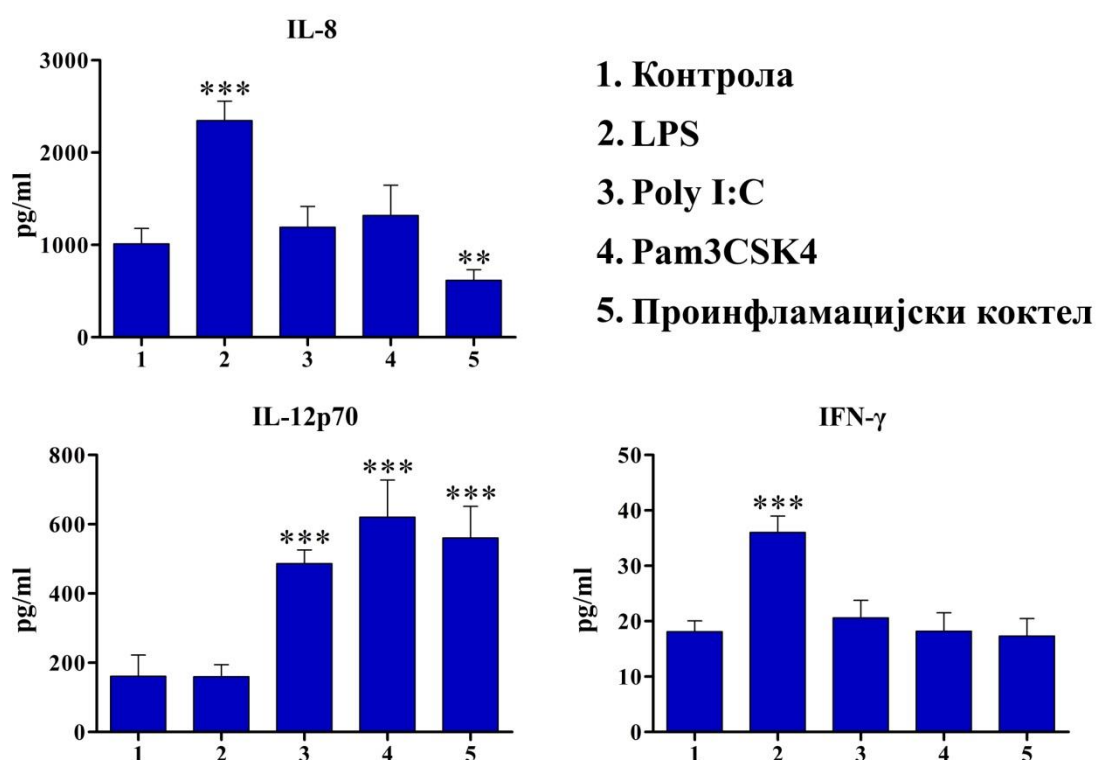
Графикон 3 приказује концентрације IL-8, IL-12p70 и IFN- γ у култури PL-MSC. Уочава се да је LPS повећао ниво IL-8 (2346.8 ± 210.2 pg/ml) у односу на контролу (1011.0 ± 166.9 pg/ml) и IFN- γ (36.0 ± 3.0 pg/ml) у односу на контролу (18.1 ± 2.0 pg/ml), а коктел проинфламацијских цитокина је смањио продукцију IL-8 (615.1 ± 115.4 pg/ml) у односу на контролу. Ниво IL-12p70 је био повећан под утицајем Poly I:C (486.0 ± 39.9 pg/ml), Pam3CSK4 (620.2 ± 107.6 pg/ml) и коктела проинфламацијских цитокина (560.6 ± 90.9 pg/ml) у односу на контролу (161.0 ± 61.3 pg/ml). Остали примењени третмани нису битније утицали на испитиване цитокине.

Анализом Th2 цитокина уочава се да је коктел проинфламацијских цитокина стимулисао продукцију IL-4 (11.3 ± 1.6 pg/ml) у односу на контролу (6.5 ± 0.9 pg/ml) и IL-5 (72.9 ± 11.9 pg/ml) у односу на контролу (39.2 ± 4.1 pg/ml), док агонисти TLR нису испољавали битнији модулацијски ефекат (Графикон 4).

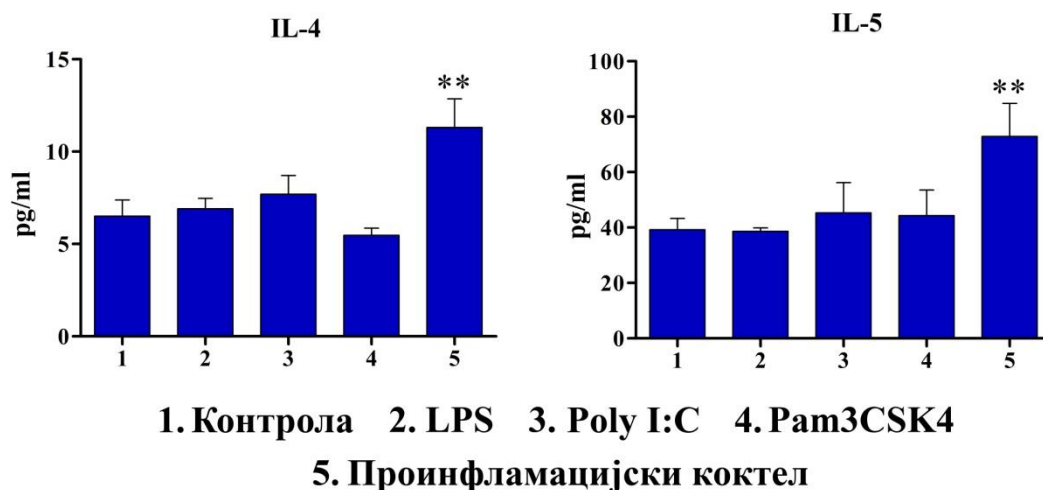
Резултати квантификације имунорегулацијских цитокина (IL-10 и TGF- β), као и IL-27 су приказани на графикону 5. Уочава се да LPS није мењао продукцију ни једног од испитиваних цитокина од стране PL-MSC. Poly I:C је стимулисао продукцију IL-10 (59.9 ± 5.6 pg/ml) у односу на контролу (38.5 ± 2.9 pg/ml) и IL-27 (151.0 ± 31.0 pg/ml) у односу на контролу (83.8 ± 17.2 pg/ml) док је Pam3CSK4 инхибирао продукцију IL-27 (52.0 ± 8.4 pg/ml) у односу на контролу (83.8 ± 17.2 pg/ml) и TGF- β . (65.0 ± 14.0 pg/ml), у односу на контролу (104.5 ± 18.8 pg/ml). Проинфламацијски коктел је инхибирао продукцију TGF- β (58.3 ± 24.7 pg/ml), а није модулисао ниво остала два цитокина у култури PL-MSC.



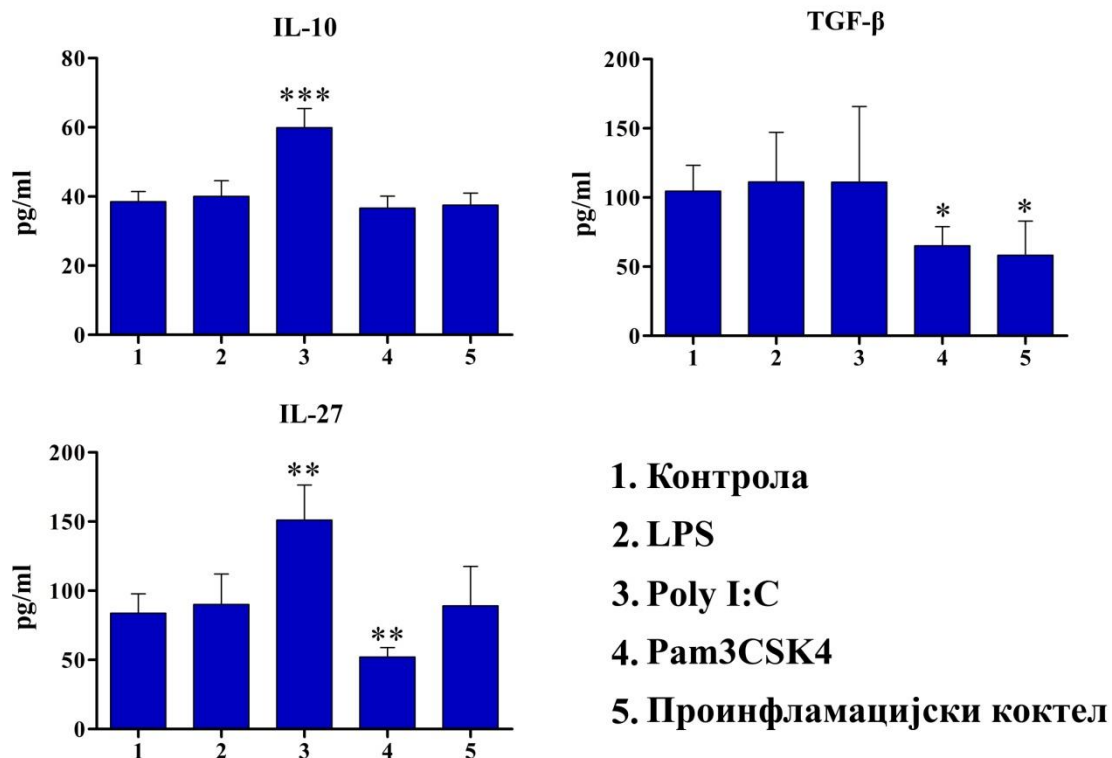
Графикон 2. Продукција IL-1 β , TNF- α и IL-6 у култури PL-MSC након третмана са TLR агонистима. PL-MSC су третиране са TLR агонистима у току 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина у култури PL-MSC изражена у pg/ml културе \pm SD (n=3). (1) ниво цитокина у култури нестимулисаних PL-MSC (контрола), (2) третман са LPS, (3) третман са Poly I:C, (4) третман са Pam3CSK4. One-way ANOVA *Dunnnett* пост-тест, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 у односу на одговарајуће вредности у контроли.



Графикон 3. Продукција IL-8, IL-12p70 и IFN-γ у култури PL-MSC након третмана са TLR агонистима или коктелом проинфламацијских цитокина. PL-MSC су третиране са TLR агонистима у току 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина у култури PL-MSC изражена у pg/ml културе \pm SD (n=3). (1) ниво цитокина у култури нестимулисаних PL-MSC (контрола), (2) третман са LPS, (3) третман са Poly I:C, (4) третман са Pam3CSK4, (5) третман са коктелом проинфламацијских цитокина. One-way ANOVA *Dunnnett* пост-тест, **p<0.01; ***p<0.001 у односу на одговарајуће вредности у контроли.



Графикон 4. Продукција IL-4 и IL-5 у култури PL-MSC након третмана са TLR агонистима или коктелом проинфламацијских цитокина. PL-MSC су третиране са TLR агонистима у току 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина у култури PL-MSC изражена у pg/ml културе \pm SD ($n=3$). (1) ниво цитокина у култури нестимулисаних PL-MSC (контрола), (2) третман са LPS, (3) третман са Poly I:C, (4) третман са Pam3CSK4, (5) третман са коктелом проинфламацијских цитокина. One-way ANOVA *Dunnnett* пост-тест, ** $p<0.01$; у односу на одговарајуће вредности у контроли.



Графикон 5. Продукција IL-10, TGF-β и IL-27 у култури PL-MSC након третмана са TLR агонистима или коктелом проинфламацијских цитокина. PL-MSC су третиране са TLR агонистима у току 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина у култури PL-MSC изражена у pg/ml културе \pm SD (n=3). (1) ниво цитокина у култури нестимулисаних PL-MSC (контрола), (2) третман са LPS, (3) третман са Poly I:C, (4) третман са Pam3CSK4 (5) третман са коктелом проинфламацијских цитокина. One-way ANOVA *Dunnnett* пост-тест, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ у односу на одговарајуће вредности у контроли.

Део II. Интеракција PL-MSC и локалних имунских ћелија

4.6. Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране PL-IC

Други део истраживања се односио на интеракцију PL-MSC и локалних имунских ћелија из PL. У том циљу нова PL-MSC ћелијска линија, која је изолована из асимптоматске лезије, је култивисана са укупним инфламацијским ћелијама (IC) из PL. Одабране су IC из асимптоматских лезија због преминације антиинфламацијских медијатора и имунорегулацијских цитокина у овим PL. У ко-култури је одређиван само ниво имунорегулацијских цитокина јер је продукција проинфламацијских цитокина рађена у оквиру наших претходних испитивања (Ђокић *и сар.* 2012).

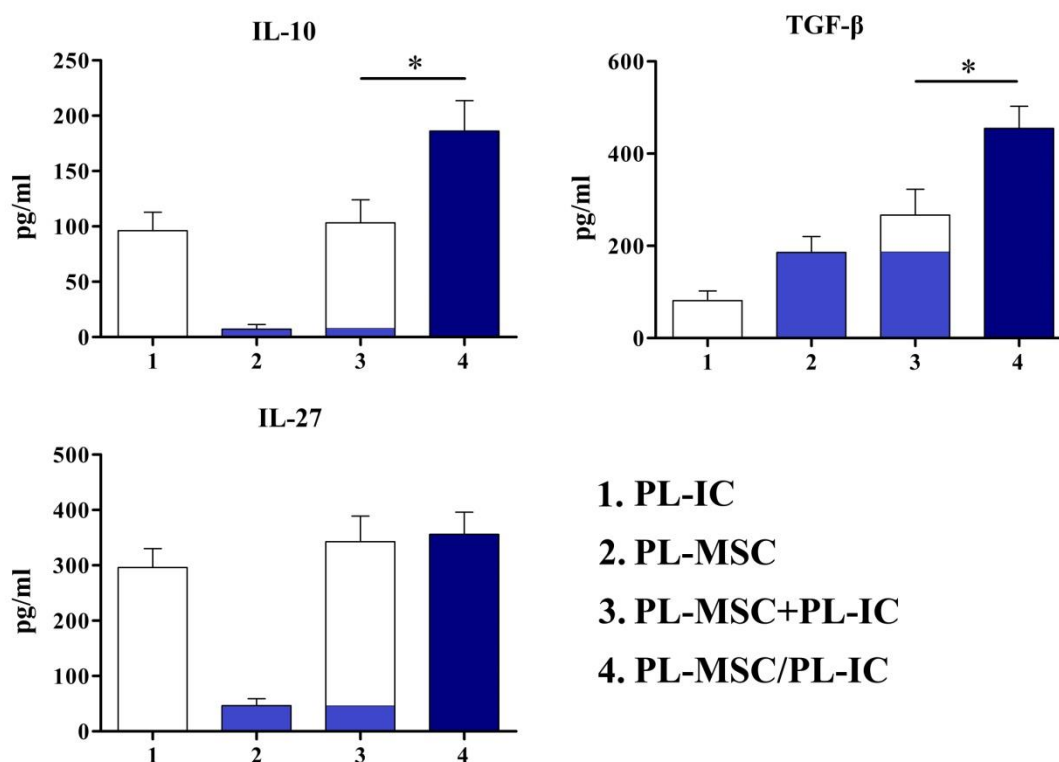
Анализом цитоспин препарата PL-IC, показано је да од свих субпопулација IC највећи удео отпада на лимфоците (Ly) $38.1 \pm 10.1\%$, затим следе неутрофили $29.4 \pm 6.2\%$, MØ $20.5 \pm 4.7\%$ и плазма ћелије (PC) $10.2 \pm 2.9\%$. Остале, ћелије атипичне морфологије и ћелије у апоптози су чиниле $1.8 \pm 1.0\%$ од укупних PL-IC (Табела 6).

Табела 6. Ћелијски састав укупних инфламацијских ћелија изолованих из периапексних лезија (PL-IC)

Ћелије	(%) \pm SD
Неутрофилни гранулоцити	29.4 ± 6.2
Макрофаги	20.5 ± 4.7
Лимфоцити	38.1 ± 10.1
Плазма ћелије	10.2 ± 2.9
Остале ћелије	1.8 ± 1.0

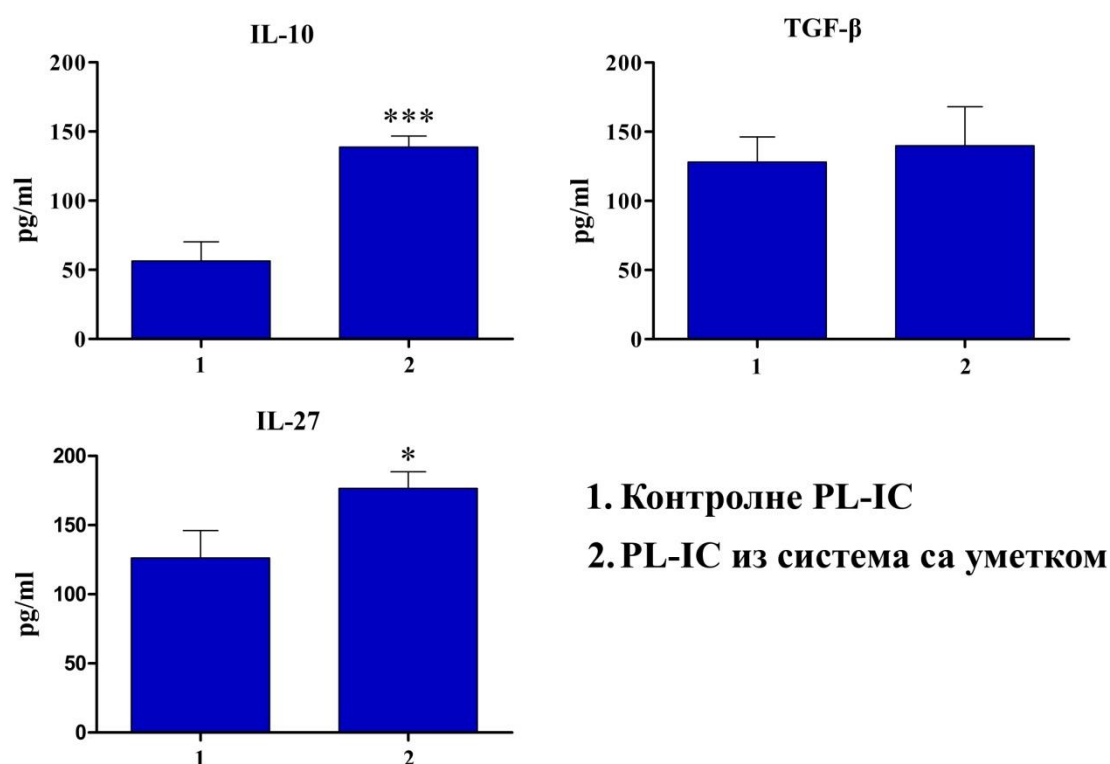
PL-IC су изоловане из 4 различите асимптоматске PL, како је описано у поглављу Материјал и методе. Припремљени су цитоспинови и анализирани на светлосном микроскопу. Приказане су средње вредности % појединих типова ћелија \pm SD (n=4).

PL-IC од 4 различита донора култивисане су са PL-MSC у току 24 сата у присуству PMA и Ca²⁺ јонофора, у циљу додатне стимулације продукције цитокина. Резултати показују да су PL-IC продуковале значајне концентрације IL-10 (96.2±16.6 pg/ml), IL-27 (296.1±34.2 pg/ml) и TGF-β (81.1±21.4 pg/ml), док је у култури PL-MSC продукција IL-27 била ниска (46.6±12.2 pg/ml), а вредности за TGF-β су били два пута већи (185.8±34.5 pg/ml) у односу на културу PL-IC. Са друге стране, продукција IL-10 у култури PL-MSC је била на граници детекције (7.1±4.2 pg/ml). Ниво продукције IL-10 (186.2±27.4 pg/ml) и TGF-β (454.9±48.0 pg/ml) у ко-култури био је значајно већи у односу на збир ових цитокина у појединачним културама PL-IC и PL-MSC (IL-10: 103.3±20.8 pg/ml; TGF-β: 266.8±55.9 pg/ml). Међутим, није постојала статистички значајна разлика у продукцији IL-27 у ко-култури у односу на контролне групе (Графикон 6).



Графикон 6. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-10, IL-27 и TGF-β од стране PL-IC у култури са директним контактом. Графикон приказује концентрације цитокина у супернатантима 24h култура PL-IC (1) и PL-MSC (2), и ко-култури ових ћелија (4). PL-MSC+PL-IC (контрола) је збир појединачно продукованих цитокина (3). Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml ± SD (n=4). Student t-тест, *p<0.05 у односу на контролу.

Како би проверили да ли је за овакву продукцију цитокина искључиво одговоран директан контакт између ћелија, постављене су ко-културе ћелија са уметком у којима смо посматрали како се мења цитокински профил, где је директан контакт између ћелија спречен. Резултати показују да у овом случају PL-IC у ко-култури са PL-MSC продукују статистички значајно веће концентрације IL-10 (138.7 ± 8.1 pg/ml) и IL-27 (176.6 ± 11.9 pg/ml), у односу на контролне PL-IC (56.4 ± 13.8 pg/ml за IL-10 и 126.2 ± 19.9 pg/ml за IL-27). С друге стране, није постојала разлика у продукцији TGF- β у ко-култури у односу на контролу (Графикон 7).



Графикон 7. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-10, IL-27 и TGF- β од стране PL-IC у систему са уметком („transwell“ систем). Контролне и PL-IC из система са уметком су након сакупљања супернатаната третиране са PMA/Ca²⁺ јонофором у току наредна 24 сата. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=4). Student t-тест, *p<0.05; *p<0.001 у односу на контролне PL-IC.**

4.7. Ефекат PL-MSC на продукцију цитокина од стране PL-MNC

У наредним експериментима детаљније смо испитивали како PL-MSC модулирају продукцију цитокина од стране PL-MNC у ко-култури. За ово испитивање користили смо 8 донора MNC, 4 симптоматских (sy) и 4 асимптоматских (as)PL. Анализом ћелијског састава оба типа PL, показали смо да је проценат гранулоцита био значајно већи а проценат LY значајно мањи у syPL у односу на asPL (Табела 7). Након одвајања гранулоцита од осталих инфламацијских ћелија PL, није било разлике у заступљености осталих ћелијских типова унутар обе групе asPL-MNC и syPL-MNC. Ћелијски састав PL-MNC су преобладајуће чинили LY, затим PC, MØ и DC (Табела 8).

Табела 7. Ћелијски састав тоталних инфламацијских ћелија изолованих из хуманих периапексних лезија

Тип ћелија	asPL-IC (%)	syPL-IC (%)
GR	14.2±5.3	47.6±8.7***
LY	46.5±10.8	22.5±6.9**
PC	19.3±8.1	10.4±3.2
MØ	15.9±3.4	11.3±3.1
DC	2.6±1.3	2.2±0.6
Остале ћелије	3.1±3.1	6.0±3.3

Инфламацијске ћелије су изоловане из асимптоматских (n=4) и симптоматских (n=4) периапексних лезија, као што је описано у Материјалу и методама. Направљени су цитоспинови и анализирани на светлосном микроскопу. Процент појединачних популација ћелија је одређен на основу морфолошких критеријума (бројано је укупно 500 ћелија по цитоспину). Резултати су приказани као средња вредност процента ± SD (n=4). PL-IC, укупне инфламацијске ћелије из периапексних лезија; GR, гранулоцити; LY, лимфоцити; PC, плазма ћелије; MØ, макрофаги; DC, дендритске ћелије; as – асимптоматске; sy – симптоматске, *Student t*-тест, **p<0.01, ***p<0.001 у односу на контролу.

Табела 8. Ћелијски састав мононуклеарних ћелија изолованих из хуманих периапексних лезија

Тип ћелија	asPL-MNC (%)	syPL-MNC (%)
GR	3.1±1.3	1.7±1.2
LY	43.3±8.1	48.8±9.3
PC	21.4±9.1	21.2±6.7
MØ	23.8±3.9	21.2±3.5
DC	4.5±0.8	3.5±1.6
Остале ћелије	4.0±2.7	3.7±2.7

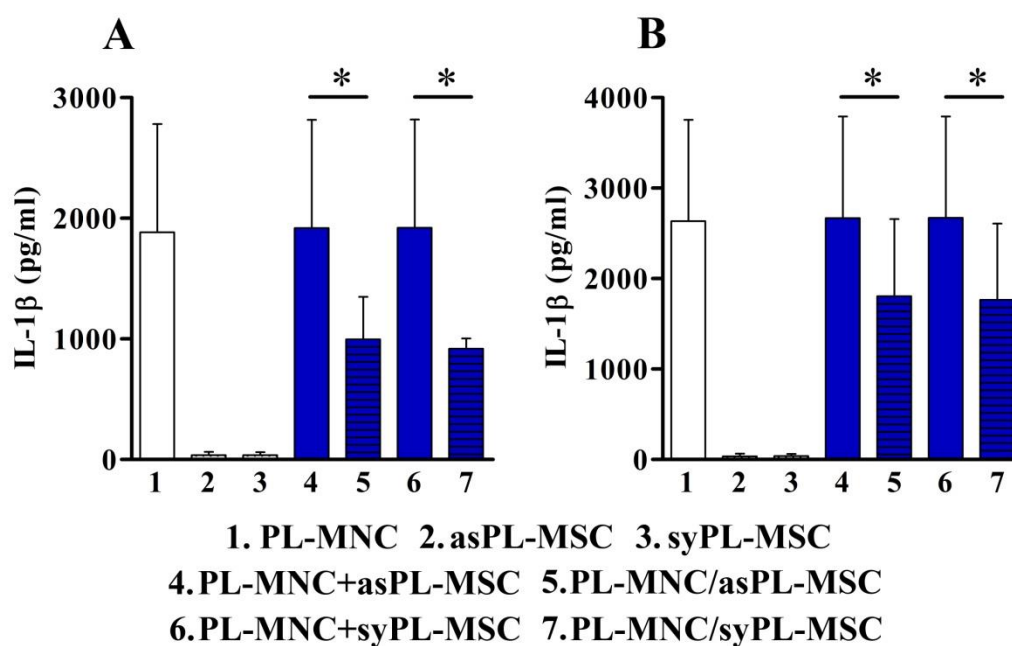
PL-MNC су припремљене из укупних инфламацијских ћелија изолованих из асимптоматских (n=4) и симптоматских (n=4) периапексних лезија, као што је и описано у поглављу Материјал и методе. Цитоспинови су обојени методом May-Grünwald Giemsa и анализирани на светлосном микроскопу. Процент појединачних популација ћелија је одређен на основу морфолошких критеријума (бројано је укупно 500 ћелија по цитоспину). Резултати су приказани као средња вредност процента ± SD (n=4). PL-IC, укупне инфламацијске ћелије из периапексних лезија; GR, гранулоцити; LY, лимфоцити; PC, плазма ћелије; MØ, макрофаги; DC, дендритске ћелије; as – асимптоматске; sy - симпроматске лезије. *Student t*-тест, p>0.05.

Анализа продукције цитокина у ко-култури показала је да су продуковани цитокини потичу од PL-MNC, али занемарљивог порекла од PL-MSC. Интересантно је да су PL-MSC испољавале сличан ефекат независно да ли су успостављене из as- или syPL, али да је одговор PL-MNC био различит.

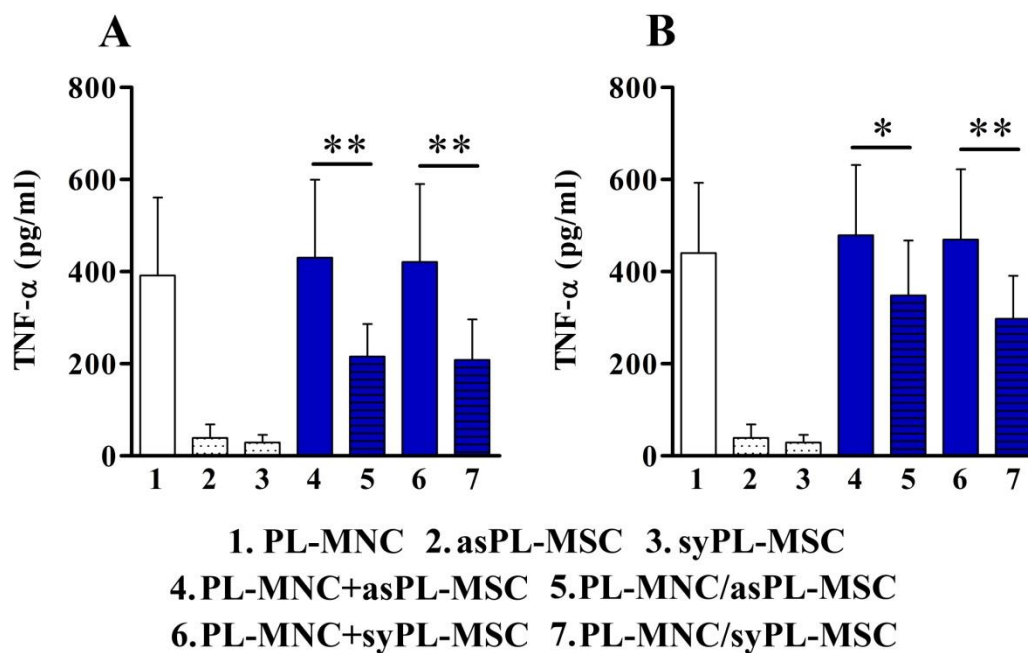
Асимптоматске PL-MSC су инхибирале продукцију проинфламацијских цитокина од стране како asPL-MNC тако и syPL-MNC у односу на одговарајуће контроле (збир цитокина у појединачним културама). Ниво IL-1 β у ко-култури asPL-MSC и asPL-MNC је износио 995.3 \pm 353.6pg/ml, а у контроли је износио 1919.8 \pm 897.4pg/ml. Ниво IL-1 β у ко-култури asPL-MSC и syPL-MNC је износио 1804.8 \pm 853.1pg/ml, а у контроли је износио 2669.8 \pm 1122.2pg/ml. Ниво TNF- α у ко-култури asPL-MSC и asPL-MNC је био 215.5 \pm 70.8pg/ml, а у контроли 430.5 \pm 169.4pg/ml. Ниво TNF- α у ко-култури asPL-MSC и syPL-MNC је износио 348.3 \pm 119.2pg/ml, а у контроли 497.0 \pm 152.5pg/ml.

Симптоматске PL-MSC су такође инхибирале продукцију оба проинфламацијска цитокина од стране како asPL-MNC тако и syPL-MNC у односу на одговарајуће контроле. Ниво IL-1 β у ко-култури syPL-MSC и asPL-MNC је износио 919.5 \pm 83.9pg/ml, а у контроли је износио 1920.8 \pm 897.4pg/ml. Ниво IL-1 β у ко-култури syPL-MSC и syPL-MNC је износио 1756.8 \pm 842.0pg/ml, а у контроли је био 2670.8 \pm 1122.2pg/ml. Концентрација TNF- α у ко-култури syPL-MSC и asPL-MNC је износила 208.3 \pm 88.2pg/ml, а у контроли 421.0 \pm 169.4pg/ml. Ниво TNF- α у ко-култури syPL-MSC и syPL-MNC је износио 297.5 \pm 93.4pg/ml, а у контроли 469.5 \pm 152.5pg/ml. Збирно, ови резултати показују да је супресија продукције цитокина била израженија у ко-култури PL-MSC и asPL-MNC (Графикон 8 и Графикон 9).

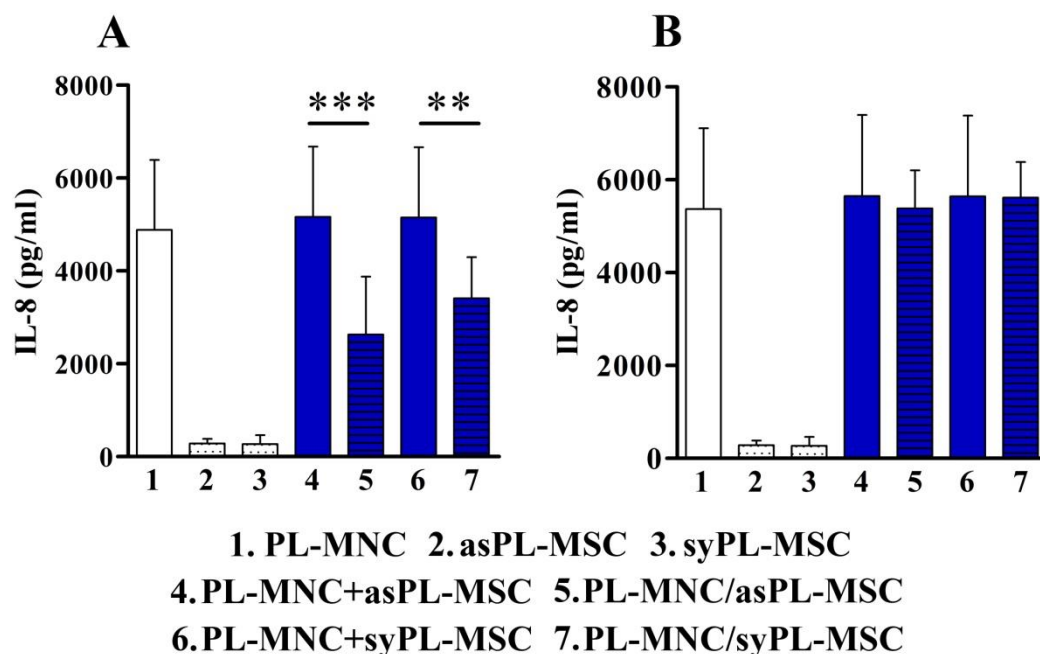
За разлику од ових налаза, продукција IL-8 је била статистички значајно снижена једино у ко-култури asPL-MSC са asPL-MNC (ко-култура: 2630.0 \pm 1250.0pg/ml; контрола: 5164.5 \pm 1511.9pg/ml) и у ко-култури syPL-MSC са asPL-MNC (ко-култура: 3412.0 \pm 887.6pg/ml; 5152.5 \pm 1511.9pg/ml) (Графикон 10).



Графикон 8. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-1β од стране PL-MNC у ко-култури. PL-MSC су ко-култивисане са PL-MNC (n=4), 48 сати у ко-култури са директним контактом у односу 1:10 (PL-MSC:PL-MNC). **PL-MSC+PL-MNC**, збир појединачно продуктованих цитокина у културама PL-MSC и PL-MNC (контрола). **PL-MSC/PL-MNC**, продукција цитокина у ко-културама. **А)** Ко-култура PL-MSC и asPL-MNC и **Б)** Ко-култура PL-MSC и syPL-MNC. Резултати су приказани као средња вредност продукције IL-1β изражена у pg/ml ± SD (n=4). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, *p<0.05 у односу на контролу. sy – симптоматске; as – асимптоматске.

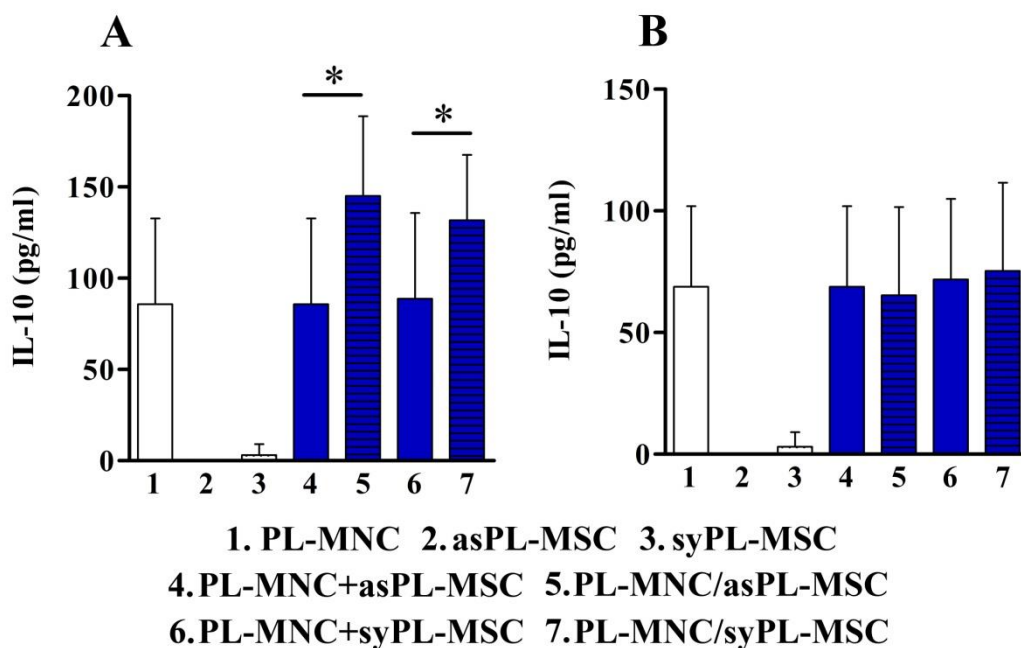


Графикон 9. Ефекат PL-MSC на продукцију TNF- α од стране PL-MNC у ко-култури. PL-MSC су ко-култивисане са PL-MNC ($n=4$), 48 сати у ко-култури са директним контактом у односу 1:10 (PL-MSC:PL-MNC). **PL-MSC+PL-MNC**, збир појединачно продуктованих цитокина у културама PL-MSC и PL-MNC (контрола). **PL-MSC/PL-MNC**, продукција цитокина у ко-културама. **А)** Ко-култура PL-MSC и asPL-MNC и **Б)** Ко-култура PL-MSC и syPL-MNC. Резултати су приказани као средња вредност продукције TNF- α изражена у pg/ml \pm SD ($n=4$). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ у односу на контролу. sy – симптоматске; as – асимптоматске.

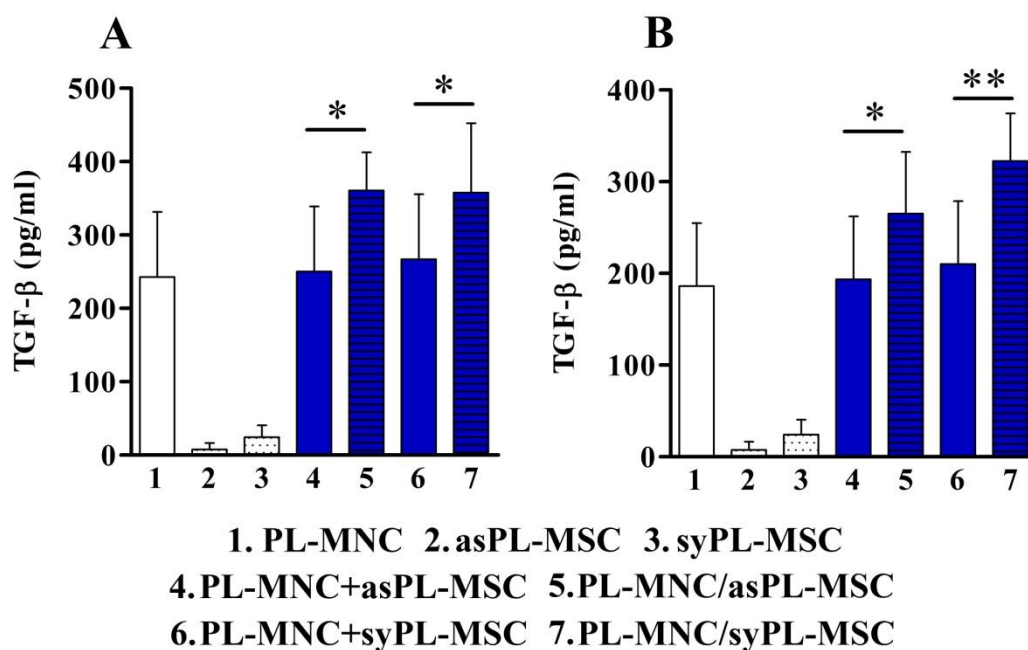


Графикон 10. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-8 од стране PL-MNC у ко-култури. PL-MSC су ко-култивисане са PL-MNC (n=4), 48 сати у ко-култури са директним контактом у односу 1:10 (PL-MSC:PL-MNC). **PL-MSC+PL-MNC**, збир појединачно продуктованих цитокина у културама PL-MSC и PL-MNC (контрола). **PL-MSC/PL-MNC**, продукција цитокина у ко-културама. **А)** Ко-култура PL-MSC и asPL-MNC и **Б)** Ко-култура PL-MSC и syPL-MNC. Резултати су приказани као средња вредност продукције IL-8 изражена у pg/ml \pm SD (n=4). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, **p<0.01, ***p<0.001 у односу на контролу. sy – симптоматске; as – асимптоматске.

Када су у питању имунорегулацијски цитокини, asPL-MSC су довеле до повећања продукције IL-10 (ко-култура: 145.0±43.7pg/ml; контрола 85.8±47.1pg/ml) и TGF-β (ко-култура: 360.8±51.9pg/ml; контрола: 250.3±88.5pg/ml) од стране asPL-MNC. Симптоматске PL-MSC су такође довеле до повећања продукције IL-10 (ко-култура: 131.8±35.8pg/ml; контрола: 88.8±47.1pg/ml) и TGF-β (ко-култура: 357.8±94.5pg/ml; контрола: 267.0±88.5pg/ml) од стране asPL-MNC, док су asPL-MSC довеле једино до повећања продукције TGF-β од стране syPL-MNC (ко-култура: 265.3±67.1pg/ml; контрола: 193.5±68.7pg/ml), а syPL-MSC једино до повећања продукције TGF-β од стране syPL-MNC (ко-култура: 322.5±51.9pg/ml; контрола: 210.3±68.7pg/ml). Међутим, ниво IL-10 у ко-култури PL-MSC са syPL-MNC није био статистички значајно промењен у односу на контролу (Графикон 11 и Графикон 12).



Графикон 11. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-10 од стране PL-MNC у ко-култури. PL-MSC су ко-култивисане са PL-MNC (n=4), 48 сати у ко-култури са директним контактом у односу 1:10 (PL-MSC:PL-MNC). **PL-MSC+PL-MNC**, збир појединачно продукованих цитокина у културама PL-MSC и PL-MNC (контрола). **PL-MSC/PL-MNC**, продукција цитокина у ко-културама. **А)** Ко-култура PL-MSC и asPL-MNC и **Б)** Ко-култура PL-MSC и syPL-MNC. Резултати су приказани као средња вредност продукције IL-10 у pg/ml ± SD (n=4). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, *p<0.05 у односу на контролу. sy – симптоматске; as – асимптоматске.



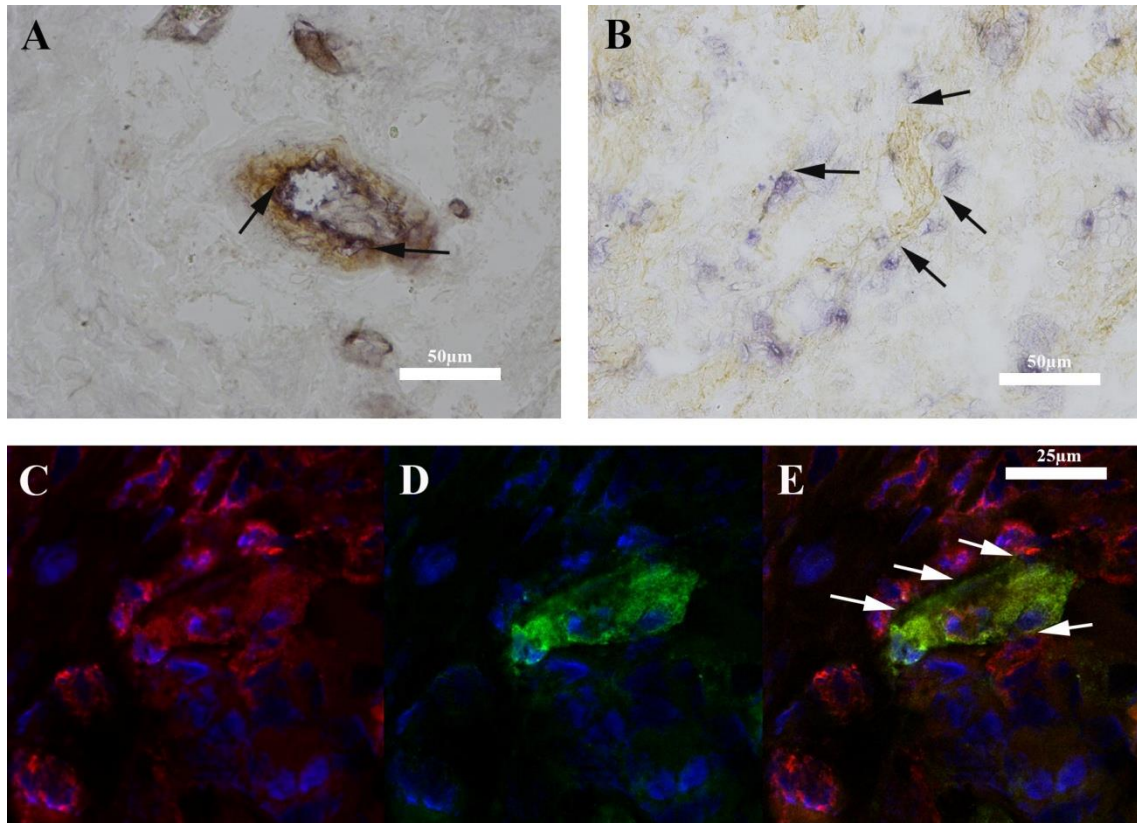
Графикон 12. Ефекат PL-MSC на продукцију TGF-β од стране PL-MNC у ко-култури. PL-MSC су ко-култивисане са PL-MNC (n=4), 48 сати у ко-култури са директним контактом у односу 1:10 (PL-MSC:PL-MNC). **PL-MSC+PL-MNC**, збир појединачно продукованих цитокина у културама PL-MSC и PL-MNC (контрола). **PL-MSC/PL-MNC**, продукција цитокина у ко-културама. **А)** Ко-култура PL-MSC и asPL-MNC и **Б)** Ко-култура PL-MSC и syPL-MNC. Резултати су приказани као средња вредност продукције TGF-β изражена у pg/ml ± SD (n=4). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, *p<0.05, **p<0.01 у односу на контролу. sy – симптоматске; as – асимптоматске.

Део III. Интеракција PL-MSC и фагоцита

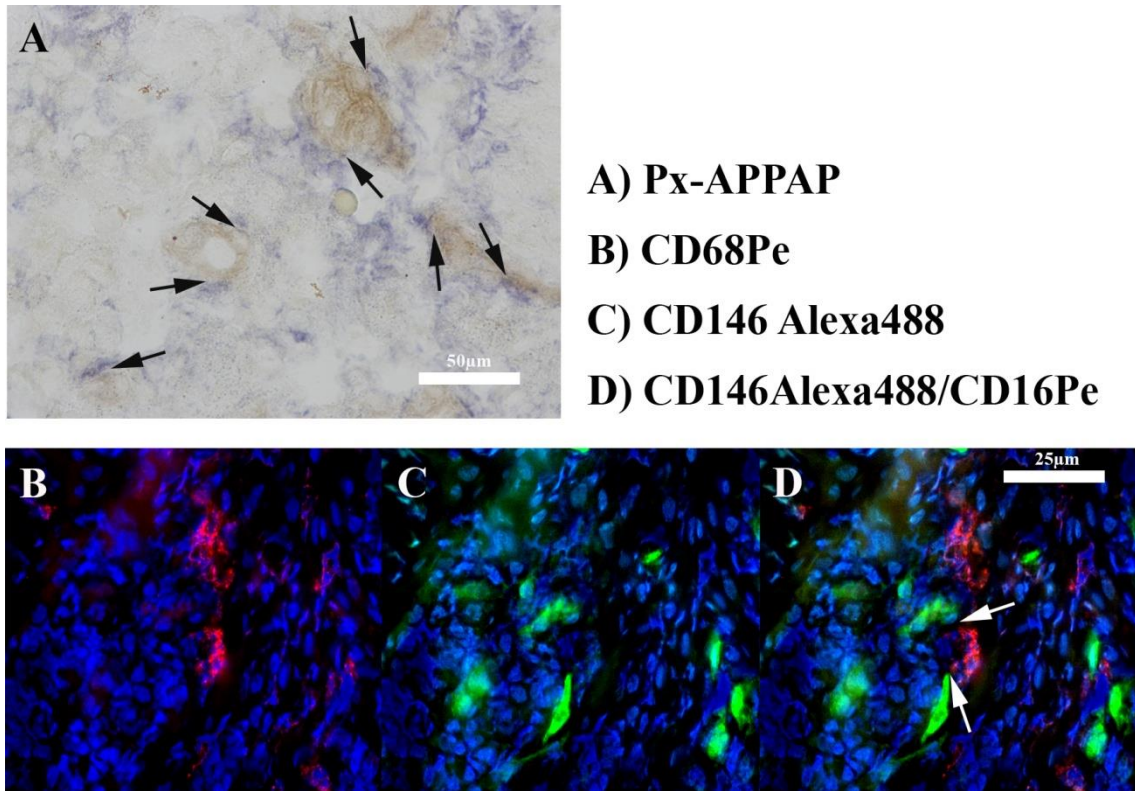
4.8. Колокализација PL-MSC и фагоцита *in situ*

Трећи, кључни део овог пројекта се односио на интеракцију PL-MSC и фагоцита (гранулоцита и MØ). За испитивање је одабран *in vitro* модел. Међутим, пре експеримената у култури, у којима су ћелије култивисане у блиском контакту, било је неопходно да се провери да ли постоје блиски контакти MSC и фагоцита *in situ*. Одговори на ова питања су дати на основу анализе међусобне ко-локализације испитиваних ћелија на криостатским пресецима ткива PL.

У циљу одређивања међусобне колокализације PL-MSC и фагоцита (неутрофилних гранулоцита и MØ) *in situ*, направљени су криопресеци периапексног гранулома, на којима је рађено двоструко имунохистохемијско бојење методом Рх и АРААР. За идентификацију PL-MSC (перицита) коришћено је anti-CD146 mAb. Неутрофилни гранулоцити маркирани су са anti-MPO mAb или anti-CD16 mAb, а за идентификацију MØ коришћено је anti-CD68 mAb. Осим ових метода, колокализација PL-MSC и фагоцита испитивана је и помоћу конфокалног микроскопа при чему је за обележавање PL-MSC коришћено anti-CD146 mAb коњуговано са флуорохромом *Alexa 488*, а за фагоците anti-CD16 (неутрофилни гранулоцити) и anti-CD68 (MØ). Препарати за анализу на конфокалном микроскопу су контрастирани са SYTO59, који боји једра ћелија, чиме је омогућена боља визуелизација. Анализом резултата (слике светлосне и конфокалне микроскопије) показно је да CD146⁺ PL-MSC (перицити), остварују блиске контакте са фагоцитима *in situ* (Слика 13 и Слика 14).



Слика 13. Колокализација PL-MSC и неутрофилних гранулоцита. **А)** Слика приказује колокализацију PL-MSC (CD146-APPAP, плава боја) и неутрофилних гранулоцита (MPO-Px, браон боја), контакт – црна стрелица; **В)** Слика приказује колокализацију PL-MSC (CD146-Px, браон боја) и неутрофилних гранулоцита (CD16-APPAP, плава боја), контакт – црна стрелица; **С)** Слика приказује експресију CD16 (Pe, црвена боја) у PL; **Д)** Слика приказује експресију CD146 (Alexa 488, зелена боја) у PL; **Е)** Слика приказује колокализацију PL-MSC и неутрофила *in situ*, контакт – бела стрелица. Сlike **А** и **В** су сликане на светлосном микроскопу, даљинар 50μm; **С**, **Д** и **Е** сlike су добијене на конфокалном микроскопу, даљинар 25μm. Плавом бојом (SYTO59) су означена једра на сликaма **С**, **Д** и **Е**.



Слика 14. Колокализација PL-MSC и МØ. **A)** Слика приказује колокализацију PL-MSC (CD146-Px, браон боја) и МØ (CD68-APPAP, плава боја), контакт - црна стрелица; **B)** Слика приказује експресију CD68 (Pe, црвена боја) у PL; **C)** Слика приказује експресију CD146 (Alexa 488, зелена боја) у PL; **D)** Слика приказује колокализацију PL-MSC и МØ *in situ*, контакт – бела стрелица. Слика А је сликана на светлосном микроскопу, даљинар 50µm; **B, C и D** су сликане на конфокалном микроскопу, даљинар 25µm. Плавом бојом (SYTO59) су означена једра на сликама **B, C и D**.

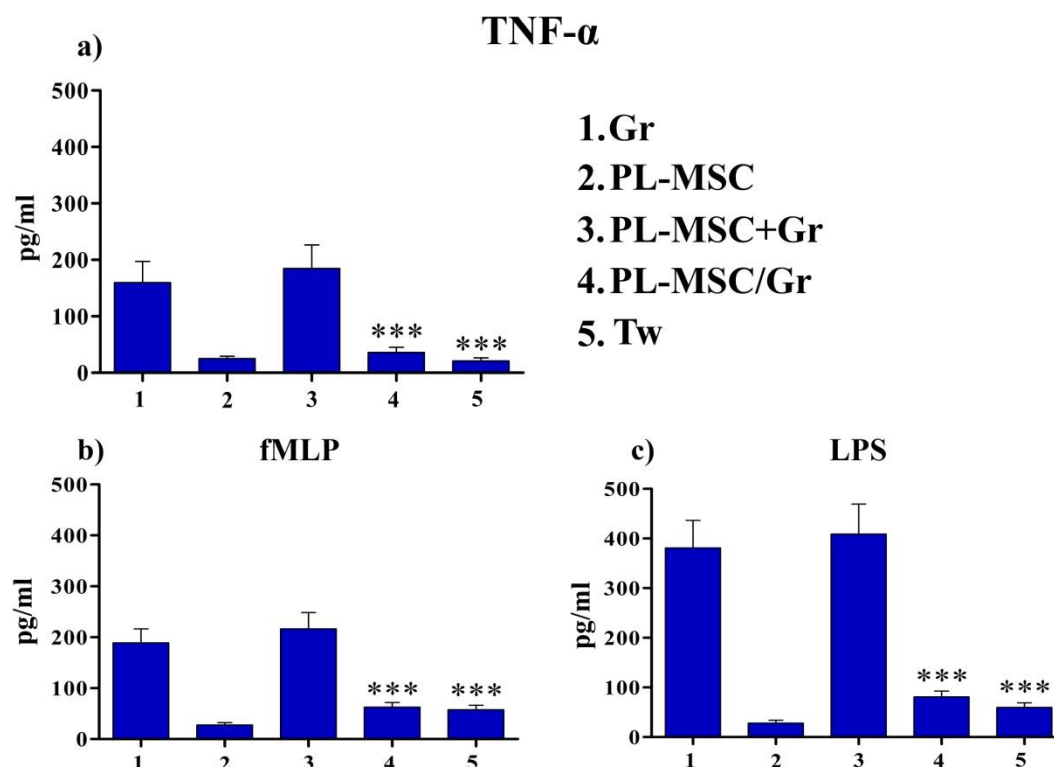
4.9. Интеракција PL-MSC и гранулоцита преко продукције цитокина

Продукција цитокина у ко-култури PL-MSC и популације гранулоцита, коју су доминантно чинили неутрофили, мерена је у систему са директним контактом и у систему где је директан контакт између ћелија био спречен уметком са полупропустљивом мембраном. Коришћена су три експериментална модела. Први модел се односио на интеракцију PL-MSC и нестимулисаних (мирујућих) гранулоцита из периферне крви. Други модел је била ко-култура PL-MSC са гранулоцитима „прајмованим“ са fMLP, а у трећем моделу културе су стимулисане са LPS-ом. Након инкубације ко-култура у току 24 сата сакупљени су супернатанти у којима је одређивана продукција TNF- α , IL-6, IL-27 и TGF- β .

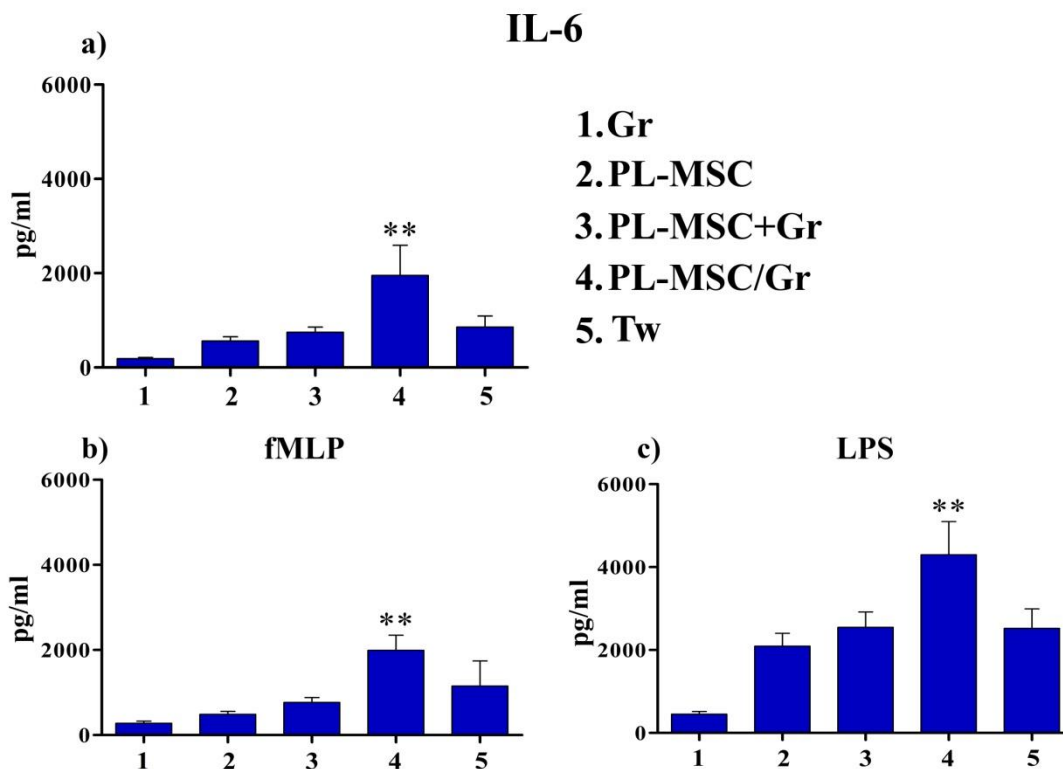
Резултати приказани на графикону 13 показују да је продукција TNF- α у култури PL-MSC била веома ниска и није се битније мењала под утицајем fMLP и LPS. Међутим, продукција TNF- α у култури самих гранулоцита је била повећана након третмана са LPS ($381.0 \pm 55.4 \text{ pg/ml}$) у односу на продукцију нестимулисаних ћелија ($159.6 \pm 37.6 \text{ pg/ml}$), али не и са fMLP третманом ($188.9 \pm 27.6 \text{ pg/ml}$). Продукција овог цитокина у ко-култури PL-MSC и гранулоцита у систему са директним контактом (нестимулисане културе: $36.2 \pm 9.0 \text{ pg/ml}$; fMLP: $62.8 \pm 9.3 \text{ pg/ml}$; LPS: $80.9 \pm 11.7 \text{ pg/ml}$) и у систему са уметком (без стимулације: $21.0 \pm 5.3 \text{ pg/ml}$; fMLP: $57.8 \pm 8.8 \text{ pg/ml}$; LPS: $59.8 \pm 9.1 \text{ pg/ml}$) је била значајно нижа у односу на збир концентрација у појединачним културама ћелија (без стимулације: $184.6 \pm 41.7 \text{ pg/ml}$; fMLP: $216.6 \pm 32.1 \text{ pg/ml}$; LPS: $409.1 \pm 60.3 \text{ pg/ml}$). Модулација продукције TNF- α је била најизраженија на моделима нестимулисаних и LPS-ом стимулисаних ко-култура.

Супротни резултати су добијени за продукцију IL-6. Као што је приказано на графикону 14, ниво продукције IL-6 у култури PL-MSC (нестимулисаних: $560.7 \pm 89.4 \text{ pg/ml}$; fMLP: $486.1 \pm 69.8 \text{ pg/ml}$; LPS: $2095.0 \pm 306.4 \text{ pg/ml}$) био је повећан једино након третмана са LPS-ом, док је продукција овог цитокина у култури гранулоцита била повећана у оба модела стимулисаних култура (контрола: $186.5 \pm 27.3 \text{ pg/ml}$; fMLP: $279.1 \pm 48.7 \text{ pg/ml}$; LPS: $451.2 \pm 65.9 \text{ pg/ml}$). У ко-култури продукција је била повећана једино у систему са директним контактом ћелија (нестимулисане: $1951.2 \pm 642.8 \text{ pg/ml}$; fMLP: $1992.8 \pm 356.0 \text{ pg/ml}$; LPS:

4296.2±800.9pg/ml) у односу на збир у појединачним културама (нестимулисана: 747.1±111.7pg/ml; fMLP: 765.3±115.0pg/ml; LPS: 2546.1±372.3pg/ml).

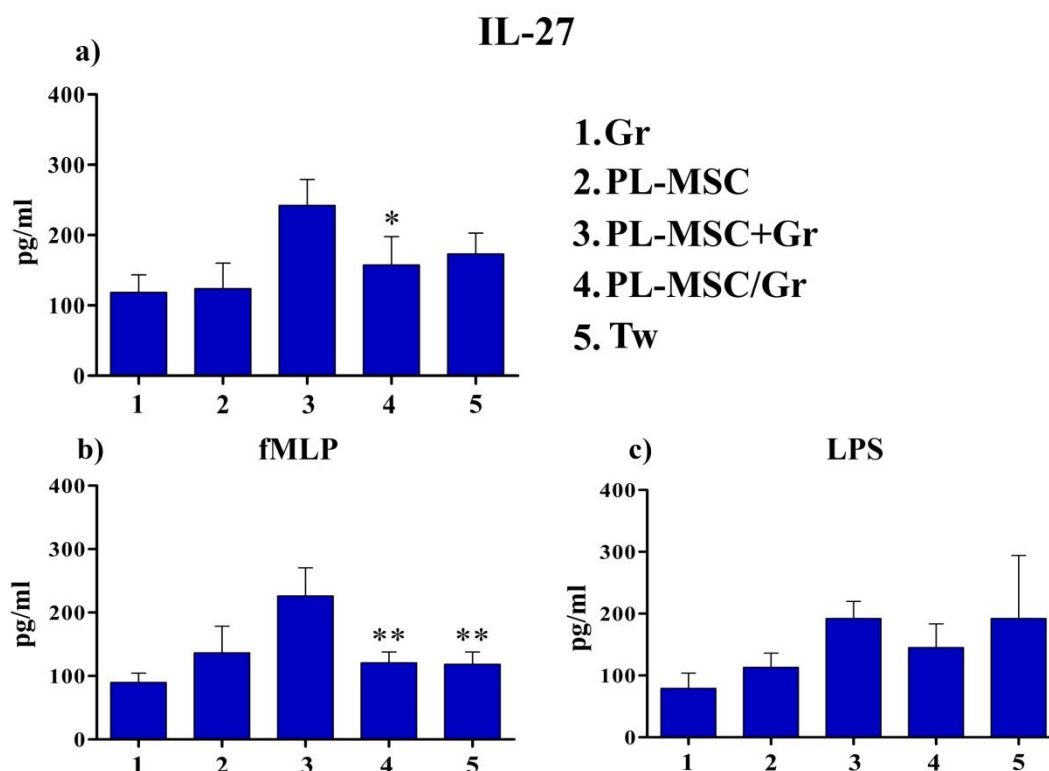


Графикон 13. Продукција TNF- α у ко-култури PL-MSC и гранулоцита. PL-MSC су култивисане са гранулоцитима у току 24 сата у ко-култури са и без директног контакта ћелија. Резултати су приказани као средња вредност нивоа цитокина изражена (pg/ml) \pm SD (n=3). **a)**, нестимулисана култура; **b)**, култура стимулисана са fMLP; **c)**, култура стимулисана са LPS. **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC, **Gr**, гранулоцити, **PL-MSC+Gr**, збир нивоа цитокина у појединачним културама; **PL-MSC/Gr**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, *Dunnet* пост-тест, ***p<0.001, у односу на збир цитокина у појединачним културама (PL-MSC+Gr).



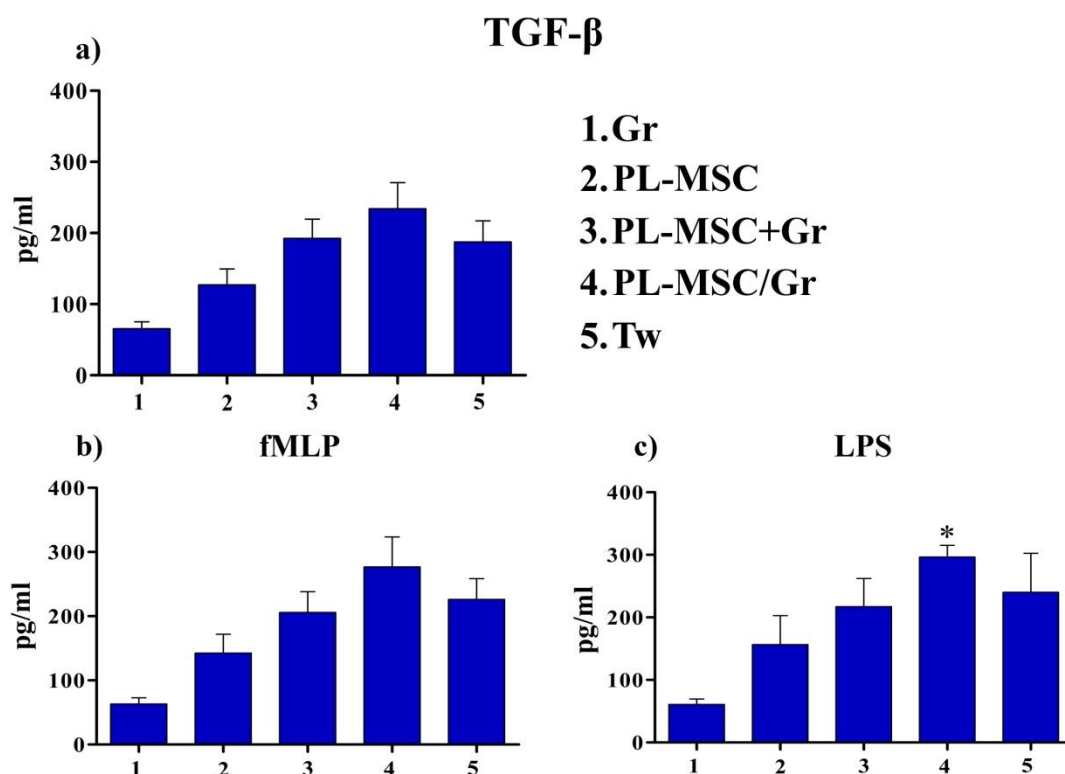
Графикон 14. Продукција IL-6 у ко-култури PL-MSC и гранулоцита. PL-MSC су култивисане са гранулоцитима у току 24 сата у ко-култури са и без директног контакта ћелија. Резултати су приказани као средња вредност нивоа цитокина изражена (pg/ml) \pm SD (n=3). **a)**, нестимулисане културе; **b)**, културе стимулисане са fMLP; **c)**, културе стимулисане са LPS. **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC, **Gr**, гранулоцити, **PL-MSC+Gr**, збир нивоа цитокина у појединачним културама; **PL-MSC/Gr**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, *Dunnet* пост-тест, **p<0.01, у односу на збир цитокина у појединачним културама (PL-MSC+Gr).

Када је у питању продукција IL-27, резултати показују да је она била снижена једино у ко-култури са директним ћелијским контактом код нестимулисаних култура ($157.5 \pm 40.2 \text{ pg/ml}$) у односу на збир нивоа цитокина у појединачним културама ($242.3 \pm 36.8 \text{ pg/ml}$), док је након стимулације са fMLP била снижена независно да ли се ради о директном контакту ($120.7 \pm 17.2 \text{ pg/ml}$) или о систему са уметком ($118.5 \pm 19.2 \text{ pg/ml}$) у односу на контролу ($226.2 \pm 44.2 \text{ pg/ml}$). На моделу стимулације култура са LPS-ом није дошло до значајне модулације продукције овог цитокина (Графикон 15).



Графикон 15. Продукција IL-27 у ко-култури PL-MSc и гранулоцита. PL-MSc су култивисане са гранулоцитима у току 24 сата у ко-култури са и без директног контакта ћелија. Резултати су приказани као средња вредност нивоа цитокина изражена (pg/ml) \pm SD ($n=3$). **a)**, нестимулисане културе; **b)**, културе стимулисане са fMLP; **c)**, културе стимулисане са LPS. **PL-MSc**, ниво цитокина у култури PL-MSc, **Gr**, гранулоцити, **PL-MSc+Gr**, збир нивоа цитокина у појединачним културама; **PL-MSc/Gr**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, Dunnet пост-тест, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ у односу на збир цитокина у појединачним културама (PL-MSc+Gr).

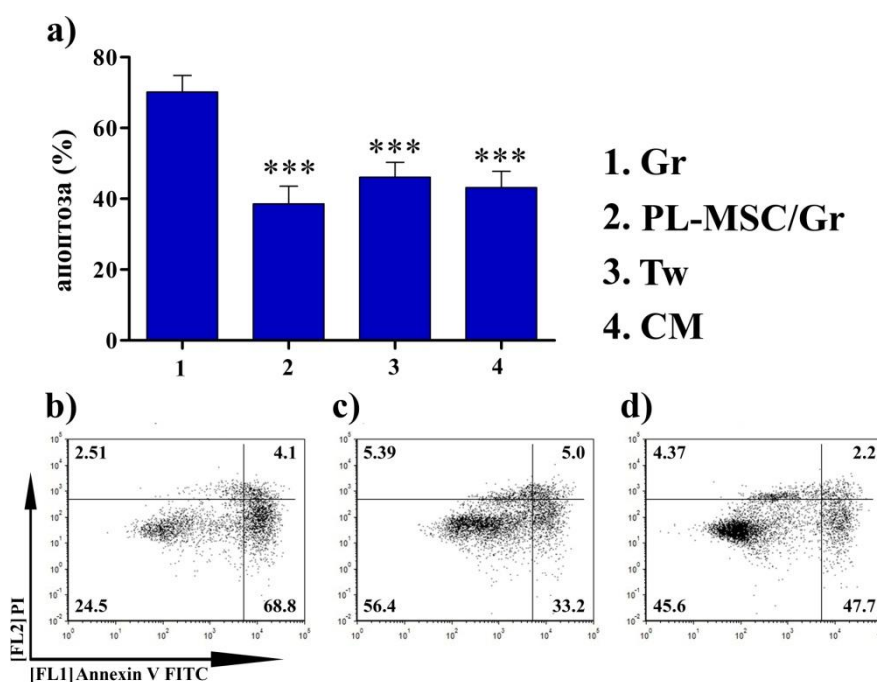
Продукција TGF- β у сва три испитивана модела је била повећана у ко-култури са директним контактом, али је једино код третмана са LPS-ом ниво TGF- β (296.5 ± 18.6 pg/ml) био статистички значајно већи у односу на збир нивоа овог цитокина у појединачним културама (217.2 ± 45.1 pg/ml). Продукција TGF- β такође није била значајно модулирана ни у систему са уметком у односу на контролу код сва три испитивана модела ко-култура (Графикон 16).



Графикон 16. Продукција TGF- β у ко-култури PL-MS и гранулоцита. PL-MS су култивисане са гранулоцитима у току 24 сата у ко-култури са и без директног контакта ћелија. Резултати су приказани као средња вредност нивоа цитокина изражена (pg/ml) \pm SD (n=3). **a)**, нестимулисане културе; **b)**, културе стимулисане са fMLP; **c)**, културе стимулисане са LPS. **PL-MS**, ниво цитокина у култури PL-MS, **Gr**, гранулоцити, **PL-MS+Gr**, збир нивоа цитокина у појединачним културама; **PL-MS/Gr**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, Dunnet пост-тест, *p<0.05, у односу на збир цитокина у појединачним културама (PL-MS+Gr).

4.10. Ефекат PL-MSС на апоптозу гранулоцита

Ефекат PL-MSС на апоптозу гранулоцита у култури је испитиван у неколико фаза. У првој фази испитиван је утицај PL-MSС (n=3) на апоптозу нестимулисаних гранулоцита добијених из периферне крви здравих давалаца. Резултати показују да PL-MSС значајно инхибирају апоптозу гранулоцита у ко-култури са директним контактом ($38.6 \pm 5.0\%$) као и у систему са уметком ($46.1 \pm 4.2\%$), у поређењу са контролом (спонтана апоптоза неутрофила, $70.2 \pm 4.6\%$). У циљу провере значаја солубилних фактора у овим процесима, гранулоцити су третирани и са 24 часовним супернатантима (СМ) PL-MSС. Апоптоза у систему са СМ је такође била снижена ($43.2 \pm 4.6\%$) у односу на контролу, и није се битније разликовала у односу на ко-културу са уметком (Графикон 17).

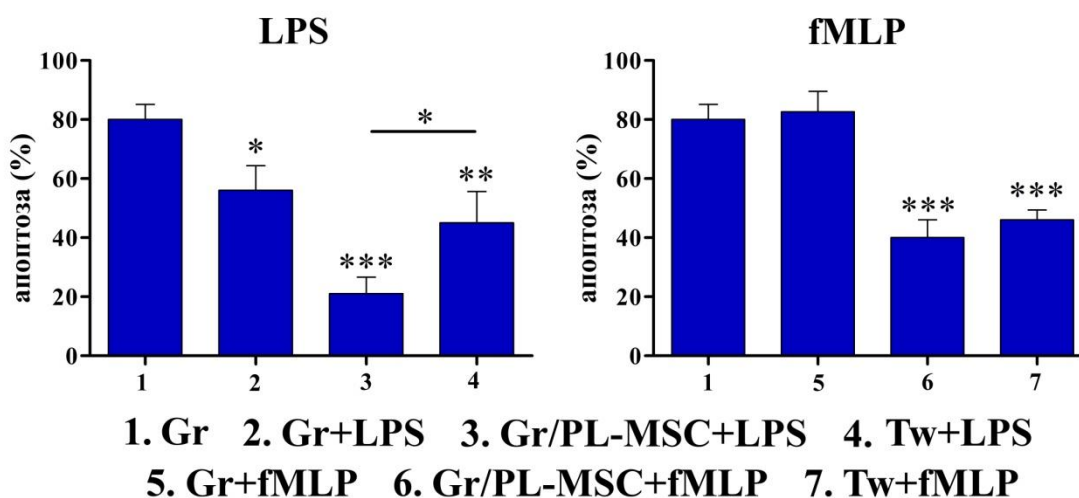


Графикон 17. Апоптоза нестимулисаних гранулоцита у ко-култури са PL-MSС. На графикону **a)** је приказана спонтана апоптоза гранулоцита (1), затим апоптоза у ко-култури са PL-MSС у директном контакту (2), са уметком (3) и третмана са СМ (3) након 24 сата. **Gr**, гранулоцити; **PL-MSС/Gr**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“); **CM**, 24-часовни кондициониран медијум PL-MSС. На **b**, **c** и **d** графиконима је илустрована спонтана апоптоза Gr (**b**), апоптоза Gr у директном контакту са PL-MSС (**c**) и апоптоза Gr у ко-култури са уметком (**d**). One-way ANOVA, *Dunnett* пост-тест, *** $p < 0.001$ у односу на спонтану апоптозу (1).

4.11. Ефекат PL-MSС на апоптозу активираних гранулоцита

У другој фази испитивана је апоптоза гранулоцита активисаних са fMLP и LPS-ом у ко-култури са PL-MSС. Показано је да LPS инхибира апоптозу гранулоцита ($56.0 \pm 8.4\%$) у односу на контролу ($80.0 \pm 5.1\%$), док fMLP додатно повећава апоптозу, али због ниске спонтане апоптозе разлика није била статистички значајна. Без обзира на овај феномен PL-MSС су инхибирале апоптозу LPS и fMLP стимулираних гранулоцита у ко-култури са директним контактом (LPS: $21.0 \pm 5.6\%$) и (fMLP: $40.0 \pm 6.0\%$), као и у ко-култури са уметком (LPS: $45.0 \pm 10.6\%$) и (fMLP: $46.0 \pm 3.4\%$) (Графикон 18).

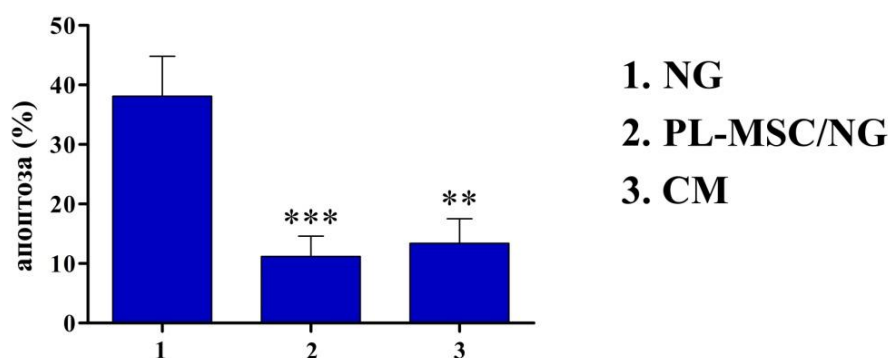
Иако је апоптоза гранулоцита у ко-култури са PL-MSС била смањена у оба модела, степен модулације је био израженији након активације са LPS-ом (62.5%) у односу на fMLP (54.5%), вероватно што је апоптоза стимулираних гранулоцита са fMLP иницијално била већа. Такође, инхибиција апоптозе гранулоцита стимулираних LPS-ом од стране PL-MSС је била већа у директном контакту него у систему са уметком (Графикон 18).



Графикон 18. Апоптоза гранулоцита активираних са LPS и fMLP у ко-култури са PL-MSС. Гранулоцити су ко-култивисани са PL-MSС ($n=3$) у присуству LPS или fMLP у току 24 сата. **Gr**, гранулоцити; **Gr/PL-MSС**, ко-култура са директним контактом; **Tw**, ко-култура са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, *Bonferroni* пост-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, у односу на Gr (1).

4.12. Ефекат PL-MSC на апоптозу неутрофилних гранулоцита из PL

Трећа фаза овог дела испитивања односила се на утицај PL-MSC на апоптозу неутрофилних гранулоцита из PL у ко-култури. PL-IC су ко-култивисане 24 сата са PL-MSC, након чега је одређивана апоптоза неутрофилних гранулоцита на основу морфолошких критеријума. Резултати показују да је спонтана апоптоза неутрофила из PL (контрола) била нижа ($38.1 \pm 6.7\%$) у односу на спонтану апоптозу гранулоцита добијених из периферне крви ($70.2 \pm 4.6\%$). Резултати такође показују да је апоптоза неутрофилних гранулоцита била значајно инхибирана у ко-култури са PL-MSC ($11.2 \pm 3.4\%$) у односу на контролу. У циљу тестирања ефекта солубилних фактора продукованих од стране PL-MSC, неутрофилни гранулоцити из PL су третирани са 24 часовним CM из PL-MSC култура, након чега је мерен степен апоптозе. Резултати показују да је апоптоза гранулоцита у присуству CM била такође значајно снижена ($13.4 \pm 4.1\%$) у односу на контролну групу, веома слично као у систему са директним контактом са PL-MSC (Графикон 19).

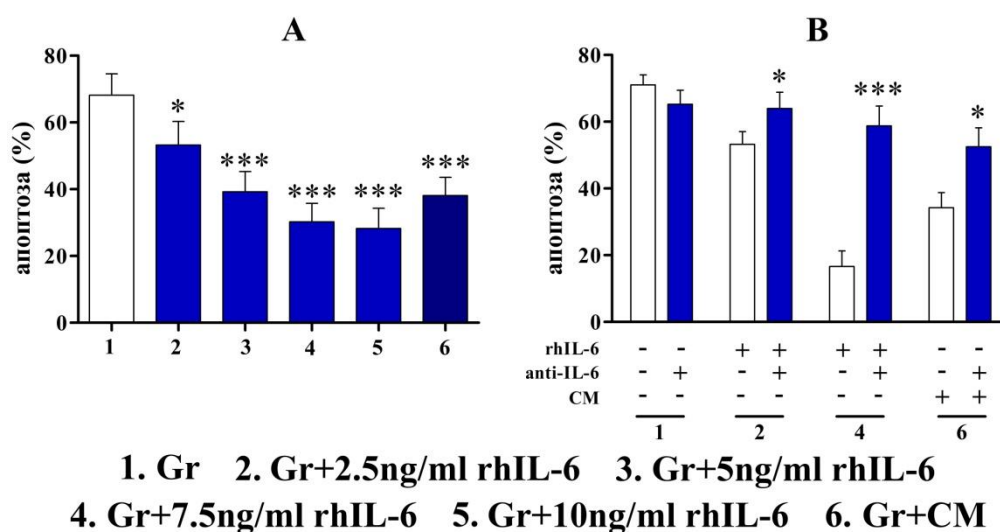


Графикон 19. Апоптоза неутрофилних гранулоцита из PL у ко-култури са PL-MSC. PL-IC су ко-култивисане са PL-MSC (однос PL-MSC и PL-IC је био 1:5) у систему са директним контактом или су третиране са CM припремљеног од PL-MSC (n=3) у току 24 сата. **NG**, спонтана апоптоза неутрофилних гранулоцита одређивана на основу морфолошке анализе PL-IC (контрола); **PL-MSC/NG**, апоптоза неутрофилних гранулоцита у ко-култури са директним контактом; **CM**, апоптоза неутрофилних гранулоцита након 24 часовног третмана PL-IC са кондиционираним медијумом PL-MSC. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, **p<0.01, ***p<0.001 у односу на NG.

4.13. Улога IL-6 у антиапоптотским ефектима PL-MSC на гранулоците

У четвртој фази студије испитиван је ефекат IL-6 у анти-апоптотским механизмима PL-MSC на гранулоците. У том циљу најпре је испитиван ефекат различитих концентрација егзогено додатог рекомбинантног хуманог IL-6 *in vitro*, на апоптозу гранулоцита периферне крви и упоређен са ефектом CM припремљеног од PL-MSC. Резултати приказани на графикону 20 показују дозно зависни ефекат IL-6 на апоптозу гранулоцита [53.2±7.1% (2.5ng/ml rhIL-6), 39.2±6.1% (5ng/ml), 30.2±5.6% (7.5ng/ml) и 28.2±6.1% (10ng/ml)]. Ефекат CM на апоптозу је био компарабилан са дозом rhIL-6 од 5ng/ml (38.1±5.5%). Интересантно је да су концентрације IL-6 у CM биле 2.4ng/ml, а ефекат на апоптозу је био израженији у односу на rhIL-6 у дози од 2.5ng/ml.

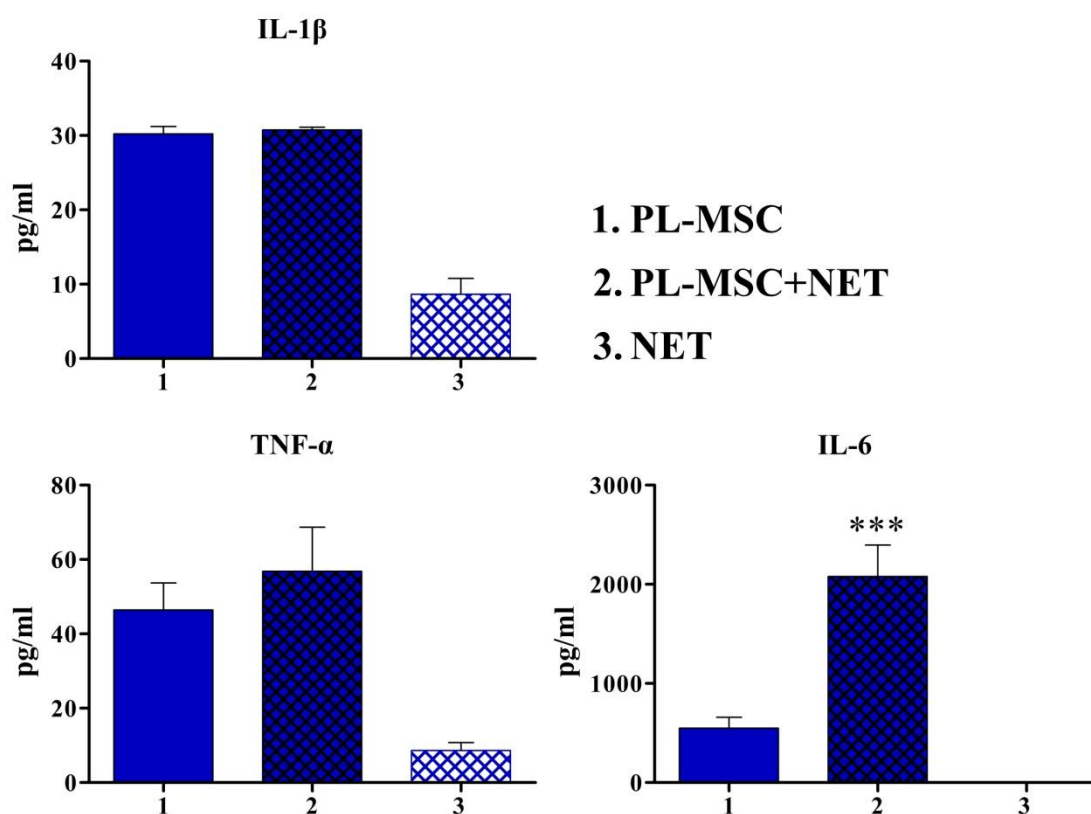
Када је у културе додато блокирајуће anti-IL-6 антитело, оно је у потпуности довело до апоптозе гранулоцита у културама са обе примењене дозе IL-6 (2.5ng/ml и 7.5ng/ml), али није у потпуности инхибирало апоптозу гранулоцита у културама са CM ($p < 0.05$) (Графикон 20).



Графикон 20. Ефекат IL-6 на апоптозу гранулоцита. Графикон А приказује дозно зависно смањење апоптозе након 24h третмана са rhIL-6 и CM ($n=3$). Графикон В приказује степен реверзије апоптозе након додатка anti-IL-6 mAb ($n=3$). Gr, спонтана апоптоза гранулоцита; бели стубићи на графикону В - апоптоза без anti-IL-6; плави стубићи на графикону В - апоптоза са anti-IL-6. Графикон А, One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, $*=p < 0.05$, $***=p < 0.001$ у односу на Gr (1); Графикон В, *Student t*-тест, $*=p < 0.05$, $***=p < 0.001$ у односу на беле стубиће.

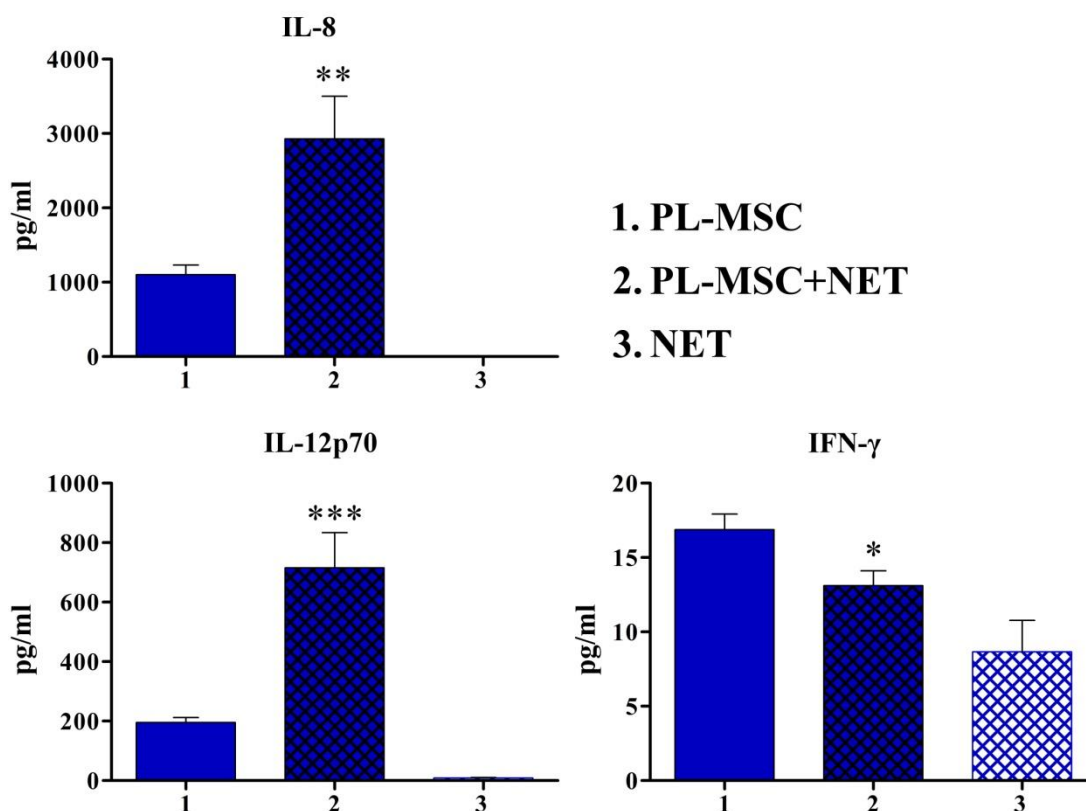
4.14.NET модулира продукцију цитокина у култури PL-MSC

У оквиру међусобних интеракција PL-MSC и неутрофилних гранулоцита испитиван је утицај NET-а (2.5µg/ml) на продукцију цитокина у култури PL-MSC. Након 24-часовног третмана, сакупљени су супернатанти и мерена је продукција цитокина како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати показују да NET није модулирао продукцију IL-1β и TNF-α. Међутим, продукција IL-6 је била повећана у култури PL-MSC стимулисане NET-ом (2078.8±318.6pg/ml) у односу на контролне нестимулисане PL-MSC (547.8±111.2pg/ml) (Графикон 21). У NET-у, ниво ових цитокина је био веома низак, на граници детектабилности (IL-1β: 8.5±2.4pg/ml, TNF-α: 8.7±2.1pg/ml, IL-6: 6.7±0.7pg/ml).



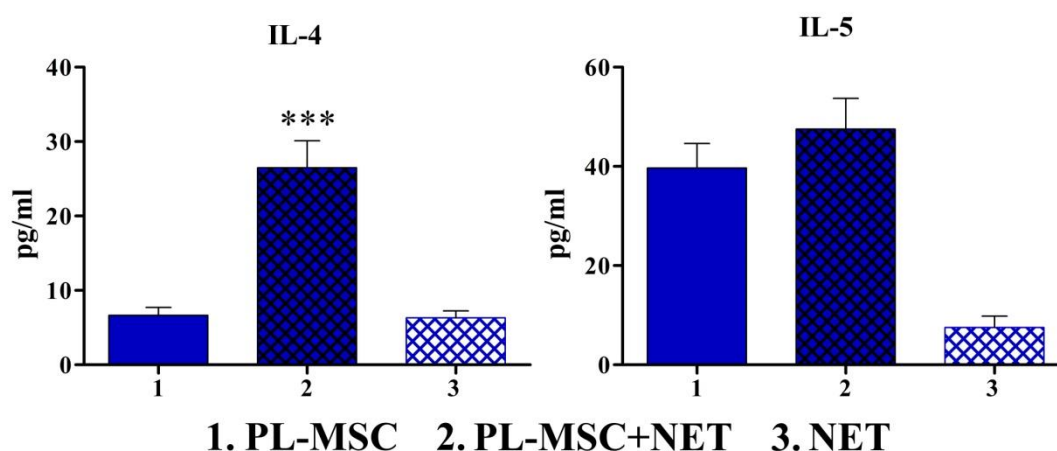
Графикон 21. Продукција IL-1β, TNF-α и IL-6 у култури PL-MSC након третмана са NET-ом. PL-MSC су третиране са NET-ом у култури, 24 сати. На графикону је приказана средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml ± SD (n=3). **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC; **PL-MSC+NET**; ниво цитокина у култури PL-MSC након третмана са NET-ом; **NET**, ниво цитокина у NET-у. *Student t*-тест, ***=p<0.001 у односу на PL-MSC.

Анализом продукције IL-8 у култури PL-MSC стимулираних NET-ом уочава се значајно повећање продукције овог цитокина ($2927.2 \pm 572.9 \text{ pg/ml}$) за разлику од његове продукције у култури нестимулисаних PL-MSC ($1103.3 \pm 127.7 \text{ pg/ml}$). Продукција IL-12p70 је такође била повећана ($715.8 \pm 117.8 \text{ pg/ml}$) у односу на контролу ($195.1 \pm 17.4 \text{ pg/ml}$), док је ниво IFN- γ био снижен ($13.1 \pm 1.0 \text{ pg/ml}$) у односу на контролу ($16.9 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$). Ниво ових цитокина у NET-у је такође био на граници детектабилности (IL-8: $8.4 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$, IL-12p70, $8.4 \pm 2.6 \text{ pg/ml}$, IFN- γ : $8.9 \pm 2.2 \text{ pg/ml}$) (Графикон 22).



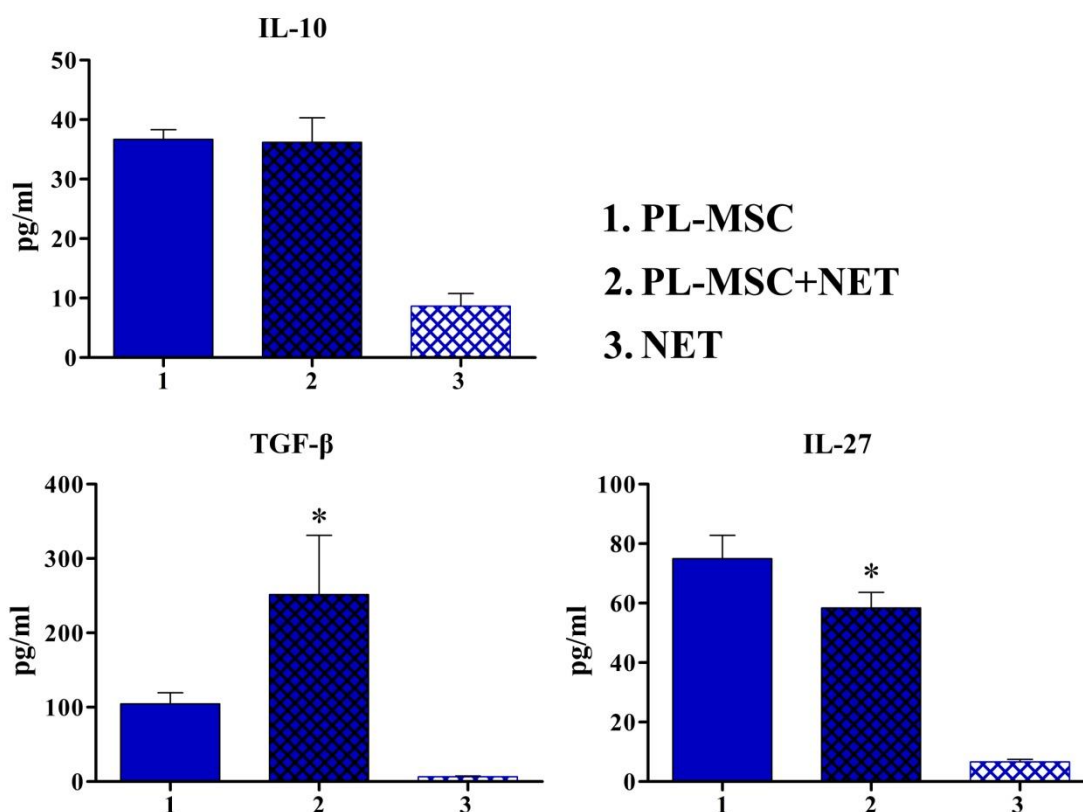
Графикон 22. Продукција IL-8, IL-12p70 и IFN- γ у култури PL-MSC након третмана са NET-ом. PL-MSC су третиране са NET-ом у култури, 24 сати. На графикону је приказана средња вредност продукције цитокина изражена у $\text{pg/ml} \pm \text{SD}$ ($n=3$). **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC; **PL-MSC+NET**; ниво цитокина у култури PL-MSC након третмана са NET-ом; **NET**, ниво цитокина у NET-у. *Student t*-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ у односу на PL-MSC.

Степен модулације продукције Th2 цитокина од стране NET-а у култури PL-
MSC приказана је на графикону 23. Уочава се да је у култури PL-MSC
стимулисних NET-ом повећана продукција IL-4 ($26.5 \pm 3.7 \text{ pg/ml}$) у односу на
продукцију овог цитокина у култури нестимулисаних PL-MSC ($6.7 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$).
Осим тога, NET је такође стимулисао продукцију IL-5 у култури PL-MSC
($47.5 \pm 6.2 \text{ pg/ml}$), али ово повећање није било статистички значајно у односу на
контролу ($37.7 \pm 5.0 \text{ pg/ml}$). Ниво Th2 цитокина у NET-у је попут осталих
анализираних цитокина био на граници детектабилности (IL-4: $6.5 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$, IL-5:
 $7.5 \pm 2.3 \text{ pg/ml}$).



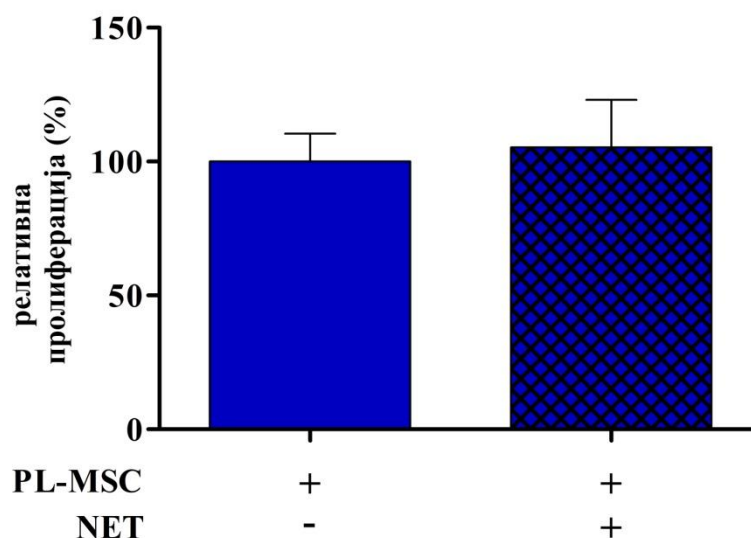
Графикон 23. Продукција IL-4 и IL-5 у култури PL-MSC након третмана са NET-ом. PL-MSC су третиране са NET-ом у култури, 24 сати. На графикону је приказана средња вредност продукције цитокина изражена у $\text{pg/ml} \pm \text{SD}$ ($n=3$). **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC; **PL-MSC+NET**; ниво цитокина у култури PL-MSC након третмана са NET-ом; **NET**, ниво цитокина у NET-у. *Student t*-тест, ***= $p < 0.001$ у односу на PL-MSC.

Резултати продукције имунорегулацијских цитокина (IL-10 и TGF- β) у култури PL-MSC након третмана са NET-ом су приказани на графикону 24. Ниво TGF- β ($251.4 \pm 79.7 \text{ pg/ml}$) је био повећан у односу на концентрације у култури нестимулисаних ћелија ($104.4 \pm 15.0 \text{ pg/ml}$). Међутим, продукција IL-10 није била промењена у култури PL-MSC стимулираних NET-ом у односу на контролу. Са грфикана 24 се такође уочава да је продукција IL-27 у култури NET-ом стимулираних PL-MSC била значајно снижена ($58.4 \pm 5.2 \text{ pg/ml}$) у односу на контролу ($75.0 \pm 7.9 \text{ pg/ml}$). Слично ранијим налазима, нивои свих цитокина приказаних на овом графикону у NET-у су били на граници детектабилности (IL-10: $8.0 \pm 2.0 \text{ pg/ml}$, TGF- β : $6.6 \pm 0.8 \text{ pg/ml}$, IL-27: $6.6 \pm 0.8 \text{ pg/ml}$).



Графикон 24. Продукција IL-10, TGF- β и IL-27 у култури PL-MSC након третмана са NET-ом. PL-MSC су третиране са NET-ом у култури, 24 сати. На графикону је приказана средња вредност продукције цитокина изражена у $\text{pg/ml} \pm \text{SD}$ ($n=3$). **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC; **PL-MSC+NET**; ниво цитокина у култури PL-MSC након третмана са NET-ом; **NET**, ниво цитокина у NET-у. *Student t*-тест, $*=p<0.05$ у односу на PL-MSC.

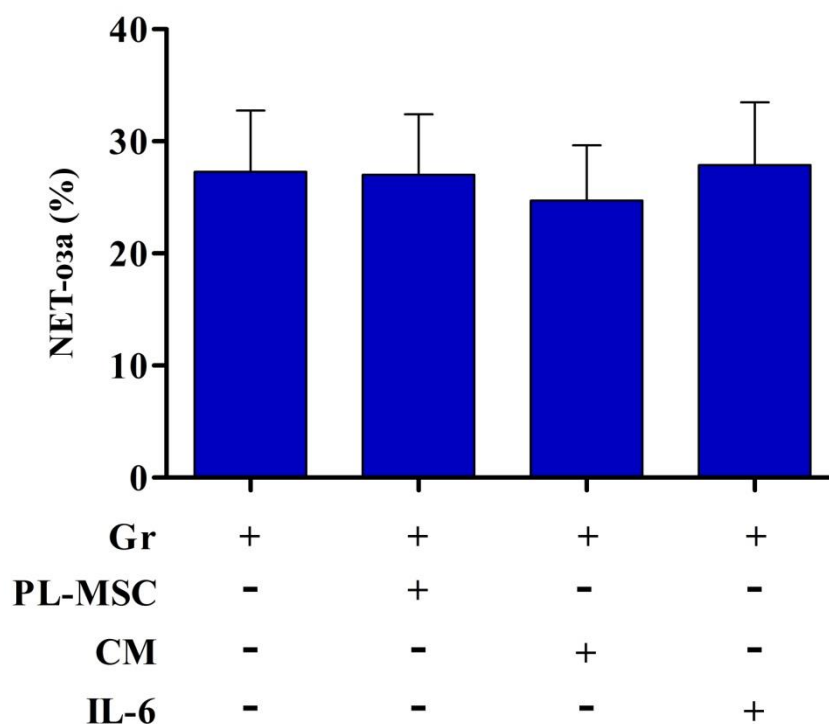
У циљу провере да ли је ефекат NET-а на повећану продукцију цитокина од стране PL-MSC последица њиховог повећаног броја, испитан је утицај NET-а на пролиферацију PL-MSC. Са графикана 25 се уочава да NET није битније мењао пролиферацију PL-MSC ($p>0.05$).



Графикон 25. Релативна пролиферација PL-MSC након третмана са NET-ом. Приказана је релативна пролиферација PL-MSC изражена у процентима \pm SD ($n=3$). **Бели стубић**, релативна пролиферација PL-MSC без стимулације (контрола); **Плави стубић**, релативна пролиферација PL-MSC након третмана са NET-ом (2.5ng/ml). Установљено је да не постоји статистички значајна разлика међу анализираним групама. *Student t*-тест, $p>0.05$.

4.15. Утицај PL-MSC на процес NET-озе

Након испитивања ефекта NET-а на пролиферацију и продукцију цитокина од стране PL-MSC, проверавали смо да ли и како PL-MSC утичу на процес NET-озе. Обзиром да смо у досадашњим испитивањима показали да је продукција IL-6 повећана у ко-култури PL-MSC и гранулоцита, као и у култури PL-MSC стимулираних са LPS-ом или NET-ом, тестирано је да ли ови третмани утичу на NET-озу. У том циљу степен NET-озе је мерен у ко-култури PL-MSC и гранулоцита, као и у култури гранулоцита стимулираних са CM PL-MSC и rhIL-6 како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Са графикана 26 се уочава да процес NET-озе није значајно модулиран ни у једном од испитиваних модела ($p > 0.05$).



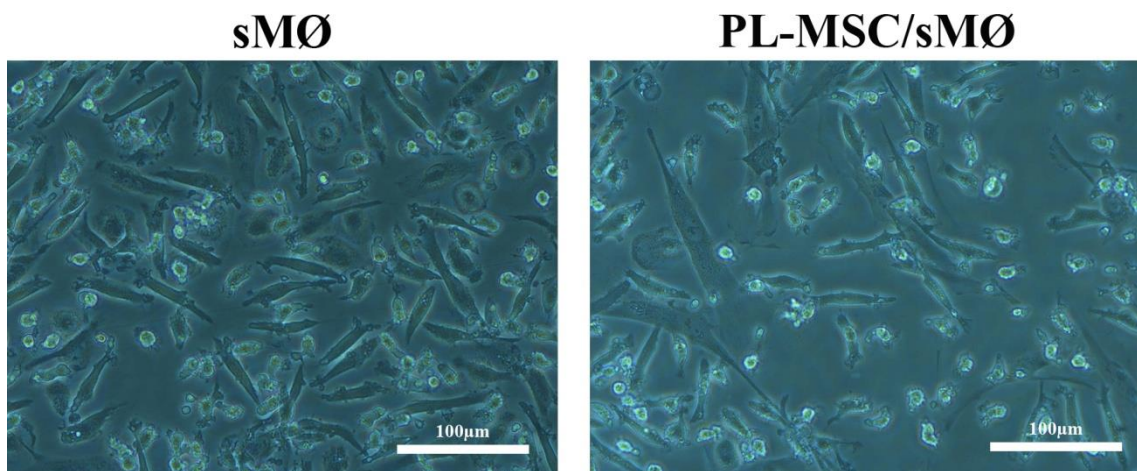
Графикон 26. Степен NET-озе у ко-култури гранулоцита са PL-MSC и након третмана са CM и IL-6. Приказан је степен NET-озе PMA активираних гранулоцита изражен у процентима \pm SD ($n=3$). **PL-MSC(+)**, степен NET-озе у ко-култури гранулоцита са PL-MSC у директном контакту; **CM(+)**, степен NET-озе у култури гранулоцита стимулираних са CM; **IL-6(+)**, степен NET-озе у култури гранулоцита третираних са rhIL-6 (5ng/ml) Установљено је да не постоји статистички значајна разлика међу анализираним групама. ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, $p > 0.05$.

4.16. Интеракција PL-MSС и MØ *in vitro*

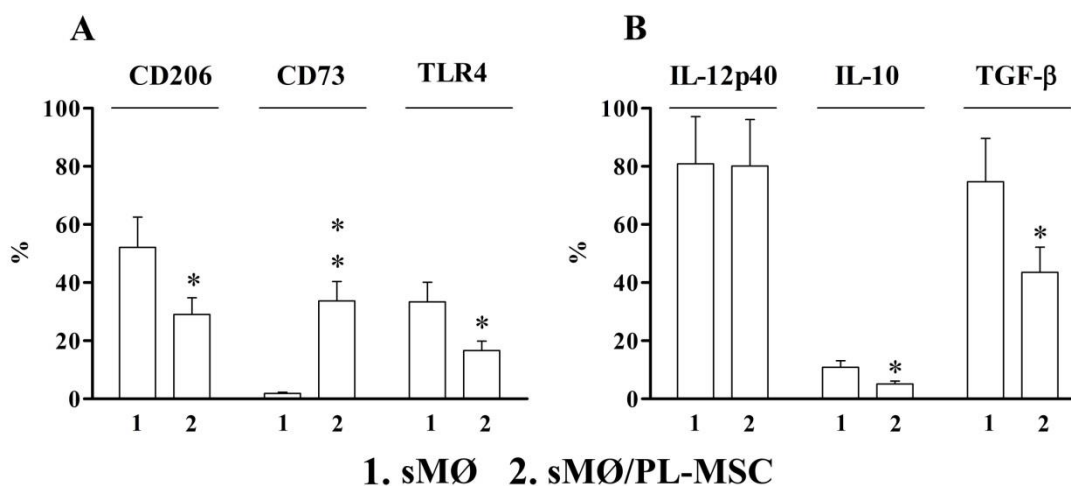
У последњем делу овог пројекта испитивана је међусобна интеракција PL-MSС и спонтано диференцираних, M-CSF индукованих и GM-CSF индукованих MØ. Нова PL-MSС линија је изолована према већ описаној процедури за изолацију MSС, а MØ су добијене диференцијацијом од моноцита девет различитих донора без додатка CSF-а (спонтана диференцијација sMØ, 3 донора), помоћу M-CSF-а (mMØ, 3 донора) и GM-CSF-а (gmMØ, 3 донора). Ћелије су ко-култивисане у систему PL-MSС:MØ у систему са директним контактом и у „transwell“ систему са полупропустљивом мембраном у односу 1:2,5. Додатно су у појединим експериментима MØ третиране са CM PL-MSС, у циљу испитивања ефекта солубиних фактора продукованих од стране PL-MSС на функцију MØ. У оквиру интеракције PL-MSС и MØ испитиван је утицај PL-MSС на фенотипску и функционалну поларизацију MØ, као и утицај MØ на фенотипска својства и продукцију цитокина од стране PL-MSС.

4.16.1. Интеракција PL-MSС и спонтано диференцираних MØ

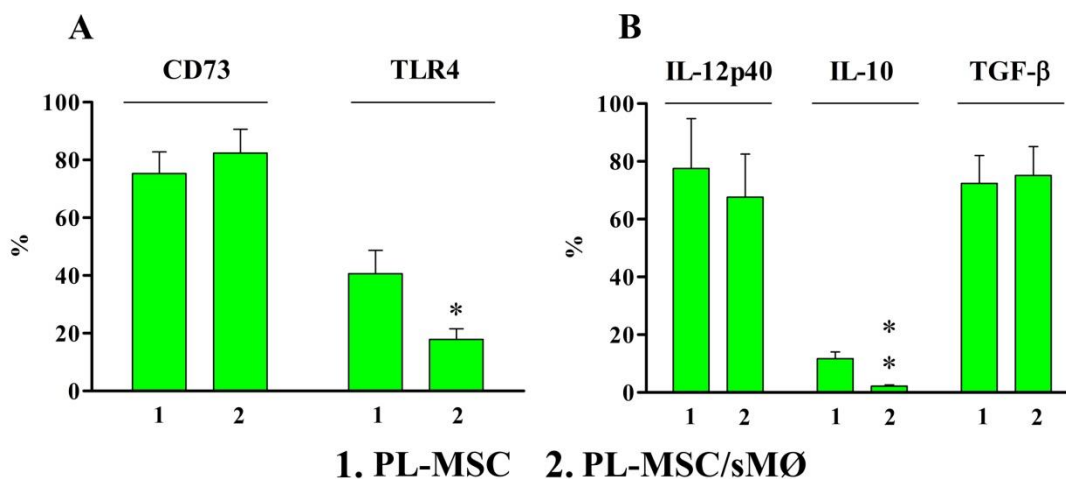
Микроскопском анализом sMØ у култури, уочена је подједнака заступљеност ћелија вретенастог облика (енгл. *spindle shape*), морфологије сличне фибробластима, као и округлих, звездастих ћелија (енгл. *round cells*). У ко-култури са PL-MSС је, међутим, удео звездастих sMØ био смањен на рачун вретенастих ћелија (Слика 15). Анализом фенотипа sMØ показано је да PL-MSС смањују експресију CD206 (рецептор за манозу) на sMØ ($29.0 \pm 5.8\%$) у ко-култури са директним контактом у односу на контролу ($52.1 \pm 10.4\%$), затим да повећавају експресију CD73 ($33.7 \pm 6.7\%$) у односу на контролу ($1.9 \pm 0.4\%$), као и да смањују експресију TLR4 ($16.3 \pm 3.3\%$) у односу на контролу ($33.4 \pm 6.7\%$). Када је у питању експресија интрацелуларних цитокина показано је да PL-MSС смањују експресију имунорегулацијских цитокина IL-10 ($5.1 \pm 1.0\%$) у односу на контролу ($10.9 \pm 2.2\%$) и TGF- β ($43.5 \pm 8.7\%$) у односу на контролу ($74.7 \pm 14.9\%$), али да не модулирају експресију IL-12p40 (Графикон 27). С друге стране, sMØ смањују експресију TLR4 молекула на PL-MSС ($17.9 \pm 3.6\%$) у односу на контролу ($40.6 \pm 8.1\%$) и експресију интрацелуларног IL-10 ($2.2 \pm 0.4\%$) у односу на контролу ($11.7 \pm 2.3\%$), али не модулирају експресију CD73, IL-12p40 и TGF- β (Графикон 28).



Слика 15. Морфолошке карактеристике sMØ у култури. sMØ, култура спонтано диференцираних МØ; PL-MSC/sMØ, изглед ћелија у ко-култури са директним контактом; увећање 20x; даљинар 100µm.

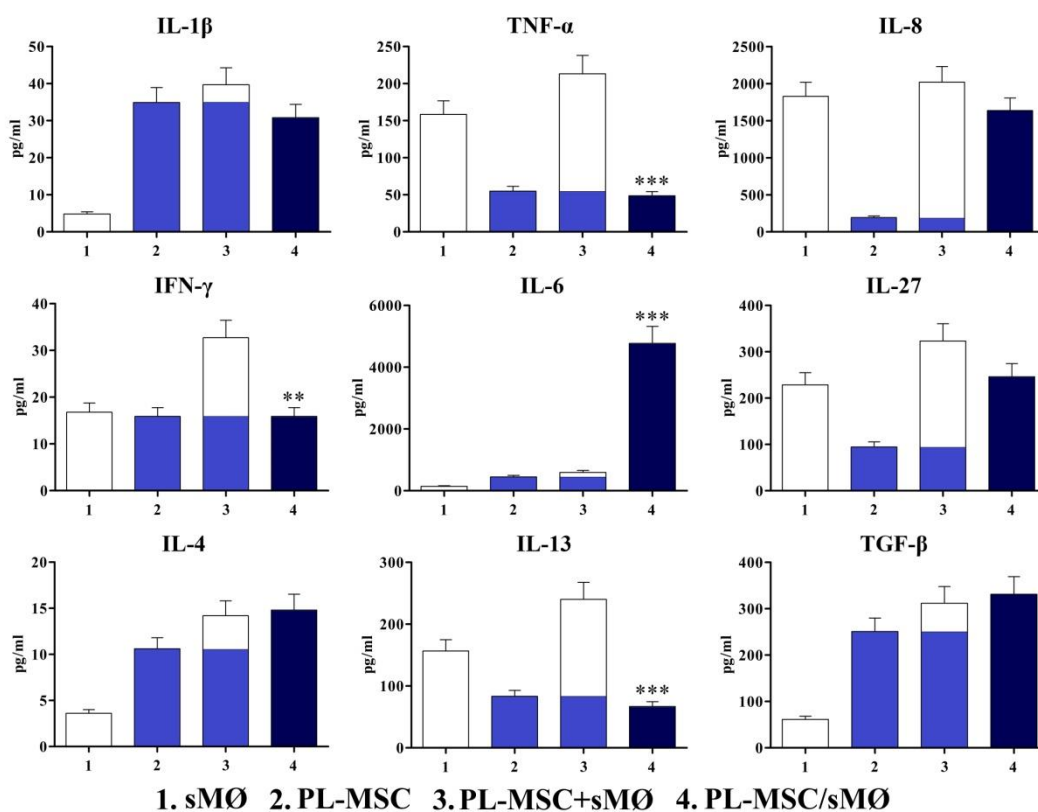


Графикон 27. Експресија CD206, CD73, TLR4, IL-12p40, IL-10 и TGF-β у култури спонтано диференцираних МØ ко-култивисаних са PL-MSC. PL-MSC су ко-култивисане са sMØ у току 5 дана у систему са директним контактом ћелија. Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија ± SD (n=3). **A**, мембрански маркери МØ; **B**, интрацелуларна експресија цитокина у МØ; sMØ, спонтано диференцирани макрофаги (контрола); sMØ/PL-MSC, експресија у sMØ у директном контакту са PL-MSC. *Student t*-тест, *p<0.05, **p<0.01 у односу на sMØ.



Графикон 28. Експресија CD73, TLR4, IL-12p40, IL-10 и TGF-β у култури PL-MSC ко-култивисаних са спонтано диференцираним MØ. PL-MSC су ко-култивисане са sMØ у току 5 дана у систему са директним контактом ћелија. Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија ± SD (n=3). **А**, мембрански маркери PL-MSC; **Б**, интрацелуларна експресија цитокина у PL-MSC; **PL-MSC**, контрола, **sMØ**, спонтано диференцирани макрофаги; **PL-MSC/sMØ**, експресија на/у PL-MSC у директном контакту са sMØ. *Student t*-тест, *p<0.05, **p<0.01 у односу на PL-MSC.

Резултати продукције цитокина у ко-култури PL-MSC и sMØ показују да је ниво TNF- α у систему са директним контактом снижен (48.6 ± 9.7 pg/ml) у односу на збир појединачно продукованих цитокина (213.3 ± 42.7 pg/ml). Слично је показано и за IFN- γ у ко-култури (15.9 ± 3.2 pg/ml) у односу на контролу (32.7 ± 6.5 pg/ml). Међутим, продукција IL-6 је била повећана у ко-култури са директним контактом (4770.9 ± 954.2 pg/ml) у односу на контролу (591.5 ± 118.3 pg/ml). Продукција осталих Th1 цитокина (IL-1 β и IL-8) није била модулирана. Када су у питању Th2 и Tregs цитокини, резултати показују да је у ко-култури PL-MSC и sMØ са директним контактом снижена једино продукција IL-13 (66.8 ± 13.4 pg/ml) у односу на контролу (240.0 ± 48.0 pg/ml), док је продукција IL-4, TGF- β и IL-27 остала непромењена (Графикон 29).



Графикон 29. Продукција IL-1 β , TNF- α , IL-8, IFN- γ , IL-6, IL-27, IL-4, IL-13 и TGF- β у ко-култури PL-MSC и sMØ. Приказана је средња вредност продукције цитокина у културама ћелија изражена у pg/ml \pm SD (n=3). sMØ, спонтано диференцирани макрофаги (1); PL-MSC, ниво цитокина у супернатантима културе PL-MSC (2); PL-MSC+sMØ, збир нивоа цитокина у супернатантима појединачних култура (3); PL-MSC/sMØ, ниво цитокина у супернатантима ко-култура (4). Student t-тест, **p<0.01, ***p<0.05 у односу на (3).

4.16.2. Интеракција PL-MSС и mMØ диференцираних са M-CSF

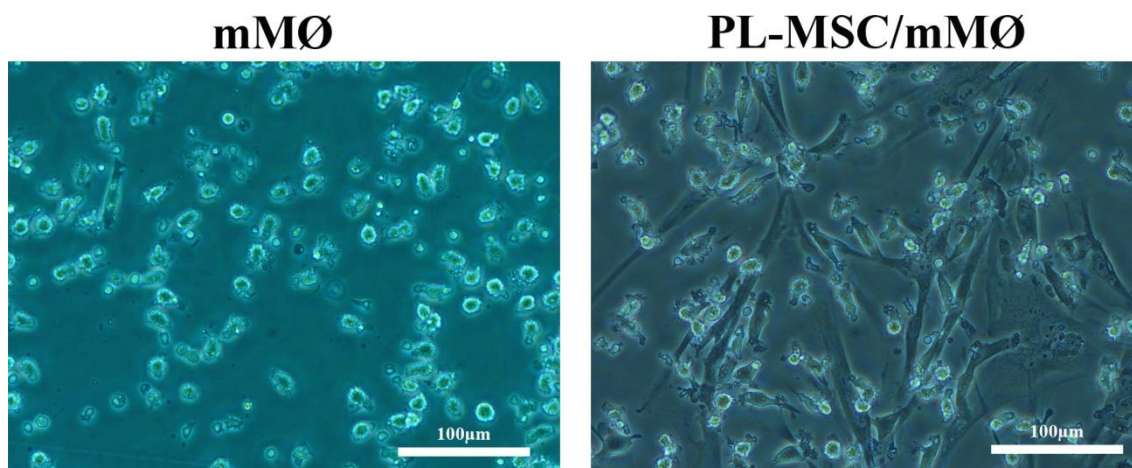
За разлику од sMØ, у делу испитивања интеракције PL-MSС и mMØ, показано је да у култури mMØ преовладавају ћелије звездастог облика, као и да је однос звездастих и ћелија вретенастог облика mMØ у ко-култури са PL-MSС незнатно промењен у корист звездастих ћелија (Слика 16).

Анализом експресије маркера показано је да PL-MSС повећавају експресију CD80 молекула на mMØ у директном контакту ($50.3 \pm 10.1\%$) и у систему са уметком ($44.0 \pm 8.8\%$) у односу на контролу ($23.7 \pm 4.7\%$), затим да повећавају CD86 експресију mMØ у систему са директним контактом ћелија ($57.2 \pm 11.4\%$) и у систему са уметком ($53.1 \pm 10.6\%$) у односу на контролу ($26.6 \pm 5.3\%$). Експресија CD14 молекула на mMØ у директном контакту са PL-MSС ($40.7 \pm 4.1\%$) такође је била повећана у односу на контролу ($25.7 \pm 5.1\%$), али се експресија у култури са уметком није статистички значајно разликовала. Експресија CD16 молекула на mMØ није била битније промењена ни у једном од два испитивана тест система (Графикон 30). За разлику од ефекта на sMØ, PL-MSС су у ко-култури са mMØ довеле до значајног повећања експресије CD206 молекула на mMØ у директном контакту ($46.4 \pm 7.6\%$) и у систему са уметком ($46.8 \pm 9.4\%$) у односу на контролу ($27.1 \pm 5.4\%$). Осим тога, експресија CD73 на mMØ је била повећана у ко-култури са директним контактом ($64.1 \pm 12.8\%$) и у систему са уметком ($41.7 \pm 3.9\%$) у односу на контролу ($22.4 \pm 4.5\%$). Ниво експресије CD39 је био повећан ($54.1 \pm 10.8\%$) у односу на контролу ($33.0 \pm 6.6\%$) једино у ко-култури ћелија са директним контактом. За разлику од горе наведених молекула, експресија IDO-1 је била смањена у mMØ ($14.3 \pm 2.9\%$) једино у ко-култури са директним контактом у односу на контролу ($38.3 \pm 7.7\%$) (Графикон 30).

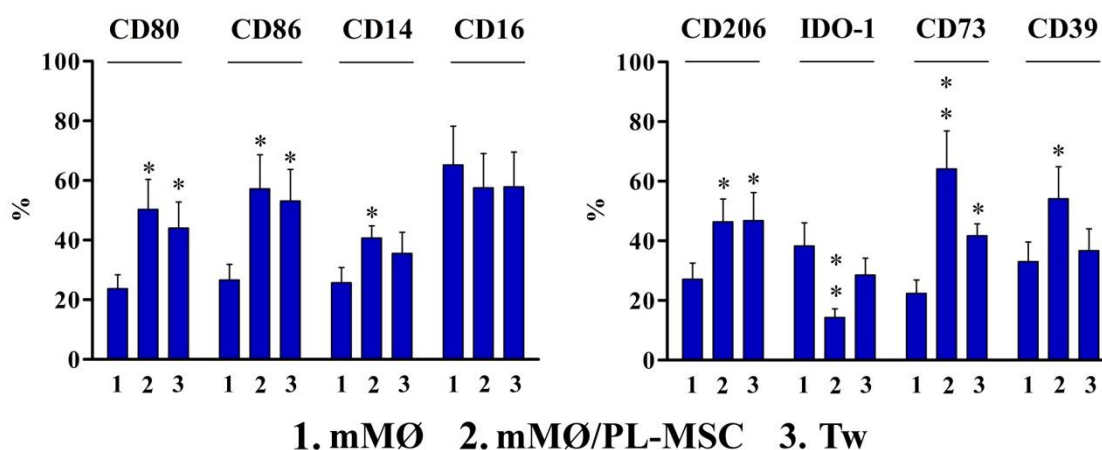
Када су у питању интрацелуларни цитокини, резултати показују да је експресија IL-12p40 у mMØ у директном контакту са PL-MSС снижена на $19.7 \pm 2.0\%$ и у систему са уметком ($21.8 \pm 3.3\%$) у односу на контролу ($36.6 \pm 7.3\%$), док је експресија IL-10 у mMØ повећана на $76.9 \pm 3.7\%$ једино у ко-култури са директним контактом ћелија у односу на контролу ($46.5 \pm 7.0\%$). Експресија TGF- β је била повећана у ко-култури са директним контактом ($85.8 \pm 5.6\%$) и у систему са уметком ($82.2 \pm 8.2\%$) у односу на контролу ($65.3 \pm 6.5\%$) (Графикон 31).

У оквиру интеракције PL-MSС и mMØ испитиван је и утицај mMØ на експресију површинских молекула и продукцију цитокина од стране PL-MSС.

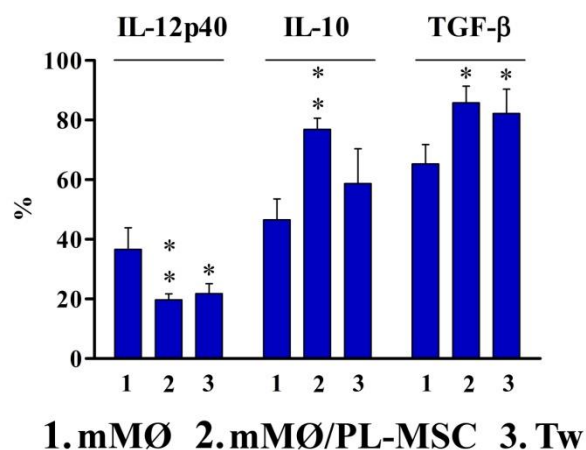
Нађено је да mMØ доводе до смањења експресије CD73 молекула на PL-MSC у ко-култури са директним контактом ($57.2 \pm 9.8\%$) у односу на контролу ($81.3 \pm 9.7\%$), као и до повећања експресије CD39 ($50.3 \pm 10.1\%$) у односу на контролу ($16.0 \pm 3.2\%$). Слично је уочено и за IDO-1 чија је експресија на PL-MSC у ко-култури са директним контактом ($56.7 \pm 11.3\%$) и у систему са уметком ($41.5 \pm 8.3\%$) била повећана у односу на контролу ($16.4 \pm 3.3\%$). Ефекат mMØ на продукцију интрацелуларних цитокина (IL-12p40, IL-10 и TGF- β) од стране PL-MSC није се значајно разликовао у односу продукцију ових цитокина у култури самих PL-MSC (Графикон 32).



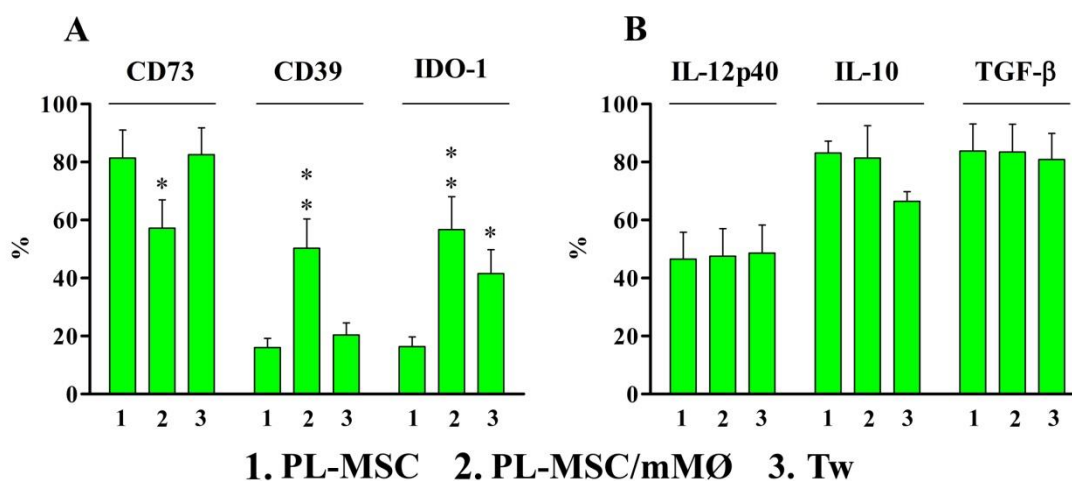
Слика 16. Морфолошке карактеристике mMØ у култури. mMØ, култура M-CSF индукованих MØ; PL-MSC/mMØ, изглед ћелија у ко-култури са директним контактом; увећање 20x; даљинар 100µm.



Графикон 30. Експресија мембранских CD80, CD86, CD14, CD16, CD206, CD73, CD39 маркера и интрацитоплазматског IDO-1 молекула у mMØ ко-култивисаних са PL-MSC. PL-MSC су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембарном (уметком). Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија \pm SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага (контрола); mMØ/PL-MSC, експресија на mMØ у систему са директним контактом са PL-MSC; Tw, експресија на mMØ из ко-културе са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, *p<0.05, **p<0.01 у односу на mMØ.

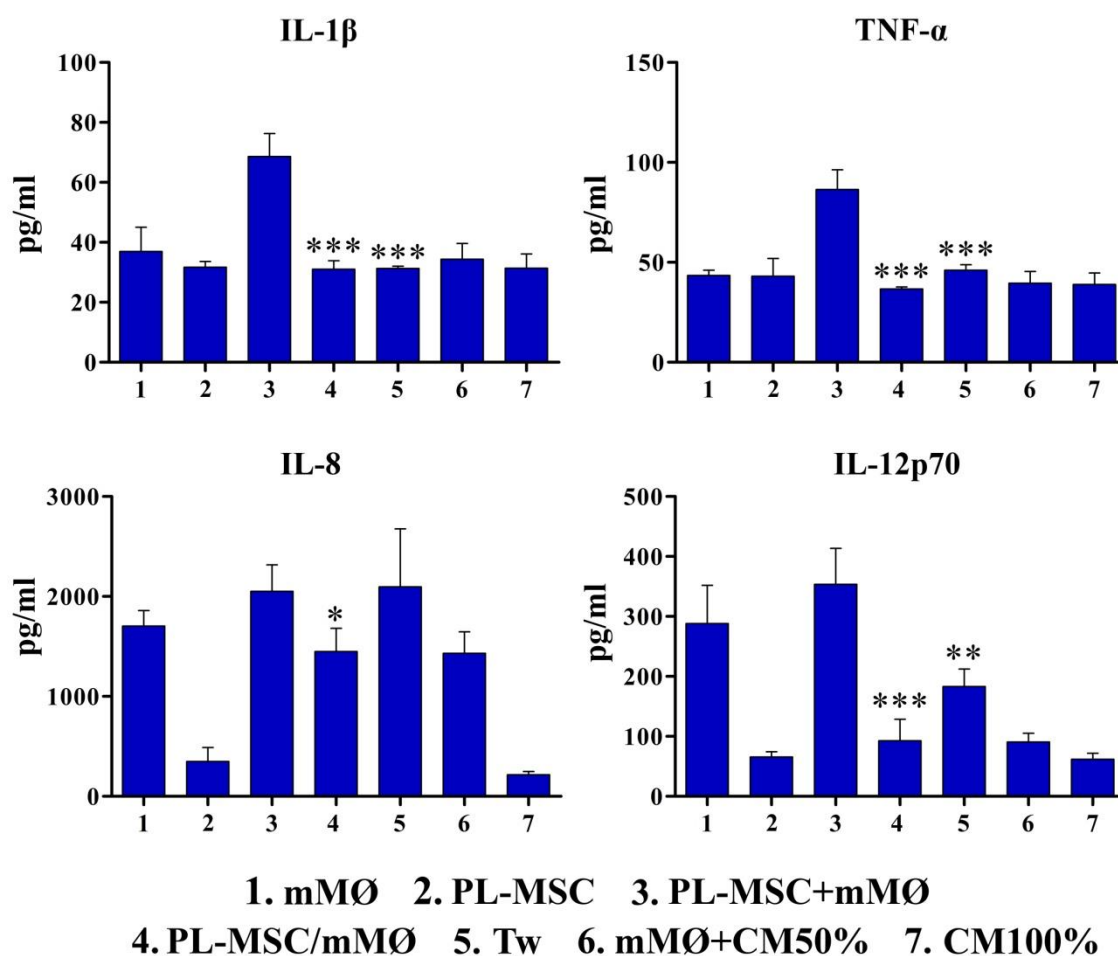


Графикон 31. Експресија интрацелуларних цитокина IL-12p40, IL-10 и TGF-β у МØ ко-култивисаних са PL-MSC. PL-MSC су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембарном (уметком). Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија \pm SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага (контрола); mMØ/PL-MSC, експресија у mMØ из ко-културе са директним контактом са PL-MSC; Tw, експресија у mMØ из ко-културе са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, Dunnett пост-тест, **p<0.01, *p<0.05 у односу на mMØ.

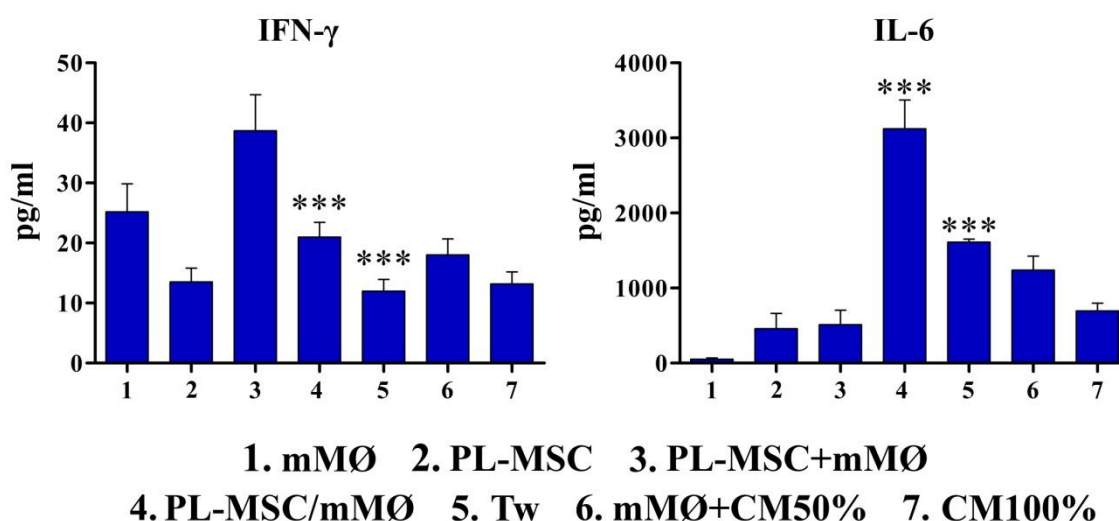


Графикон 32. Експресија мембранских CD73, CD39 маркера, интрацелуларног IDO-1 молекула и IL-12p40, IL-10 и TGF-β цитокина у PL-MSC ко-култивисаних са mMØ. PL-MSC су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембарном (уметком). Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија ± SD (n=3). **A**, мембрански маркери PL-MSC; **B**, интрацелуларна експресија цитокина у PL-MSC; **PL-MSC**, контрола; **mMØ**, M-CSF индукована диференцијација макрофага; **PL-MSC/mMØ**, експресија на PL-MSC у директном контакту са mMØ; **Tw**, експресија на PL-MSC из ко-културе са уметком („Transwell“). One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, **p<0.01, *p<0.05 у односу на PL-MSC.

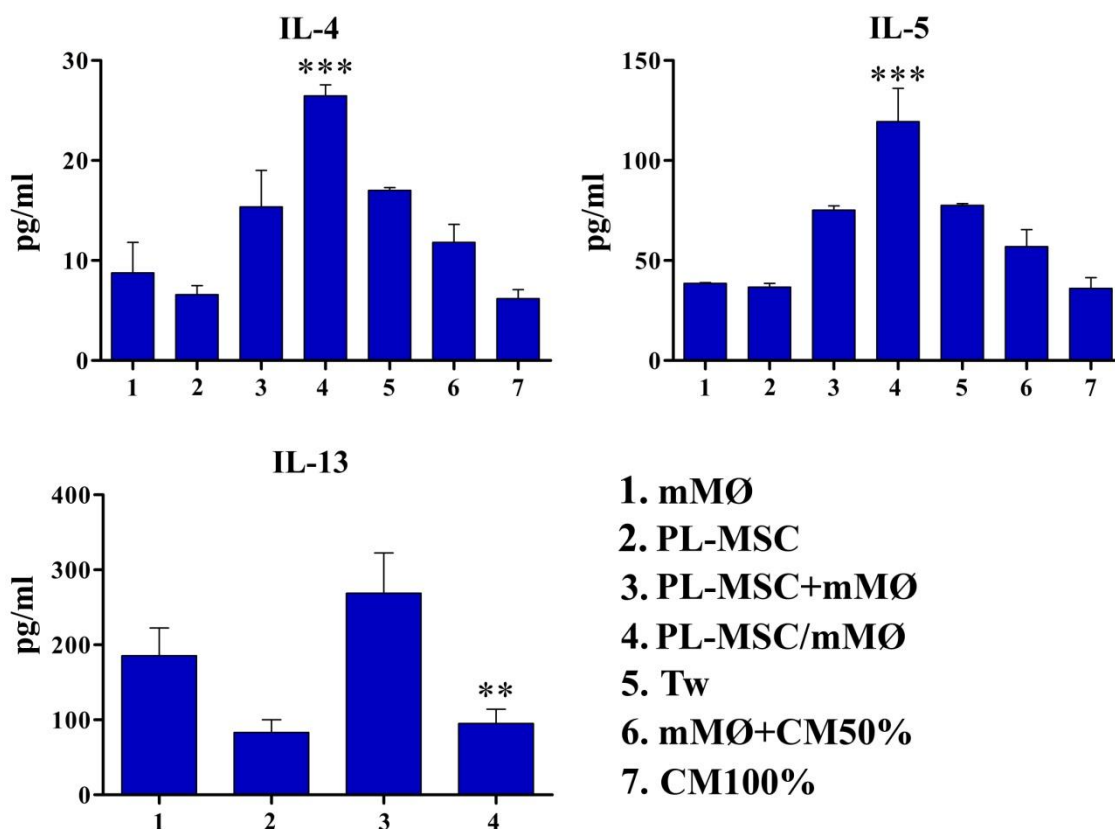
У другом делу испитивања интеракције PL-MSC и mMØ мерена је продукција цитокина у ко-култури ових ћелија при чему је константовано да је продукција Th1 цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12p70 и IFN- γ) била снижена у ко-култури у односу на збир појединачно продукованих цитокина. Продукција IL-1 β је била смањена како у ко-култури са директним контактом (30.1 \pm 2.9pg/ml) тако и у ко-култури са уметком (31.3 \pm 0.8pg/ml) у односу на контролу (68.6 \pm 7.7pg/ml). Слично је било и са продукцијом TNF- α у ко-култури са директним контактом (36.7 \pm 1.0pg/ml) и у ко-култури са уметком (46.0 \pm 2.8pg/ml) у односу на контролу (86.4 \pm 9.8pg/ml), као и са продукцијом IL-12p70 (директан контакт: 92.8 \pm 35.7pg/ml, ко-култура са уметком: 183.1 \pm 29.3pg/ml, контрола: 353.7 \pm 59.8pg/ml). Продукција IL-8 је била снижена једино у ко-култури са директним контактом (1449.3 \pm 232.5pg/ml) у односу на збир продукција овог цитокина у појединачним културама ћелија (2050.4 \pm 265.5pg/ml) (Графикон 33). Продукција IFN- γ у ко-култури са директним контактом (21.0 \pm 2.5pg/ml) и у ко-култури са уметком (12.0 \pm 2.0pg/ml) такође је била снижена у односу на збир појединачно продукованог цитокина (38.7 \pm 6.0pg/ml). Супротно је показано за IL-6. Продукција овог цитокина је била значајно повећана у ко-културама како у директном контакту (3121.3 \pm 382.6pg/ml) тако и у систему са уметком (1612.4 \pm 39.9pg/ml) у односу на збир концентарација продукованог IL-6 у појединачним културама (510.4 \pm 159.7pg/ml) (Графикон 34). Продукција Th2 цитокина (IL-4 и IL-5) била је повећана у ко-култури PL-MSC и mMØ са директним контактом (IL-4: 26.5 \pm 1.1pg/ml и IL-5: 119.4 \pm 16.7pg/ml) у односу на збир ових цитокина у појединачним ћелијским културама (IL-4: 15.4 \pm 3.7pg/ml и IL-5: 75.2 \pm 2.1pg/ml). Међутим, продукција IL-13 је била снижена у ко-култури са директним контактом (95.0 \pm 19.0pg/ml) у односу на контролу (268.8 \pm 53.8pg/ml) (Графикон 35). Када су у питању Трегс цитокини ниво IL-10 је у ко-култури са директним контактом (105.7 \pm 2.5pg/ml) био повећан у односу на контролу (83.2 \pm 6.9pg/ml). Слично је забележено и за TGF- β чији је ниво у ко-култури са директним контактом (576.8 \pm 14.4pg/ml) био повећан у односу на контролу (361.1 \pm 6.2pg/ml). Међутим продукција IL-27 у ко-култури са директним контактом (101.9 \pm 5.8pg/ml) је била снижена у односу на збир цитокина у појединачним културама ћелија (297.2 \pm 12.8pg/ml) (Графикон 36).



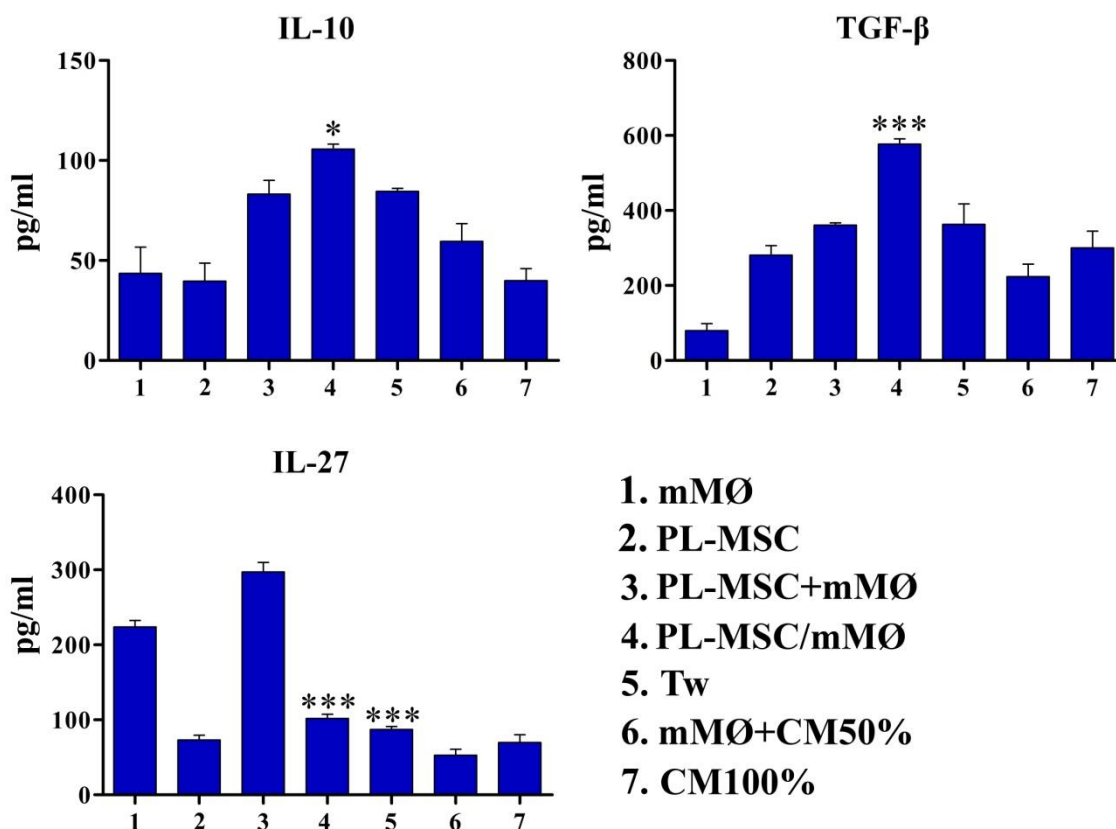
Графикон 33. Продукција IL-1 β , TNF- α , IL-8 и IL-12p70 у ко-култури PL-MSC и mMØ. PL-MSC су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембраном (уметком). Посебно су mMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага; PL-MSC, продукција цитокина у култури PL-MSC; PL-MSC+mMØ, збир нивоа цитокина у појединачним културама; PL-MSC/mMØ, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; Tw, ниво цитокина у ко-култури са уметком („Transwell“); mMØ+CM50%, ниво цитокина у култури MØ након третмана са 50%CM PL-MSC; CM100%, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnett* пост-тест, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 у односу на PL-MSC+mMØ.



Графикон 34. Продукција IFN- γ и IL-6 у ко-култури PL-MSC и mMØ. PL-MSC су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембраном (уметком). Посебно су mMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага; PL-MSC, продукција цитокина у култури PL-MSC; PL-MSC+mMØ, збир нивоа цитокина у појединачним културама; PL-MSC/mMØ, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; Tw, ниво цитокина у ко-култури са уметком („Transwell“); mMØ+CM50%, ниво цитокина у култури MØ након третмана са 50%CM PL-MSC; CM100%, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnett* пост-тест, ***p<0.001 у односу на PL-MSC+mMØ.



Графикон 35. Продукција IL-4, IL-5 и IL-13 у ко-култури PL-MSС и mMØ. PL-MSС су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембраном (уметком). Посебно су mMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSС. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага; PL-MSС, продукција цитокина у култури PL-MSС; PL-MSС+mMØ, збир нивоа цитокина у појединачним културама (контрола); PL-MSС/mMØ, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; Tw, ниво цитокина у ко-култури са уметком („Transwell“); mMØ+CM50%, ниво цитокина у култури MØ након третмана са 50%CM PL-MSС; CM100%, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, **p<0.01 у односу на PL-MSС+mMØ.

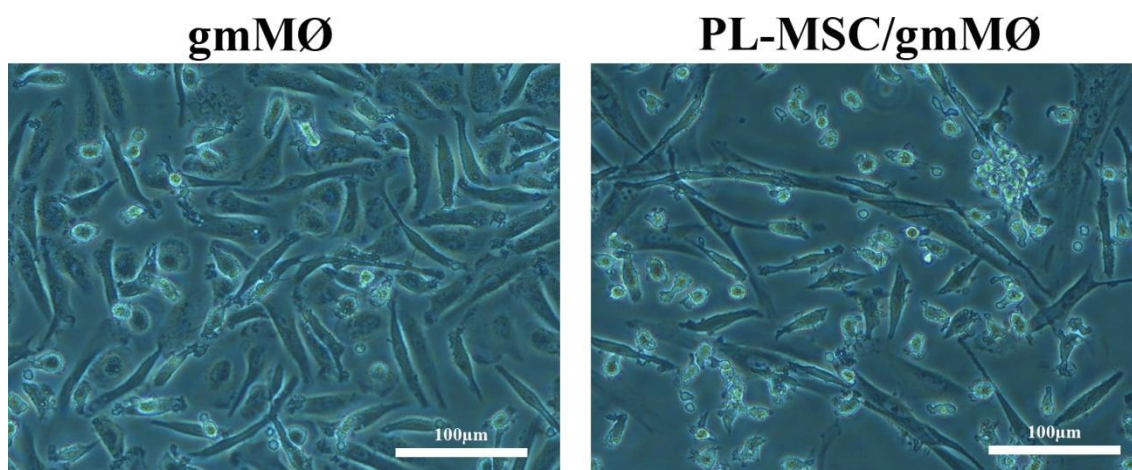


Графикон 36. Продукција IL-10, TGF-β и IL-27 у ко-култури PL-MSС и mMØ. PL-MSС су култивисане са mMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом и у систему са полупропустљивом мембраном (уметком). Посебно су mMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSС. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml ± SD (n=3). mMØ, M-CSF индукована диференцијација макрофага; PL-MSС, продукција цитокина у култури PL-MSС; PL-MSС+mMØ, збир нивоа цитокина у појединачним културама (контрола); PL-MSС/mMØ, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; Tw, ниво цитокина у ко-култури са уметком („Transwell“); mMØ+CM50%, ниво цитокина у култури MØ након третмана са 50%CM PL-MSС; CM100%, продукција цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, *p<0.05 у односу на PL-MSС+mMØ.

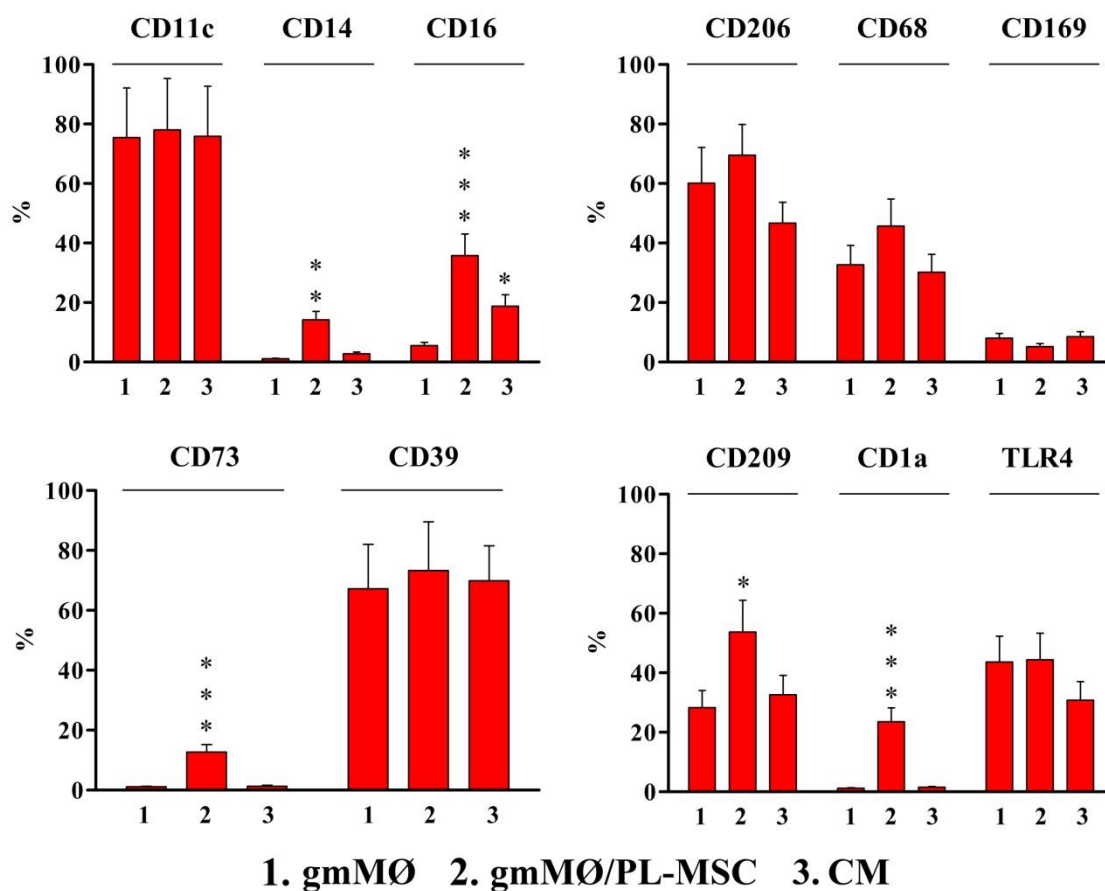
4.16.3. Интеракција PL-MSC и MØ диференцираних са GM-CSF

У трћем сегменту ко-култивисали смо PL-MSC са gmMØ. Резултати показују да у култури gmMØ преовладавају ћелије издужене морфологије налик на фибробласте. С друге стране у ко-култури се повећава удео gmMØ звездастог облика (Слика 17).

Анализом фенотипа показано је да су MØ диференциране са GM-CSF-ом имале високу експресију CD11c молекула ($75.4 \pm 16.7\%$) која се није значајно мењала у ко-култури са PL-MSC, али је зато експресија CD14 на gmMØ била повећана на $14.2 \pm 2.8\%$ у директном контакту са PL-MSC у односу на контролу ($1.1 \pm 0.2\%$). Слично је нађено и за експресију CD16 која је у ко-култури са директним контактом била ($35.8 \pm 7.2\%$), а у ко-култури са уметком ($18.8 \pm 3.8\%$) у односу на контролу ($5.5 \pm 1.1\%$). Међутим, експресија CD206, CD68 и CD169 није била значајно измењена у односу на контролу. PL-MSC су у ко-култури са директним контактом довеле до повећања експресије CD73 на gmMØ ($12.7 \pm 2.5\%$) у односу на контролу ($1.1 \pm 0.2\%$), и CD209 ($53.7 \pm 10.7\%$) у односу на контролу ($28.3 \pm 5.7\%$), као и CD1a ($23.5 \pm 4.7\%$) у односу на контролу ($1.2 \pm 0.2\%$). PL-MSC нису битније утицале на експресију TLR4 молекула од стране gmMØ у односу на базалну експресију овог молекула (Графикон 37).

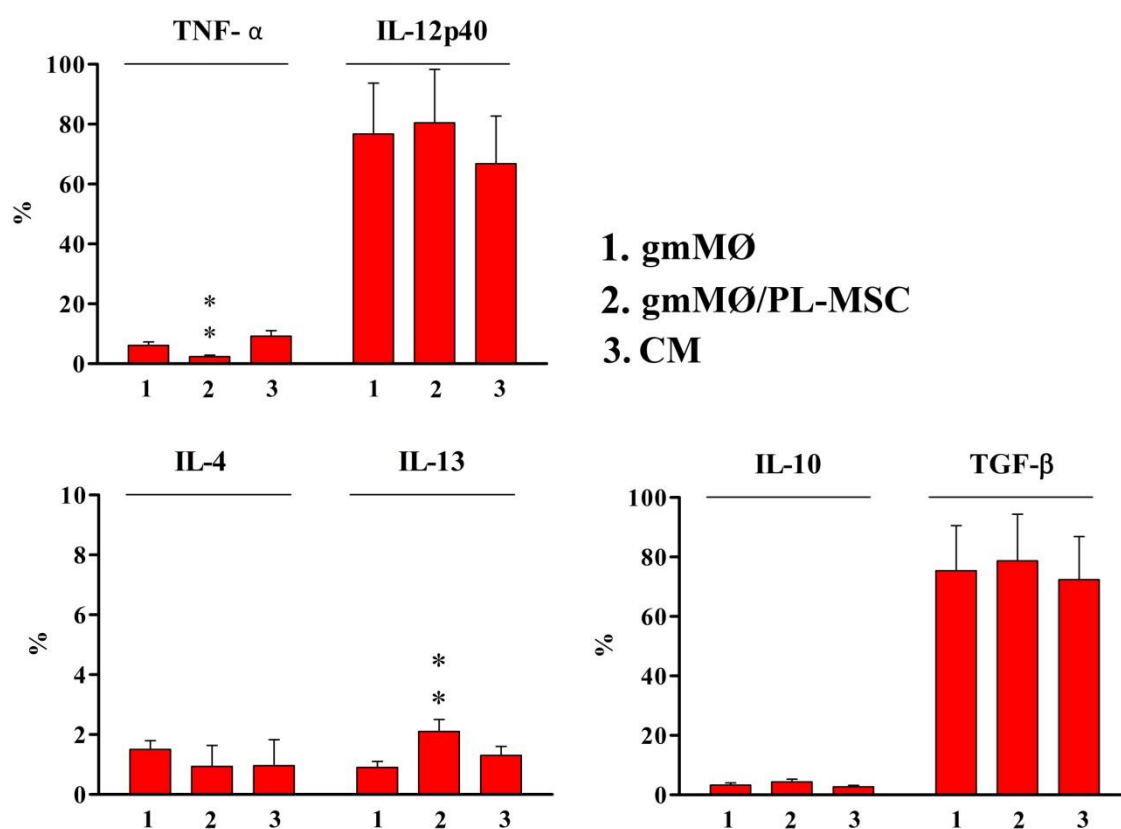


Слика 17. Морфолошке карактеристике gmMØ у култури. gmMØ, култура GM-CSF индукованих MØ; PL-MSC/gmMØ, изглед ћелија у ко-култури са директним контактом; увећање 20x; даљинар 100µm.



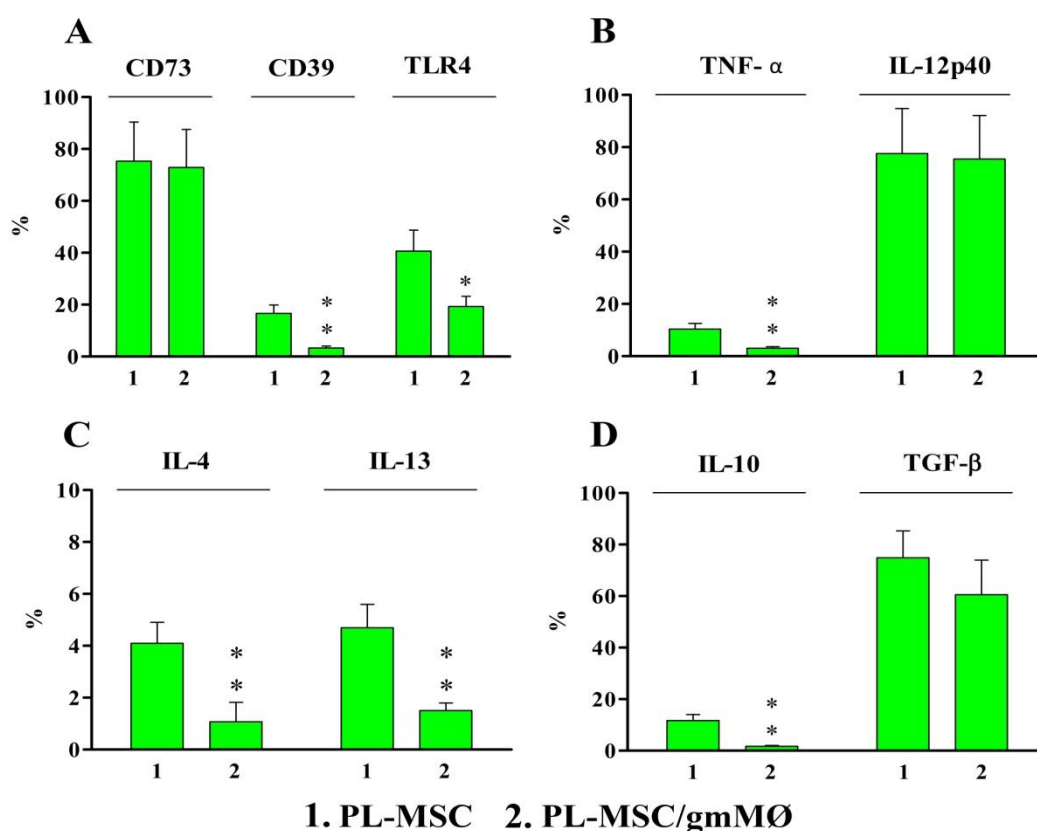
Графикон 37. Експресија CD11c, CD14, CD16, CD206, CD68, CD169, CD73, CD39, CD209, CD1a и TLR4 на gmMØ ко-култивисаних са PL-MSC. PL-MSC су култивисане са gmMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија \pm SD (n=3). gmMØ, GM-CSF индукована диференцијација макрофага (контрола); gmMØ/PL-MSC, експресија молекула на gmMØ у директном контакту са PL-MSC; CM, експресија молекула на gmMØ након третмана са CM PL-MSC. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 у односу на gmMØ.

Када је у питању експресија интрацелуларних цитокина у gmMØ резултати показују да PL-MSC смањују ниво интрацелуларног TNF- α у gmMØ у ко-култури са директним контактом ($2.4 \pm 0.5\%$) у односу на контролу ($6.1 \pm 1.2\%$), а повећавају интрацелуларну експресију IL-13 ($2.1 \pm 0.4\%$) у ко-култури са директним контактом у односу на контролу ($0.9 \pm 0.2\%$), док је интрацелуларна експресија осталих цитокина (IL-12p40, IL-4, IL-10 и TGF- β) остала практично непромењена (Графикон 38).



Графикон 38. Експресија TNF- α , IL-12p40, IL-4, IL-13, IL-10 и TGF- β у gmMØ ко-култивисаних са PL-MSC. PL-MSC су култивисане са gmMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија \pm SD (n=3). gmMØ, GM-CSF индукована диференцијација макрофага (контрола); gmMØ/PL-MSC, експресија цитокина у gmMØ у директном контакту са PL-MSC; CM, експресија цитокина у gmMØ након третмана са CM PL-MSC. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, **p<0.01 у односу на gmMØ.

Резултати такође показују да gmMØ у директном контакту доводе до смањења експресије CD39 ($3.3\pm 0.7\%$) и TLR4 ($19.3\pm 3.9\%$) молекула на PL-MSC у односу на базалну експресију ових молекула (CD39: $16.6\pm 3.3\%$, TLR4: $40.6\pm 8.1\%$). Осим тога, интрацелуларна експресија TNF- α и IL-10 цитокина је била снижена у PL-MSC у контакту са gmMØ (TNF- α : $3.0\pm 0.6\%$ у односу на контролу $10.4\pm 2.1\%$; IL-10: $1.7\pm 0.3\%$ у односу на контролу $11.7\pm 2.3\%$), као и експресија IL-4 и IL-13 (IL-4: $1.1\pm 0.8\%$ у односу на контролу $4.1\pm 0.8\%$; IL-13: $1.5\pm 0.3\%$ у односу на контролу $4.7\pm 0.9\%$) док је експресија p40 субјединице IL-12 и TGF- β остала непромењена (Графикон 39).



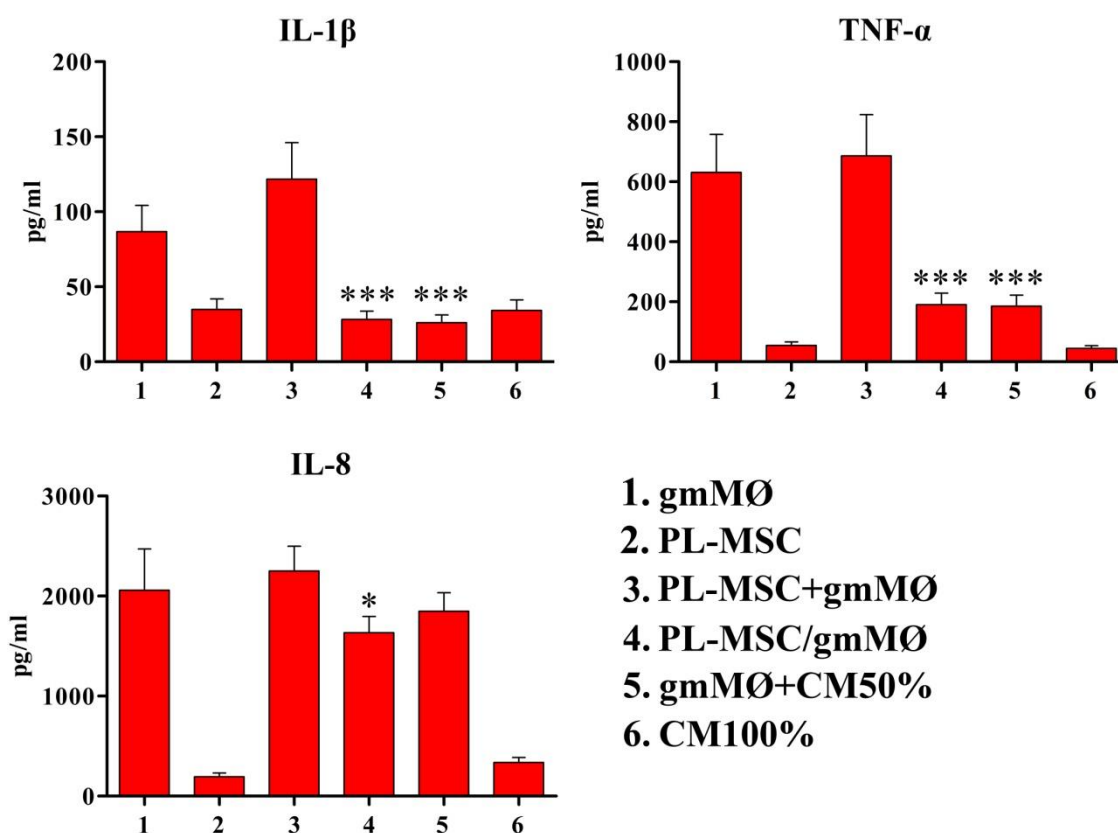
Графикон 39. Експресија CD73, CD39, TLR4, TNF- α , IL-12p40, IL-4, IL-13, IL-10 и TGF- β на/у PL-MSC ко-култивисаних са gmMØ. PL-MSC су култивисане са gmMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Резултати су приказани као средња вредност процента позитивних ћелија \pm SD (n=3). **A**, мембрански маркери PL-MSC; **B**, **C** и **D**, интрацелуларна експресија цитокина у PL-MSC; **PL-MSC**, експресија маркера/citoкина на/у PL-MSC; **PL-MSC/gmMØ**, експресија маркера/citoкина на/у PL-MSC у директном контакту са gmMØ. *Student t*-тест, **p<0.01, *p<0.05 у односу на PL-MSC.

У оквиру испитивања међусобне интеракције PL-MSС и gmMØ анализирана је продукција цитокина у ко-културама ових ћелија и показано да је продукција Th1 цитокина (IL-1 β , TNF- α и IFN- γ) у ко-култури са директним контактом (IL-1 β : 28.2 \pm 5.6pg/ml; TNF- α : 190.5 \pm 38.1pg/ml и IFN- γ : 45.1 \pm 9.0pg/ml) била снижена у односу на контролу (IL-1 β : 121.7 \pm 24.3pg/ml; TNF- α : 686.2 \pm 137.2pg/ml и IFN- γ : 137.3 \pm 27.5pg/ml). Слично је нађено и у култури gmMØ третираним са CM PL-MSС. Продукција IL-8 била снижена једино у ко-култури са директним контактом (1632.8 \pm 163.3pg/ml) у односу на контролу (2252.0 \pm 247.7pg/ml). Резултати такође показују да је продукција IL-6 била повећана како у ко-култури са директним контактом (4482.9 \pm 896.6pg/ml) тако и од стране gmMØ третираних са CM PL-MSС (2171.7 \pm 434.3pg/ml) у односу на контролу (489.2 \pm 97.8pg/ml), с тим да је продукција овог цитокина у ко-култури са директним контактом била значајно виша у односу на детектовану концентрацију у култури CM третираних gmMØ (Графикон 40 и Графикон 41).

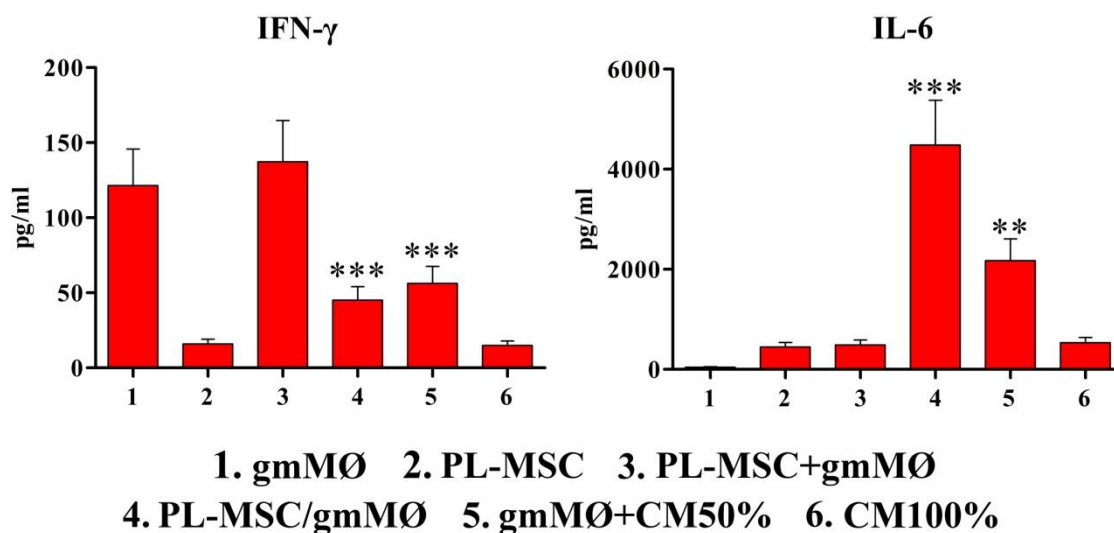
Када је у питању продукција Th2 цитокина у ко-култури PL-MSС и gmMØ резултати показују да је у ко-култури са директним контактом ћелија ниво IL-4 повећан на 52.2 \pm 10.4pg/ml, у односу на збир продукованог цитокина у појединачним ћелијским културама (20.0 \pm 4.0pg/ml), али је продукција IL-13 била снижена у ко-култури са директним контактом (101.1 \pm 20.2pg/ml) у односу на контролу (178.3 \pm 35.7pg/ml). У култури gmMØ третираних са CM PL-MSС није дошло до модулације продукције ни једног од ова два цитокина (Графикон 42).

Слично модулацији Th2 цитокина, продукција TGF- β је била повећана у ко-култури са директним контактом ћелија (546.1 \pm 109.2pg/ml) у односу на збир продукције цитокина у појединачним културама (317.1 \pm 63.4pg/ml), при чему је ово повећање у систему са директним контактом било значајно више у односу на ниво детектованог TGF- β у култури CM третираних gmMØ.

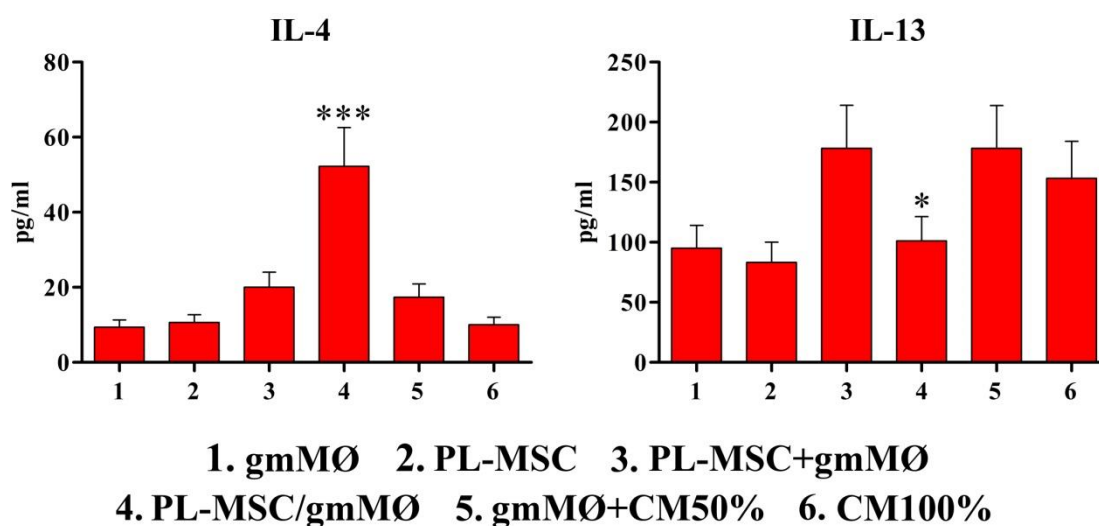
На крају, продукција IL-27 је била снижена у ко-култури PL-MSС и gmMØ са директним контактом (126.6 \pm 25.3pg/ml) у односу на збир концентрација овог цитокина у појединачним културама (237.7 \pm 47.5pg/ml), док као и у случају са TGF- β , CM PL-MSС није довео до битнијих модификација продукције оба ова цитокина од стране gmMØ (Графикон 43).



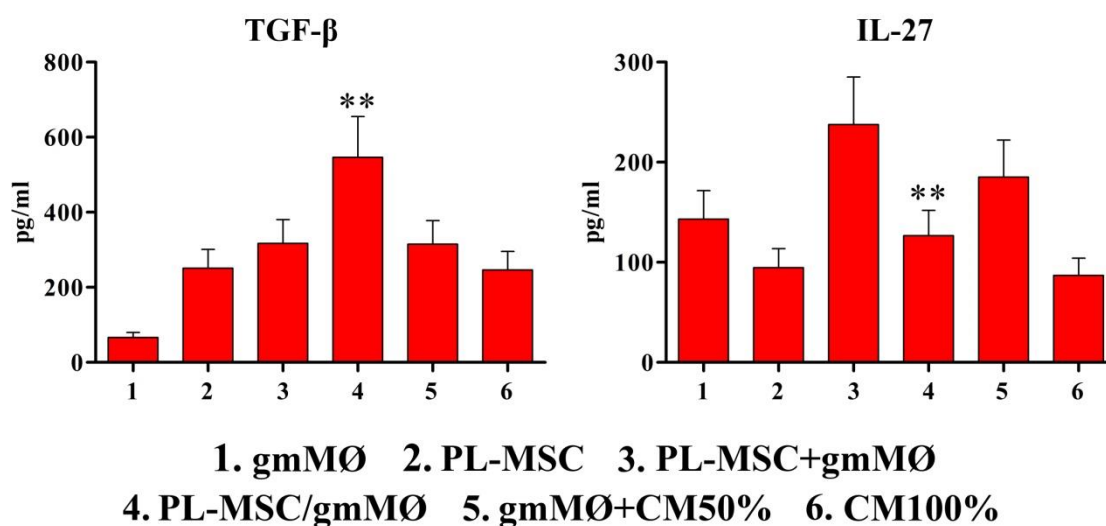
Графикон 40. Продукција IL-1 β , TNF- α и IL-8 у ко-култури PL-MSc и gmM \emptyset . PL-MSc су култивисане са gmM \emptyset у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmM \emptyset третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSc. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). **gmM \emptyset** , GM-CSF индукована диференцијација макрофага; **PL-MSc**, ниво цитокина у култури PL-MSc; **PL-MSc+gmM \emptyset** , збир нивоа цитокина у појединачним културама (контрола); **PL-MSc/gmM \emptyset** , ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; **gmM \emptyset +CM50%**, ниво цитокина у култури M \emptyset након третмана са 50%CM PL-MSc; **CM100%**, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, *p<0.05 у односу на PL-MSc+gmM \emptyset .



Графикон 41. Продукција IFN- γ и IL-6 у ко-култури PL-MSC и gmM \emptyset . PL-MSC су култивисане са gmM \emptyset у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmM \emptyset третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). gmM \emptyset , GM-CSF индукована диференцијација макрофага; PL-MSC, ниво цитокина у култури PL-MSC; PL-MSC+gmM \emptyset , збир нивоа цитокина у појединачним културама; PL-MSC/gmM \emptyset , ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; gmM \emptyset +CM50%, ниво цитокина у култури M \emptyset након третмана са 50%CM PL-MSC; CM100%, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, **p<0.01 у односу на PL-MSC+gmM \emptyset .



Графикон 42. Продукција IL-4 и IL-13 у ко-култури PL-MSC и gmMØ. PL-MSC су култивисане са gmMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-MSC. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). **gmMØ**, GM-CSF индукована диференцијација макрофага; **PL-MSC**, ниво цитокина у култури PL-MSC; **PL-MSC+gmMØ**, збир нивоа цитокина у појединачним културама (контрола); **PL-MSC/gmMØ**, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; **gmMØ+CM50%**, ниво цитокина у култури gmMØ након третмана са 50%CM PL-MSC; **CM100%**, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, ***p<0.001, *p<0.05 у односу на PL-MSC+gmMØ.



Графикон 43. Продукција TGF- β и IL-27 у ко-култури PL-MSC** и gmMØ.** PL-**MSC** су култивисане са gmMØ у току 5 дана у ко-култури са директним контактом. Посебно су gmMØ третиране са кондиционираним медијумом (CM) PL-**MSC**. Резултати су приказани као средња вредност продукције цитокина изражена у pg/ml \pm SD (n=3). **gmMØ**, GM-CSF индукована диференцијација макрофага; **PL-**MSC****, ниво цитокина у култури PL-**MSC**; **PL-**MSC**+gmMØ**, збир нивоа цитокина у појединачним културама; **PL-**MSC**/gmMØ**, ниво цитокина у ко-култури са директним контактом; **gmMØ+CM50%**, ниво цитокина у култури gmMØ након третмана са 50%CM PL-**MSC**; **CM100%**, ниво цитокина у 100%CM. One-way ANOVA, *Dunnnett* пост-тест, **p<0.01 у односу на PL-**MSC**+gmMØ.

5. Дискусија

5.1. Карактеризација PL-MSC

Први део ове докторске дисертације се односио на успостављање и фенотипску карактеризацију PL-MSC ћелијских линија у оквиру кога је испитивана експресија површинских маркера, степен пролиферације, способност формирања колонија као и способност диференцијације у друге типове ћелија мезенхимског порекла.

PL-MSC су успостављене из PL које су се разликовале у односу на величину и клиничку презентацију, а према протоколу који је описан за MSC из других ткива и органа, укључујући и различите денталне структуре (Gneschi и Melo 2009, Karamzadeh *и сар.* 2012, Alkhalil *и сар.* 2015). Сличан протокол, који је детаљно описан у поглављу Материјал и методе, је коришћен и за изолацију PL-MSC у нашем претходном раду (Ђокић *и сар.* 2012). Ови резултати генерално показују слична фенотипска својства PL-MSC независно од типа лезије из којих су изоловане (Marković *и сар.* 2016), а која се генерално стабилизују после четврте пасаже у култури. Тада је контаминација другим ћелијама хематопоеетског порекла (недетектабилна експресија CD45, CD34, CD14 и HLA-DR), занемарљива па су PL-MSC тада најпогодније за све врсте испитивања. Зато су најчешће у овој фази оне фенотипски и функционално окарактерисане и коришћене за интеракцију са фагоцитима или инфламацијским ћелијама из PL *in vitro*.

PL-MSC линије, које су успостављене у дужем временском периоду (укупно 17 линија), су показивале фибробластоидну морфологију, типичну за друге MSC. На основу ових својстава али и ограничене способности диференцијације у поједине типове ћелија мезенхимског порекла (остеобласти, хондроцити, адипоцити) PL-MSC се могу сврстати у категорију матичних ћелија мезенхимских-стромалних ћелија, како је то предложено за овакав тип MSC (Dominici *и сар.* 2006).

У оквиру карактеризације успостављених PL-MSC линија анализом експресије идентификационих површинских и интрацелуларних маркера типичних за MSC, установљено је да су PL-MSC, након четврте пасаже у преко 90% експримирали CD90, CD105 и CD73, што је уз одсуство маркера хематопоеетских

ћелија у складу са литературним подацима којима се од 2006. године дефинише минимум критеријума за матичност мезенхимских-стромалних ћелија (Dominici *u cap.* 2006).

Према структури, CD90 представља G протеин који је усидрен на спољашњој површини ћелијске мембране. Овај протеин је од раније познат као маркер лимфоцита тимусног порекла (тимоцита) па је отуда и означен као Thy-1 (Naegyfar и Hoskin 2004). Његова основна улога се огледа у међућелијској интеракцији, укључујући адхезију ћелија за поједине компоненте екстрацелуларног матрикса. Такође је маркер ћелија током процеса онтогенезе (Saalbach *u cap.* 2000). Познато је да степен експресије CD90 варира у зависности од типа ћелија на којима је испољен. Тако преко 95% BM-MSС, AT-MSС и MSС из коже (d-MSС) експримирају овај молекул, док су свега 38% MSС из срца (H-MSС) CD90⁺ (Riekstina *u cap.* 2009). На популацији денталних мезенхимских-стромалних матичних ћелија показано је да 75% DPSC експримирају CD90, 94% DFSC и скоро све PL-MSС испољавају CD90 (Ђокић *u cap.* 2012). Популације PL-MSС које су испитиване у овом раду, такође поседују висок проценат експресије CD90 (97.3±1.7%) што указује да је CD90 можда битнији за адхезивност MSС у току процеса инфламације у односу на MSС из здравих денталних ткива.

Други важан идентификациони молекул MSС је CD105. То је интегрални протеин ћелијске мембране за који се јаким афинитетом везују TGF-β1 и TGF-β3 (Cheifetz *u cap.* 1992). Показано је да различите популације MSС (BM-MSС, AT-MSС, d-MSС и H-MSС) у преко 95% експримирају CD105 (Riekstina *u cap.* 2009), као и PL-MSС (око 98%), док је експресија овог молекула на појединим субпопулацијама денталних MSС нешто другачија (DPSC - око 75%, DFSC – око 86%) (Ђокић *u cap.* 2012). Експресија CD105 на ћелијама изолованим из PL које смо користили у испитивањима интеракције са фагоцитима износила је 90.2±5.7%. Ови налази указују да је функција овог молекула битна за имунорегулацијска својства PL-MSС имајући у виду кључни значај TGF-β у овим процесима (Travis и Sheppard 2014).

Трећи маркер по важности је CD73 чија је експресија иницијално описана на субпопулацији Т и В лимфоцита (Thompson *u cap.* 1987, Peola *u cap.* 1996, Airas *u cap.* 1997, Yamashita *u cap.* 1998, Yang *u cap.* 2005). CD73 је по први пут идентификован на популацији MSС 2001. године од стране Barry и сар., да би тек

2006. постао део групе маркера којима се дефинише минимум критеријума које је потребно да испуњава анализирана популација ћелија како би се могла сврстати у групу MSC (Dominici *u cap.* 2006). Показано је да BM-MSC, AT-MSC, d-MSC и H-MSC експримирају CD73 у високом проценту (преко 95%) (Riekstina *u cap.* 2009). Експресија на PL-MSC у нашим испитивањима износила је $94.8 \pm 4.7\%$ што је такође у складу са наведеним литературним подацима.

Осим основних, дискриминативних маркера, на PL-MSC ћелијским линијама смо показали високу експресију CD166 и CD56 молекула, затим умерен степен експресије CD146, док је најнижи степен позитивности показан за CD39, SSEA-4 и STRO-1 маркере. Највећа варијабилност експресије показана је за CD44 молекула ($26.6 \pm 19.6\%$).

Што се тиче CD166, иницијално је идентификован као адхезиони молекул активираних леукоцита (ALCAM). Представља трансмембрански гликопротеин од 110 kD и припада суперфамилији имуноглобулина заједно са CD146 (MUC18) и V-CAM молекулима (Swart 2002). Улога ових адхезионих молекула из суперфамилије имуноглобулина преваходно се огледа у формирању и очувању типичне архитектуре ткива тј. неурогенези, хематопоези, имунским механизмима и прогресији тумора (Konno *u cap.* 2001, Swart 2002). Показано је да CD166 посредује у хомотипским интеракцијама туморских ћелија као и хетеротипским интеракцијама туморских ћелија и ендотелних ћелија крвних судова (Ofori-Acquah и King 2008, Weidle *u cap.* 2010). Експресија CD166 је показана и на различитим субпопулацијама MSC. Тако на пример BM-MSC и AT-MSC имају сличну CD166 експресију која се креће око 90% (De Ugarte *u cap.* 2003), код DPSC она износи око 89%, DFSC око 96%, а PL-MSC око 92% (Ђокић *u cap.* 2012). Наше PL-MSC експримирају CD166 у $87.8 \pm 3.7\%$, што је у складу са већ публикованим подацима из исте лабораторије.

Неурални адхезиони молекул (енгл. *neural cell adhesion molecule*, NCAM), у CD номенклатури познатији као CD56, је 120 kDa гликопротеин везан за ћелијску мембрану преко гликозилфосфатидил инозитола. Експримиран је од стране NK ћелија (80-90%) и активираних Т лимфоцита (Roothans *u cap.* 2013). На популацији BM-MSC је показано да експресија CD56, корелира са експресијом CD271 и присутна је на малом проценту ћелија (0.5%), такође CD271+CD56+ ћелије имају високи остеогени потенцијал (Battula *u cap.* 2009). Ми смо показали да PL-MSC

такође експримирају CD56 с тим да је проценат позитивних ћелија јако висок ($93.9 \pm 1.6\%$), што би указивало да PL-MSC имају висок степен диференцијације у правцу остеобласта. Таква претпоставка је и у сагласности са добијеним резултатима.

Од осталих маркера, PL-MSC експримирају CD146 који је по структури трансмембрански гликопротеин из суперфамилије имуноглобулина (Lehmann *u cap.* 1989, Sers *u cap.* 1993). Припада групи адхезионих молекула и његова основна функција се огледа у међусобној интеракцији ћелија (Bardin *u cap.* 2001). У литератури је показано да MSC у зависности од порекла, показују различит степен експресије CD146. Тако приближно 50% DPSC и PL-MSC односно око 18% DFSC експримира CD146 (Томић *u cap.* 2011, Ђокић *u cap.* 2012). У овом пројекту коришћене су PL-MSC које су имале умерену до високу експресију CD146 ($71.0 \pm 8.9\%$).

Као што је напоменуто најнижи степен експресије забележен је за CD39, STRO-1 и SSEA4 маркере. STRO-1, за разлику од њему сродног STRO-3 маркера, који је по структури неспецифична ткивна алкална фосфатаза, и STRO-4, који припада групи протеина топлотног шока (енгл. *Heat Shock protein*) (Lin *u cap.* 2011), представља маркер MSC (Kolf *u cap.* 2007). Експресија STRO-1 се разликује међу различитим субпопулацијама MSC. Тако на пример само 4.3% DPSC, 4.4% DFSC и 9.3% PL-MSC експримирају STRO-1 (Ђокић *u cap.* 2012). Ми смо на нашој популацији PL-MSC детектовали експресију STRO-1 од чак $18.1 \pm 3.4\%$, што може бити последица коришћења другог лота anti-STRO-1 антитета са већим афинитетом везивања. Генерално ниска експресија STRO-1 на денталним MSC може указивати на ограничени потенцијал диференцијације ових ћелија, а који се можда додатно повећава у току инфламације.

Ектонуклеозид трифосфат дифосфохидролаза (ENTPD1) или познатија као CD39 маркер је интегрални мембрански протеин чија је основна функција хидролиза АТФ до АМФ (Wang и Guidotti 1998). Примарно је идентификован као површински маркер на *Epstein-barr* (EBV) вирусом трансформисаним В лимфобластоидним ћелијама (Rowe *u cap.* 1982). Експримиран је од стране активираних В ћелија (Maliszewski *u cap.* 1994), Т и НК ћелија, ендотелних ћелија крвних судова, МØ и DC (Kansas *u cap.* 1991). Базална (неиндукована) експресија

CD39 на популацији PL-MSC, које смо користили у овим испитивањима, била је ниска и износила је $14.0 \pm 1.9\%$.

Фазно-специфични ембрионални антиген 4 (SSEA4) који је по структури гликопротеин са карбохидратним језгром, експримиран је првенствено од стране недиференцираних ембрионских ћелија (Fox *u cap.* 1984). Показано је да током развића и диференцијације долази до смањења експресије SSEA4 и повећања експресије SSEA1 (Henderson *u cap.* 2002). Међутим, експресија SSEA4 се одржава и током развића, што је поткрепљено чињеницом да је овај молекул присутан на различитим популацијама MSC. Тако на пример око 70% BM-MSC експримира SSEA4 у *in vitro* култури (Gang *u cap.* 2007). Такође је експресија SSEA-4 и STRO-1 показана и на MSC изолованим из периодонталног лигамента (Gang *u cap.* 2007, Trubiani *u cap.* 2010). Наше PL-MSC су такође SSEA4+, с тим да је процентуална заступљеност овог маркера најнижа међу свим осталим анализираним маркерима и креће се у распону $6.3 \pm 1.8\%$. Ови налази, заједно са експресијом STRO-1, додатно упућују на претпоставку да је матичност ове субпопулације MSC ограничена.

Поред ових маркера, интересантни резултати су добијени за CD44 чија је експресија знатно варијала између различитих линија од 9.1% до 55.5%. CD44 је површински гликопротеин који посредује у међућелијским интеракцијама, ћелијској адхезији и миграцији. За CD44 је показано да је експримиран на мембрани лимфоцита и фибробласта и да заправо представља један од главних рецептора за хијалуронан (Aruffo *u cap.* 1990, Culty *u cap.* 1990, Lesley *u cap.* 1990). Осим тога, CD44 је исказан и на хематопоетским ћелијама (Stauder *u cap.* 1995), делимично на PBMC (Salles *u cap.* 1993) као и у реактивним лимфним чворовима (Arch *u cap.* 1992, Stauder *u cap.* 1995). Обзиром да динамика експресије овог маркера на MSC није довољно испитана, за сада немамо одговор шта је у основи варијабилне експресије CD44 на PL-MSC.

Осим способности да адхерирају за подлогу, експресије основних специфичних површинских маркера за MSC као и експресије појединих маркера карактеристичних за ембрионске ћелије (SSEA4), испитали смо и какав је степен пролиферације, односно које је време потребно да PL-MSC достигну потпуну конfluентност. Овај податак био је неопходан у циљу одређивања капацитета ћелијских линија за самообнављање и планирања динамике будућих испитивања. Праћењем пролиферације ћелија, показали смо да се у току прва 3 дана број ћелија

споро повећавао што је у литератури познато као спора „lag“ фаза раста. Затим је следио период интензивне пролиферације (експоненцијални раст) који је у просеку трајао од 4. до 9. дана култивације. Ћелије су достигале плато у просеку између 7. и 9. дана. Овакав сигмоидни карактер криве раста временски је јако мало варирао међу анализираним линијама PL-MSС, тако да је просечно време за које је долазило до дуплирања популације (PDT) износило 1.4 ± 0.4 дана. Оваква кинетика раста је бржа у односу на неке друге типове денталних MSС (Томић *и сар.* 2011) што може указивати да у току инфламације постоји потреба за њиховим бржим умножавањем. Осим теста пролиферације, показали смо да PL-MSС имају способност да формирају колоније, што је још један од критеријума којима се дефинише минимум услова за њихову матичност (Dominici *и сар.* 2006).

5.2. *In situ* локализација PL-MSС

Једно од најинтригантнијих питања које се односи на порекло MSС у ткиву је остало и даље нерешено и представља изазов за истраживаче. Због тога је и један од наших циљева постављених у овој студији био да испитамо каква је *in vivo* експресија маркера којима су идентификоване PL-MSС *in vitro*, и који би од њих могао бити погодан за идентификацију MSС у PL. При томе се пошло од сазнања да су MSС у ткиву, укључујући и денталну пулпу, популација перицита (Corselli *и сар.* 2012) али да највећи број литературних података показује да MSС маркери нису ћелијски специфични (Sharpe 2016). Такође, инфламацијско ткиво као што су PL, може бити стимулатор миграције MSС из крви на место запаљења као и да васкуларна мрежа у PL може имати другачије карактеристике у односу на здраво везивно ткиво периодонталног лигамента (Schulz *и сар.* 2009, Virtej *и сар.* 2013). На основу тога се могло претпоставити да се миграторне MSС могу наћи и ван васкуларних структура.

У оквиру ове студије коришћен је и панел додатних маркера укључујући CD271, α -SMA (који детектује актин глатко-мишићних ћелија) и CD34 (маркер хематопоетских матичних ћелија али и ендотелних ћелија). Нажалост, упркос великом напору, укључујући и коришћење фиксираних ткивних пресека, где је морфологија боље сачувана у односу на криостатске пресеке, они нису уродили плодом. Заправо, наша дилема је и даље остала иста као и пре почетка

истраживања а то је да нисмо сигурни да ли су перицити, или субпопулација перицита једини могући кандидати за MSC у PL *in vivo*.

Први маркер који је коришћен је CD146. Одабир је био на основу података да је он заједно са NG2 (антиген олигодендроцита из нервног ткива) и β рецептором за фактор раста порекла тромбоцита (енгл. *platelet-derived growth factor receptor beta* – PDGFR β) маркер перицита и један од најчешће коришћених маркера за изолацију перицита из различитих ткива (Crisan *u cap.* 2008, Bianco 2014, Vezzani *u cap.* 2016). До сада је познато да је CD146 испољен на ендотелу крвних судова, с тим да поједини периферни нерви, глатке мишићне ћелије такође могу бити CD146⁺ (Sers *u cap.* 1994). Ендотелне ћелије венула, капилара, артериола, затим перицити и глатке мишићне ћелије крвних судова синовијалне мембране зглоба у RA показују јаку позитивност на CD146 (Middleton *u cap.* 2005). У ткиву миокарда CD34⁺ ћелије ендотела капилара су окружене CD146⁺ ћелијама, при чему ова експресија корелира са NG2 позитивним перицитима (Crisan *u cap.* 2008). У Кроновој болести, CD146 је додатно експримиран и на моноклеарном ћелијском инфилтрату (Middleton *u cap.* 2005). Повећана експресија CD146 је такође детектована и код неких неоплазми као што су меланоми, Капоши сарком или леиомиосарком (Shih 1999). Иако је CD146 маркер ендотелних ћелија, показано је да је његова експресија одсутна на ендотелу крвних судова хемангиома (Li *u cap.* 2003). Наши резултати су показали интензивну експресију CD146 примарно везана за ендотелне ћелије, капилара и посткапиларних венула. Густина молекула је била изразита што се на ткивним пресецима PL огледала као снажна пребојеност. Број позитивних крвних судова је варирао у зависности од основне хистолошке слике. Посебно су анализирани перицити и оно што је за нас било помало изненађујуће је да је значајан број перицита био CD146-негативан. Интересантно је да смо на пресецима ткива укалупљених у парафин, уочили позитивност и на ћелијама инфламацијског инфилтрата али је она била значајно слабија у односу на ендотел крвних судова и периците.

Следећи маркер који је анализиран је CD90. За CD90 је показано да је испољен на фибробластима, нервним ћелијама и хематопоетским матичним ћелијама (енгл. *Hematopoietic stem cells*, HSC) које су уједно и CD34⁺ (Saalbach *u cap.* 2000). Осим на популацији HSC, експресија CD90 маркера је показана и на популацији прогениторских ћелија хепатоцита у ткиву хумане феталне јетре

(Masson *u cap.* 2006), матичним ћелијама из фоликула длаке и кератиноцитима показано је да CD90⁺ кератиноцити имају већу стопу раста и способност формирања ћелијских колонија у односу на CD90⁻ кератиноците (Nakamura *u cap.* 2006, Mercati *u cap.* 2009). У ткиву PL које смо испитивали, позитивност на CD90 је уочена доминантно на васкуларним елементима (артериоле, капилари и пост-капиларне венуле), а интензитет бојене реакције је био снажан. Осим на крвним судовима, CD90 је био експримиран и у строми PL (периваскуларни регион) где је степен експресије био умереног интензитета. Пажљивом анализом обојених структура и појединачних ћелијских елемената уочили смо да је експресија CD90 присутна на фибробластима, перицитима, глатко-мишићним ћелијама, појединачним ћелијама фибробластоидне морфологије, али слабије и на неким инфилтришућим ћелијама. Према томе, на основу овако широке дистрибуције CD90 молекула, осим перицита, ни једна од других CD90⁺ ћелија не би могла бити кандидат за MSC.

Када је у питању експресија CD105 литературни подаци показују да је овај молекул преваходно испољен на ендотелним ћелијама пролиферишућих крвних судова (крвни судови ембриона или новоформираним крвним судовима у току зарастања ране) (Duff *u cap.* 2003), затим на крвним судовима у инфарктном ткиву (Krupinski *u cap.* 1996), кожи захваћеној псоријазом (van de Kerkhof *u cap.* 1998), у ткиву инфламиране синовије зглоба код RA (Honsawek *u cap.* 2009) али и у строми и у близини крвних судова различитих тумора (Burrows *u cap.* 1995, Kumar *u cap.* 1999, Yu *u cap.* 2007, Wang *u cap.* 2013). Код RA и остеоартритиса (OA) показано је да је експресија CD105 детектована у нивоу ендотела мањих крвних судова као што су венуле, капилари и артериоле, али су субинтимални МØ и фибробласти такође CD105⁺ (Middleton *u cap.* 2005). Анализирајући криостатске и парафинске препарате наших PL запазили смо да је експресија CD105 маркера заступљена на крвним судовима, првенствено у нивоу ендотела артериола, капилара и пост-капиларних венула. Интересантно је да је експресија на перицитима била слабија у односу на ендотелне ћелије. Осим крвних судова у строми гранулома оучавају се појединачне CD105⁺ ћелије које по морфологији подсећају на фибробласте и МØ, као и бројне појединачно позитивне ћелије у зони инфилтрата. На основу ових налаза такође се може закључити да ли су неке CD105⁺ ћелије ван васкуларних структура MSC.

Осим што је иницијално показано да је CD73 маркер субпопулације Т и В лимфоцита (Yang *u cap.* 2005), овај молекул је испољен и на ендотелним ћелијама крвних судова (Airas *u cap.* 1997), перицитима (Mlodzik *u cap.* 1995), фоликуларним дендритским ћелијама (Airas 1998), али и епителним ћелијама (Strohmeier *u cap.* 1997), фибробластима (Nemoto *u cap.* 2004), кардиомиоцитима (Carneiro-Ramos *u cap.* 2004), неуронима и олигодендроцитима (Maienschein и Zimmermann 1996), остеобластима (Jiang *u cap.* 2005), као и ћелијама трофобласта (Lee и Ford 1988). Ми смо показали да је CD73 такође заступљен на васкуларним елементима првенствено посткапиларним венулама у нивоу ендотела али и на инфилтришућим ћелијама у близини крвних судова и МØ. Позитивност перицита није била лако детектабилна због дифузне пребојености васкуларних структура.

Експресија CD166 је иницијално показана на различитим ткивима у току ембриогенезе (van Kilsdonk *u cap.* 2008), али и на ћелијама са високим пролиферативним потенцијалом као што су ћелије тумора (меланом, колоректални карцином, карцином панкреаса) (Weichert *u cap.* 2004, van Kilsdonk *u cap.* 2008, Kahlert *u cap.* 2009). Осим туморских ћелија различити типови MSC (BM-MSC, AT-MSC и D-MSC) такође испољавају CD166 (De Ugarte *u cap.* 2003, Đokić *u cap.* 2012). Анализом дистрибуције CD166 у PL показали смо да је овај маркер испољен на епителним тракама Маласезових острваца, али и појединим мањим крвним судовима (артериоле, капилари и венуле). Такође се уочава и позитивност перицита.

CD271 је ниско-афинитетни рецептор за неуралне факторе раста (неутофине) и осим на неуралним ткивима у процесу неурогенезе идентификован је и на различитим популацијама MSC међу којима BM-MSC (Rasini *u cap.* 2013) и PDLSC (Park *u cap.* 2011). У литератури је описана ко-експресија овог маркера са CD90 и CD73 маркерима у ткиву костне сржи (око 10%) (Quirici *u cap.* 2002), затим у око 10%-20% у масном ткиву (Kuci *u cap.* 2010) с тим да је знатно већи проценат CD271⁺ ћелија (>50%) истовремено позитиван и на CD34. Међутим, CD271 је у високом проценту испољен од стране BM-MSC и AT-MSC (Jones *u cap.* 2002, Quirici *u cap.* 2010) у култури. Ми смо показали да је експресија CD271 у ткиву грануломатозне PL има сличну дистрибуцију као и CD166 маркер с тим да је карактерише знатно јача позитивност него што је то случај са CD166.

Као што је напоменуто CD56 (NCAM) молекул је маркер NK ћелија (Roothans *u cap.* 2013) али је његова експресија идентификована и на ћелијама базалног слоја епидермиса коже, ткиву око знојних жлезда и перифоликуларно у односу на булбус длаке (Terada 2013). Осим тога, експресија CD56 је показана и на популацији VM-MSC и доводи се у везу са повећаним остеоиндуктивним потенцијалом ових ћелија (Battula *u cap.* 2009). Ми смо показали да је експресија овог молекула у ткиву PL умереног интензитета и присутна је на крвним судовима мањег дијаметра (претежно капилари). Такође смо показали да се у строми PL налазе појединачне CD56⁺ ћелије, али да експресија на перицитима није била јасно детектабилна.

Показано је да је α -SMA експримиран у пределу спољашње стране фоликула зуба у развоју, на ћелијама стелатног облика (Hosoya *u cap.* 2006), затим на ендотелу капилара гингиве (лековима индукована хиперплазија) (Agora *u cap.* 2016), глатким мишићним ћелијама крвних судова и перицитима здраве пулпе и у нивоу репаративних одонтобласти у раној фази формирања дентина након хемијске некрозе пулпе зуба (Yoshida *u cap.* 2012). Ми смо на основу имунохистохемијске анализе серије криостатских пресека PL константовали да је експресија α -SMA заступљена на већим крвним судовима (артериоле и венуле) и пост-капиларним венулама, као и да је експресија овог маркера јаког интензитета. Перицити су највероватније такође позитивни, обзиром да се се њихова обојеност стапала са ендотелним и вероватно глатко-мишићним ћелијама васкуларних структура.

У литератури је показано да је експресија STRO-1 присутна на крвним судовима ткива коже уз одсуство позитивности у строми, затим у периваскуларном региону крвних судова хуманог тимуса, на артериолама (дијаметра 25 μ m и 45 μ m) и капиларима (10 μ m), на капиларима адипозног ткива заједно са α -SMA, док је на венулама овај антиген исказан у нивоу ендотела (Lin *u cap.* 2011). Јака STRO-1 позитивност показана је у периваскуларном региону крвних судова који исхрањују зид аорте (*vasa vasorum*) (Lin *u cap.* 2011). Што се тиче експресије STRO-1 у ткиву гранулома, анализом на светлосном микроскопу, дошли смо до закључка да је она слабог интензитета и да има карактеристичну интрацелуларну локализацију а испољена је у близини крвних судова (пероцити) и на појединачним ћелијама у строми гранулома, које одликује интрацелуларна локализација. Интересантно је да је ова позитивност детектована само у појединим регионима PL, да је по правилу

била слабијег интензитета што остаје да се у даљим испитивањима детаљно истражи.

Као што је напоменуто, SSEA4 је испољен превасходно на ембрионским ћелијама, али и на нервним ћелијама (Jessell и Dodd 1985) и мултипотентним прогениторским ћелијама феталне јетре (Dan *u cap.* 2006). Често се помиње ко-експресија SSEA4 и маркера неуралних прогениторских ћелија (CD133) (Barraud *u cap.* 2007). Што се тиче експресије SSEA4 у ткиву гранулома, према нашој анализи, она се једним делом поклапа са дистрибуцијом CD166 и CD271 маркера (Маласезове епителне траке), а другим делом има сличну дистрибуцију као и STRO-1, на шта указује извештај број позитивних перицита и појединачно позитивних ћелија у строми PL.

У склопу свега наведеног било је неопходно да се поново вратимо на почетак и продискутујемо наше налазе са најзначајнијим кључним сазнањима о односу перицита са MSC у различитим ткивима.

Перицити, који су окружени базалном мембраном, успостављају блиске контакте са ендотелним ћелијама. Контакти се успостављају путем издужених продужетака који улазе у инвагинације мембране ендотелних ћелија (Caruso *u cap.* 2009). На овај начин перицити равномерно дистрибуирају контрактилну енергију васкуларних глатко-мишићних ћелија (енгл. *vascular smooth muscle cells* - VSMC), са којима чине потпору микроваскулатуре. Обе популације припадају групацији периваскуларних ћелија (Vezzani *u cap.* 2016). Перицити су преобладајуће локализовани око малих крвних судова (логитудинална оријентација, један слој), док су VSMC углавном позициониране око већих крвних судова, распоређених перпендикуларно, често у више слојева (von Tell *u cap.* 2006).

Због свега наведеног дуго времена се сматрало да перицити чине део популације VSMC (Vezzani *u cap.* 2016). Међутим, каснија испитивања су показала, да иако оба типа периваскуларних ћелија могу потицати од истих прекурсора у току ембриогенезе, оне се фенотипски и функционално разликују. Истраживања су значајно интензивирани открићем да ткивни перицити могу имати својства MSC у култури (Vezzani *u cap.* 2016).

Друга популација ћелија, која има сличности са перицитима, је популација тзв адвентицијалних ретикуларних ћелија које окружују синусоиде ендотелних ћелија у костној сржи и које заправо представљају аналоге перицита крвних судова

у другим ткивима. Адвентицијалне ретикуларне ћелије костне сржи имају способност диференцијације у MSC *in vitro*, и њих свакако не треба идентификовати са адвентицијалним ћелијама, фибробластоидног изгледа, које су локализоване око великих крвних судова (адвентицијални слој) (Vezzani *u cap.* 2016). Адвентицијалне ћелије се фенотипски разликују од адвентицијалних ретикуларних ћелија по ограниченој способности диференцијације у друге типове мезенхимских ћелија, експресији CD34 маркера а одсуством експресије CD31 (ендотелни маркер) и CD146 (маркер ендотелних ћелија и перицита) (Zimmerlin *u cap.* 2010).

Перицити, који исказују CD146, NG2 и PDGFR β , а које су негативне за CD34, CD56 и CD144 се разликују од миогених ендотелних ћелија (изолованих из скелетних мишића) које су CD34⁺CD56⁺CD144⁺. Изоловани перицити у *in vitro* условима се могу диференцирати у остеобласте, хондроците и адипоците док миогене ендотелне ћелије се додатно спонтано диференцирају у миобласте.

Највећа непознаница је да ли су перицити једини прекурсори MSC у ткивима ван костне сржи. Пажљивом фенотипском анализом популације MSC изолованих по типичном протоколу и пропагираним у медијуму који подржава њихов раст (а који је коришћен и у нашем раду) и поређењем ових својстава са популацијом ћелија добијених од перицита (имуномагнетним пречишћавањем CD146⁺CD34⁻CD45⁻ популације) могу се уочити бројне разлике и оне у многоме зависе од типа ткива (Zuk *u cap.* 2001, Manini *u cap.* 2011, Vezzani *u cap.* 2016).

Највећа разлика се односи на фенотипску хетерогеност MSC, добијених класичним методама ензимске дигестије што отвара питање и других потенцијалних извора MSC у ткивима (Vezzani *u cap.* 2016). У томе може бити и наш скромни допринос овим размишљањима, а који се укратко могу свести на неколико питања:

1. Ако је само половина наших PL-MSC линија CD146⁺, да ли су оне добијене од различитих прогенитора, CD146⁺ перицита и CD146⁻ популације MSC из других извора?
2. Ако све периваскуларне ћелије око малих крвних судова (посебно посткапиларних венула) нису CD146⁺, којој популацији припадају CD146⁻ ћелије у овом региону (популацији VSMC, субпопулацији CD146⁻ перицита са MSC својствима другачијих од својстава MSC које су

пропагиране од перицита у култури) или је то посебна субпопулација ћелија?

3. Да ли је популација CD146⁻ PL-MSC настала трансформацијом CD146⁺ ћелија током диференцијације?
4. Да ли CD146⁺ и CD146⁻ PL-MSC имају различит диференцијациони потенцијал и која од њих би могла бити погоднија за потребе регенеративних терапијских потенцијала PL?

Свако од наведених питања, а могло их је бити и још, представља основу за даља истраживања.

Поред опсежних тестова, спроведених са циљем што ефикасније карактеризације PL-MSC линије, базиране на својствима заједничким са већ окарактерисаним MSC из других ткива и органа, а у које спадају својство адхезије, способност да се самообнављају и формирају колоније, експримирају типичне MSC маркере (Dominici *u cap.* 2006) и неспецифичне MSC маркере (Sharpe 2016), било је неопходно испитати способност PL-MSC да се диференцирају у друге ћелије мезенхимског порекла. Наиме, последњи у низу критеријума које треба да испуњава испитивана ћелијска линија да би се могла сврстати у групу MSC је способност диференцијације у остеобласте, хондроците и адипоците у *in vitro* условима (Dominici *u cap.* 2006). У ту сврху се користе конвенционални диференцијациони медијуми (који су коришћени и у овој студији). Овим експериментима смо показали да се PL-MSC диференцирају у сва три типа ћелија мезенхимског порекла, при чему је забележен највећи афинитет према остеогеној а најмањи према адипогеној диференцијацији. Претпоставили смо да је овај феномен последица фенотипских карактеристика PL-MSC који се првенствено односи на јако високу базалну експресију CD56 (преко 90%) као и експресију CD271 (*in situ* локализација) а за које је на моделу BM-MSC показано да CD56⁺CD271⁺ популација поседује изражену остеобластну трансформацију (Battula *u cap.* 2009). У литератури се помињу различити фактори који поспешују остобластну трансформацију MSC из ткива орофацијалне регије (AlAmer *u cap.* 2016). Тако је показано да DFSC повећано експримирају ALP када су култивисане на 39⁰C (Rezaei Rad *u cap.* 2013), VEGF поспешује акумулацију калцијума и активност ALP у култури PDLSC (Lee *u cap.* 2012), витамин D3 инхибира пролиферацију и поспешује остеогену диференцијацију PDLSC (Tang и Meng 2009), култивација на

3-D носачима попут најсавременијих био-керамичких композита такође поспешује остеогену диференцијацију PDLSC (Xia *u cap.* 2011). Интересантни су подаци из скорашње литературе којима се остеогена диференцијација доводи у негативну спрегу са адипогеном (James 2013). Наиме ови аутори указују на значај проостеогених/антиадипогених фактора као што су β -катенин зависни Wnt сигнални пут, као и проостеогених/проадипогених стимуланса (BMP и IGF). Можда је управо овакав модел израженије остеогене диференцијације одлика и наших PL-MSC, што остаје да се у наредним експериментима испита.

Осим остеогене и адипогене диференцијације, показали смо да се PL-MSC у току 14 дана диференцирају у хондроците као што је то показано и за MSC из других ткива (Zavan *u cap.* 2007). Осим тога у ранијим публикацијама из ове лабораторије је показано да је хондрогена диференцијација MSC детектована преваходно по ободу пелета, док је у средишњим деловима она била слабијег интензитета (Ђокић *u cap.* 2012). Такође су DP-MSC, у односу на PL-MSC, имале знатно израженији хондрогени потенцијал. Независно од тога што је за регенарицију коштаних дефекта у PL најзначајнија остеогена диференцијација PL-MSC, обзиром на laku доступност PL које се рутинским хируршким методама одстрањују, а MSC релативно једноставно успостављају, потенцијал ових ћелија да се диференцијацирају у све три линије ћелија мезенхимског порекла, може бити од велике важности за потенцијалну ћелијску терапију различитих обољења.

5.3. Функционална поларизација PL-MSC

Пре него смо започели кључне експерименте у оквиру овог пројекта било је неопходно дефинисати функционални потенцијал PL-MSC. Најпре смо пошли од претпоставке да PL-MSC, обзиром да су изоловане из хроничног грануломатозног ткива, могу имати друкчија функционална својства у односу на MSC из периодонталног лигамента. Наиме Liu *u cap.* (2012) су недавно показали да MSC изоловане из инфламираног периодонталног лигамента, добијеног након екстракције зуба због хроничне пародонтопатије, имају знатно мањи имуномодулацијски потенцијал у односу на MSC из здравог периодонталног лигамента.

MSC поседују велику функционалну пластичност (Gazdić *u cap.* 2015). Иако је њихова функција преваходно имуносупресивна, оне ово својство стичу тек

након активације, најчешће у присуству снажних про-инфламацијских медијатора. Waterman *u cap.* (2010) су по први пут дефинисали овај тип MSC као MSC2, по аналогији на имуносупресивни (M2) тип макрофага. Међутим неки стимулатори, као што су мале дозе LPS (агонист TLR4) могу довести до поларизације MSC у MSC1, тзв. проинфламацијски фенотип, слично фенотипу M1 макрофага (Waterman *u cap.* 2010, Gazdić *u cap.* 2015). Због тога је наша идеја била да проверимо функционалну трансформацију PL-MSC у MSC1 односно MSC2 тип у присуству бактеријских продуката, продуката распаднутог ткива или инфламацијских медијатора, који се иначе налазе у ткиву PL.

Испитивања су дизајнирана тако да је процењиван одговор PL-MSC у култури у присуству стимулуса који активирају поједине TLR или цитокинске рецепторе, у смислу продукције цитокина или експресије појединих маркера. У истраживању се пошло од чињенице да је поларизација MSC условљена је врстом и концентрацијом стимуланса. PL-MSC би у раној фази инфламације, када су стимулисане са малим концентрацијама IFN- γ , TNF- α и LPS-ом, слично другим MSC, могле да испоље MSC1 фенотип и фаворизују Th1 имунски одговор активацијом неутрофила и додатним повећањем укупно продукованог TNF- α од стране активираних Т лимфоцита (Dazzi и Krampere 2011). Међутим, како процес инфламације напредује, велика концентрација TNF- α /IFN- γ би могла довести до формирања имунорегулацијског MSC2 фенотипа, када ове ћелије повећано продукују IDO-1, TGF- β , IL-10 и PGE2 чиме фаворизују Th2 имунски одговор (Gazdić *u cap.* 2015). Слично поларизујуће својство има Poly I:C, агонист TLR3 (Waterman *u cap.* 2010). Оба рецептора (TLR3 и TLR4) су испољена на денталним MSC али њихова експресија варира у зависности од типа MSC (Тomić *u cap.* 2011). До сада није испитивана њихова експресија на PL-MSC.

Истраживања Waterman-а *u cap.* (2010) на комерцијалним хуманим MSC (највероватније из костне сржи) су показала да краткотрајна стимулација MSC са LPS-ом (<1 час) доводи до повећања продукције IL-6, IL-8 и IL-4 што се карактерише као MSC1 поларизација. MSC1 ћелије такође повећано продукују VEGF, FGF2, IGF-1 и HGF (Crisostomo *u cap.* 2008). Наши резултати су показали да LPS повећава продукцију IL-6 и IL-8 што је у складу са литературним подацима али да не модулира експресију IL-4. Треба напоменути да је продукција IL-4 у нашим културама PL-MSC била веома ниска, тако да се поставља питање колико је

овај налаз у суштини функционално значајан. Такође, осим поменутих цитокина PL-MSС су након третмана са LPS повећано продуковале IFN- γ , који је такође про-инфламацијски цитокин, значајан за стимулацију и одржавање Th1 одговора (Smeltz *u cap.* 2002). Међутим када је у питању експресија IDO-1 у литератури је показано да активацијом TLR4 не долази до промене у експресији овог молекула (Waterman *u cap.* 2010), боље речено, повећање је минимално и без статистичке значајности, док смо ми у култури LPS стимулираних PL-MSС детектовали значајно повећање процента ћелија које су експримирале IDO-1 у односу на нестимулисане ћелије. Иако је IDO-1 маркер MSС2 поларизације, ове резултате треба интерпретирати са опрезом, обзиром да ранија истраживања из ове лабораторије јасно показују да модулаторни ефекат LPS-а на експресију IDO-1 зависи од типа денталних MSС. У том контексту одговор PL-MSС може бити различит, а такође се може повезати и са хетерогеношћу ћелија у оквиру PL-MSС. Такође, стимулација LPS у току 24 часа свакако може додатно мењати функционални статус PL-MSС. Због тога се генерално може претпоставити да наше испитиване PL-MSС линије одговарају на стимулацију LPS-ом у правцу диференцијације у функционални про-инфламацијски, MSС1 тип, али су нека својства другачија у односу на класични MSС1 фенотип.

Као што је већ истакнуто, стимулацијом TLR3 долази до поларизације у смеру MSС2 фенотипа, који карактерише вишеструко повећана експресија IDO-1 и повећана продукција IL-6 и IL-4, а смањена продукција IL-8 и TGF- β (Waterman *u cap.* 2010). Ми смо у култури PL-MSС након третмана са Poly I:C нашли да је експресија IDO-1 као и продукција IL-6 значајно повећана у односу на нестимулисане PL-MSС што је у складу са литературним подацима, али у нашим експерименталним условима није дошло до значајне модулатије продукције TGF- β . Осим овог феномена запазили смо да је након третмана са Poly I:C у култури PL-MSС дошло до повећања продукције IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-10 и IL-27. Повећана продукција IL-10 и IL-27 је у складу са имуносупресивном функцијом MSС2 ћелија али разлог повећању проинфламацијских цитокина IL-1 β и TNF- α није јасан. То може бити последица друге стимулације ћелија са агонистом који мења њихов функционални потенцијал или различитог одговора PL-MSС на Poly I:C у односу на MSС из других извора.

Осим ефекта до којих доводи TLR4 и TLR3 стимулација, испитали смо какав је ефекат лигације TLR2 рецептора помоћу Pam3CSK4 на PL-MSС поларизацију. На основу приказаних резултата из којих се види да се на Pam3CSK4 стимулираним PL-MSС повећава експресија IDO-1 и продукција IL-6 и TGF- β , може се претпоставити да TLR2 стимулација фаворизује MSС2 поларизацију. Међутим, TLR2 активирани PL-MSС су више продуковале IL-12 а мање IL-1 β и IL-27, што указује на комплексност ћелијског одговора који треба детаљније изучавати.

Коктел проинфламацијских цитокина је довео до повећања продукције IL-4 и IL-5 као и смањења продукције IL-8 и TGF- β што је у складу са публикованим подацима да у условима изложености високим концентрацијама проинфламацијских медијатора, MSС испољавају оптимални имуносупресивни потенцијал (Li *u cap.* 2012).

Осим продукције цитокина запазили смо да након третмана са TLR агонистима и коктелом проинфламацијских цитокина долази до повећања експресије CD73. До сада нису објављени слични подаци у литератури. Показали смо да је базална експресија CD73 на PL-MSС висока, што је у складу са експресијом овог молекула на MSС из других ткива и органа (Riekstina *u cap.* 2009), као и да је овај молекул део групе маркера којима се детерминише њихова матичност (Dominici *u cap.* 2006). Такође, у литератури је показано да CD73 заједно са CD39 има кључну улогу у формирању цикличног аденозин монофосфата (сАМР), као механизма за неутрализацију енормне количине АТР-а доминантно продукованог од стане гранулоцита у инфламацијом захваћеном ткиву указујући на анти-инфламацијску улогу ових екстрацелуларних молекула (Colgan *u cap.* 2006). Осим тога, улога овог молекула експримираног на ендотелним ћелијама крвних судова и аферентним лимфним судовима (Algars *u cap.* 2011) се огледа у повећању пропустљивости за гранулоците и њихову миграцију у ткиво. Обзиром да се PL-MSС практично налазе у перицитном региону, њихова улога у овом процесу се не може искључити, што поставља хипотезу да је CD73 маркер MSС1. Осим тога, PL-MSС свакако доприносе и смањењу АМР што идиректно доводи до смањења укупног АТР-а, на основу чега бисмо закључили да се CD73 може сврстати и у MSС2 маркере. Овакво објашњење није искључиво али ни коначно, обзиром на чињеницу да је базална експресија овог молекула на PL-MSС висока.

Очито се не може, бар на основу наших испитивања, закључити да је CD73 маркер функционалне поларизације PL-MSc односно MSc генерално.

5.4. PL-MSc повећавају продукцију имунорегулацијских цитокина од стране PL-IC у култури

Након фенотипске и функционалне карактеризације PL-MSc у наредним експериментима смо најпре желели да испитамо њихову интеракцију са локалним ћелијама које инфилтришу PL и представљају њихову значајну инфламацијску ткивну компоненту. Пошли смо од хипотезе да PL-MSc делују имунорегулаторно на PL-IC, обзиром да је њихов анти-инфламацијски ефекат у нашем претходном раду (Ђокић *и сар.* 2012). Раније смо показали да PL-IC преодминантно чине лимфоцити, плазмоцити и ћелије урођене имуности (неутрофили и MØ) (Ћолић *и сар.* 2009с). Овакав *in vitro* модел је требало да представља основу за даље проучавање интеракције PL-MSc и фагоцита.

Ко-културом PL-MSc изолованих из асимптоматских лезија са PL-IC из асимптоматских лезија у којима су већ успостављени процеси контроле запаљења (Nair 2004, Ћолић *и сар.* 2009с), показали смо по први пут да PL-MSc повећавају продукцију имунорегулацијских цитокина (IL-10, IL-27 и TGF- β) у ко-култури са PL-IC, с тим да су механизми којима то остварују различити. Заправо, резултати показују да је у ко-култури са директним контактом ћелија, као и у инсерту, где је контакт између ћелија био спречен, дошло до повећања продукције IL-10 и IL-27 што је првенствено посредовано ефектом солубилних фактора, док је за повећање продукције TGF- β битан директан међућелијски контакт. Ови налази по први пут показују да PL-MSc локално, различитим механизмима, доприносе заустављању инфламацијских процеса повећавајући продукцију имунорегулацијских цитокина.

Познато је да је IL-10 један од кључних имунорегулацијских цитокина са јаким анти-инфламацијским и имуносупресивним својствима. Наиме, IL-10 доводи до инхибиције Th1, Th2 и Th17 имунског одговора, NK ћелија и продукције проинфламацијских цитокина првенствено IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 и TNF- α продукованих од стране MØ, неутрофила и DC. Главни извор продукције IL-10 су Treg, али и друге ћелије попут Th2 ћелија, неки CD8⁺ Т лимфоцити, MØ, DC и PC могу такође продуковати IL-10. Постоји више механизма којима се описује активација гена који кодирају протеинску секвенцу за IL-10, с тим да је

најпознатији механизам који се остварује преко p38 сигналног пута (Preshaw и Taylor 2011).

Само на основу ових експеримената не можемо тврдити којим тачно механизмом PL-MSC повећавају продукцију IL-10 од стране PL-IC, имајући у виду сложеност механизма којима интерреагују различите ћелије и цитокини у PL (Čolić *u cap.* 2009c). За сада, најбоље описан пут је интеракција између Th17 ћелија и Treg (Cheng *u cap.* 2014). Обзиром да PL-MSC доводе до смањења продукције IL-17 од стране хуманих Т ћелија (Colic *et al.*, непубликовани резултати), може се претпоставити да је управо овај механизам присутан и на моделу интеракције PL-MSC и PL-IC. Наравно, и други локално продуковани солубилни фактори од стране PL-MSC и PL-IC такође могу бити директно или индиректно узрок повећаној продукцији IL-10.

TGF- β заједно са IL-10, има централну улогу у регулацији инфламције. Првенствено га продукују М Φ , фибробласти, остеокласти и Treg. Иако продукција TGF- β доводи до повећаног прилива Ly и Mo у инфламацијом захваћено ткиво, TGF- β такође доводи до супресије њихове пролиферације и смањења продукције проинфламацијских цитокина (Travis и Sheppard 2014). Показано је да локалне ћелије у PL (Čolić *u cap.* 2009c, Popović *u cap.* 2015) такође продукују TGF- β , независно да ли се ради о sPL или asPL. Сходно томе може се претпоставити да је овај цитокин такође значајан за смањење инфламације у PL и регенерацију костију као патогномичан маркер PL. PL-MSC, као и остале D-MSC продукују TGF- β (Tomić *u cap.* 2011, Đokić *u cap.* 2012). Међутим, обзиром да је у експерименту са PL-IC број PL-MSC био значајно мањи (1:10, у корист PL-IC), допринос у продукцији TGF- β од стране PL-MSC у ко-култури је занемарљив. Када се то узме у обзир, на основу добијених резултата о продукцији TGF- β дошли смо до закључка да PL-MSC повећавају продукцију TGF- β од стране PL-IC, као и да је за ово повећање првенствено одговоран директан контакт између ћелија. Иако нисмо испитивали молекуларне механизме којима долази до повећања продукције TGF- β у ко-култури, претпоставили смо да је интеракција између антиген презентујућих ћелија (APC) и Treg од круцијалне важности. Ова претпоставка се заправо базира на чињеници да је за настанак Treg, који су и главни извор TGF- β , одговоран директан ћелијски контакт између Т ћелија, APC и највероватније и неких других ћелија (Preshaw и Taylor 2011).

IL-27 припада IL-12 фамилији цитокина и састоји се из компоненте кодиране од стране Epstein-Barr virus стимулисаног гена 3 и p28 субјединице. IL-27 као и друга два члана IL-12 фамилије цитокина (IL-12 и IL-23), превасходно продукују активирани MØ и DC (Bosmann и Ward 2013). Резултати наших претходних испитивања показују да је експресија IL-27 детектована у ендотелним ћелијама али и PL-IC (Čolić *u cap.* 2009a). IL-27 је цитокин са проинфламацијским и антиинфламацијским карактеристикама (Bosmann и Ward 2013). Показано је да IL-27 доводи до стимулације Th1 и смањења продукције Th17 цитокина од стране PL-IC у syPL. Међутим, IL-27 доводи до супресије Th1 и Th2 имунског одговора код asPL (Čolić *u cap.* 2009a). На основу ових чињеница, претпоставили смо да је повећање продукције IL-27 од стране PL-IC у култури са PL-MSC последица њихове имуномодулаторне активности, обзиром да смо у експерименту користили asPL. Међутим није познато зашто је овај ефекат присутан само у инсерт систему, као и то који је разлог инхибиције продукције IL-27 у ко-култури са директним контактом између PL-MSC и PL-IC, што може бити предмет даљих истраживања.

5.5. PL-MSC различито модулирају продукцију цитокина од стране локалних MNC

Познато је да је ћелијски састав PL хетероген, што је последица динамичног развоја лезије у току којег доминантну улогу имају бактерије и имунске ћелије домаћина (Čolić *u cap.* 2009c, Marton и Kiss 2014). Показано је да се ћелијски састав asPL разликује од syPL по доминацији лимфоцитне популације у односу на друге ћелије, док код syPL преобладају гранулоцити због егзацербације инфламације (Čolić *u cap.* 2009c). Обзиром на овакве разлике, пошли смо од претпоставке да PL-MSC у зависности од типа лезије из којих су изоловане, могу имати различит утицај на MNC из asPL у односу на MNC из syPL. Ова претпоставка је проверавана у оквиру експеримената где је проучаван утицај PL-MSC на продукцију цитокина од стране as- и syPL-MNC у ко-култури *in vitro*. У циљу додатне стимулације продукције цитокина, културе су третиране PMA/Ca²⁺ јонофором како је сугерисано у раду (Collins 2000). Уклањањем гранулоцита as- и syPL-MNC су имале сличан ћелијски састав за разлику од хетерогености иницијалне популације PL-IC.

Добијени резултати су показали да су PL-MSC линије независно од типа лезије из које су успостављене имале сличан ефекат на продукцију цитокина, али да је одговор MNC био различит. Наиме, смањење продукције TNF- α и IL-1 β од стране оба типа MNC био је очекиван феномен, што је у сагласности са већ показаним анти-инфламацијским својствима других типова MSC (Bansal и Jain 2015, Hilkens *u cap.* 2015), што је такође у сагласности са претпоставком да су PL-MSC регулатори локалне инфламације. Познато је да TNF- α и IL-1 β , доводе до стимулације инфламације и то остварују дејством преко одговарајућих рецептора на инфилтришућим и стромалним ћелијама у PL у циљу елиминације инфекције. Оба цитокина, индиректно, преко активације RANK/RANKL сигналног пута, поспешују процесе разградње кости, што је и основна карактеристика апикалног периодонтитиса (Nair 2004).

Међутим, изгледа да је регулација продукције IL-8 од стране PL-MNC другачија у односу на TNF- α и IL-1 β . Наиме, иако је његова продукција снижена од стране asPL-MNC, што смо показали и за укупне PL-IC (Djokić *u cap.* 2012), продукција IL-8 није била значајно промењена у култури syPL-MNC. Као што је познато IL-8 хемокин повећава прилив неутрофила на место инфламације (Wuys *u cap.* 1998), а на његову продукцију утиче IL-17 (Čolić *u cap.* 2007). Како је показано да би IL-17 могао бити један од главних цитокина заслужан у процесима егзацербације инфламације у PL (Čolić *u cap.* 2007, Čolić *u cap.* 2009c), као и налаза да PL-MSC не доводе до значајне модулације продукције IL-17 од стране MNC добијених из крви и PL-IC (Đokić *u cap.* 2012), може се са великом вероватноћом претпоставити да је код syPL продукција IL-8 пожељна и да се за сада непознатим механизмима његова продукција не ограничава од стране PL-MSC чак ни у *in vitro* условима.

Очигледно да је упркос сличном саставу MNC из syPL и asPL, њихов функционални одговор је различит. Овај феномен се нарочито запажа у контексту модулације продукције IL-10 у ко-култури. Заправо продукција овог цитокина била је повећана од стране asPL-MNC што није био случај са syPL-MNC. Као што је већ раније дискутовано, IL-10 је кључни имунорегулацијски цитокин, који доводи до супресије продукције цитокина од стране Th1, Th2 и Th17 ћелија, као и IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12 и других (Gabrysova *u cap.* 2014). Такође је истакнуто да су Treg ћелије главни извор IL-10 (Gabrysova *u cap.* 2014) што је такође потврђено и код PL (Čolić

и сар. 2009b). Обзиром да је однос између Treg и IL-17 обрнутопро порционалан (Pitt и сар. 2012), може се претпоставити да је управо овај феномен одговоран за мању продукцију IL-10 у syPL. Ова чињеница иде у прилог хипотези да је супресија инфламације од стране PL-MSC током егзацербације инфламације супримирана. Остаје да се испита који су фактори укључени у контроли имунорегулацијских механизма PL-MSC у syPL.

Међутим, PL-MSC доводе до повећања продукције TGF- β , и то од стране оба типа asPL-MNC и syPL-MNC. Овај налаз указује да TGF- β има значајнију улогу од IL-10 у регулацији имунског одговора у PL. На то указују и наши налази да су PL-MSC важан извор продукције овог цитокина и које додатно стимулишу његову секрецију од стране других ћелија у PL.

5.6. Интеракција PL-MSC и гранулоцита

Кључни део резултата у оквиру овог пројекта се односио на испитивање двосмерних комуникација између PL-MSC и фагоцита, У том циљу било је неопходно да се најпре покаже да ли овакве комуникације, у смислу постојања блиских међућелијских контаката, постоје *in vivo*. Зато је најпре анализирана колокализација између PL-MSC и гранулоцита. Коришћен је CD146, маркер MSC и перицита и CD16 (маркер гранулоцита и NK ћелија), односно MPO маркер неутрофилних гранулоцита. Примењене су методе двоструке имуноензимске реакције и двоструке имунофлуоресценце (конфокална микроскопија). У анализи је посматрана колокализација гранулоцита у периваскуларном региону али и ван васкуларних елемената, под претпоставком да се MSC могу наћи и у строми PL ван васкулатуре. Ова хипотеза је базирана на способности прекурсора PL-MSC да из крви мигрирају у инфламирано ткиво. Наши резултати су показали периваскуларну колокализацију CD146⁺/CD16⁺ односно CD146⁺/MPO⁺ ћелија. Међутим, колокализација ван ових структура није сасвим поуздана, обзиром да изоловане CD146⁺ ћелије не морају бити MSC.

Доказ о присуству блиских међућелијских контаката између PL-MSC и гранулоцита *in situ* је од великог значаја за разумевање међусобних интеракција обзиром да су мали крвни судови, пре свега посткапиларне венуле, места изласка гранулоцита из крви у ткива и да су перицити/MSC прве ћелије ван васкулатуре са којима они успостављају ћелијске контакте.

Имајући у виду да је инфлукс гранулоцита у периапексно ткиво први догађај у настанку запаљенске лезије карактеристичне за апексни периодонтитис, и чињенице да MSC могу бити трансформисане у правцу MSC1 и MSC2 подтипа *in vitro*, експерименте смо креирали тако да могу да имитирају овакве интеракције *in vivo*. У том контексту користили смо културу нестимулисаних гранулоцита из периферне крви или културу стимулираних гранулоцита. За стимулацију су коришћени fMLP, познати фармаколошки агенс који доводи до „*priming*“-а гранулоцита преко хемотаског рецептора за FMLP на гранулоцитима (Panago и Mitolo 2008) и LPS, агонист TLR-4 који је снажан активатор како гранулоцита тако и PL-MSC.

Ми смо у нашим експериментима показали да је продукција TNF- α значајно снижена у ко-култури како нестимулисаних тако и LPS и FMLP активисаних гранулоцита са PL-MSC у директном контакту и у систему са уметком. Обзиром да је продукција TNF- α у култури PL-MSC практично недетектабилна у односу на гранулоците, закључили смо да је снижење продукције овог цитокина у ко-култури највероватније последица ефекта солубилног фактора продукованог од стране PL-MSC на гранулоците. Значај овог феномена би се могао тумачити у правцу смањеног прилива гранулоцита у инфламацијом захваћено ткиво.

Други цитокин који је у овом моделу изучаван је IL-27. Овај цитокин припада IL-12 суперфамилији и да заједно са IL-12 и IL-23 има мултипле функције у оквиру механизма урођене и стечене имуности (Beadling и Slifka 2006). IL-27 има велики значај за активацију NK ћелија, цитотоксичних Т ћелија и иницијалну диференцијацију Th1 ћелија и стимулацију про-инфламацијских процеса. Међутим, многе функције IL-27 се односе на инхибицију инфламације и имунског одговора (Bosmann и Ward 2013). Тако на пример, показано је да IL-27 инхибира формирање остеокласта у културама ћелија костне сржи (Kamiya *u cap.* 2007) и културама прекурсора остеокласта (Kallioliias *u cap.* 2010). Осим тога, раније публикације из наше лабораторије показују да IL-27 у хуманим периапексним лезијама, продукован од стране ендотелних ћелија и PL-IC, испољава како про-инфламацијске тако и анти-инфламацијске ефекте (Čolić *u cap.* 2009a). Такође смо показали да је продукција овог цитокина у ко-култури PL-MSC са укупним PL-IC била повишена. Међутим, у овом моделу смо нашли да је продукција IL-27 у ко-култури нестимулисаних гранулоцита била снижена у систему са директним

контактом. Када су гранулоцити активирани са fMLP продукција овог цитокина била снижена и у систему са уметком, што може бити последица ефекта солубилних фактора продукованих од стране PL-MSC. За разлику од тога, ниво IL-27 у ко-култури PL-MSC са LPS активисаним гранулоцитима није био значајно промењен у односу на контролу. Овакав резултат наводи на закључак да PL-MSC испољавају различит имуномодулацијски ефекат у зависности од типа инфламацијских ћелија и њиховог инфламацијског статуса. Ако се узме у обзир да IL-27 супримира адхезију гранулоцита индуковану са fMLP и ROS продукцију индуковану са LPS као и да повећава продукцију IL-1 β али не модулира продукцију TNF- α од стране неутрофилних гранулоцита (Li *u cap.* 2010a), може се претпоставити да је снижена продукција IL-27 код нестимулисаних и fMLP активисаних гранулоцита, повезана са анти-инфламацијским механизмима PL-MSC, а да би у интеракцији са LPS активисаним гранулоцитима PL-MSC могле деловати про-инфламацијски.

Међутим, само на основу продукције TNF- α и IL-27 не може се са сигурношћу тврдити у ком смеру се одвија интеракција PL-MSC и гранулоцита. У том смислу, веома је важно како је модулисана продукција TGF- β , обзиром да се улога овог цитокина огледа у супресији продукције про-инфламацијских цитокина (Yoshimura *u cap.* 2010, Travis и Sheppard 2014). У ранијим публикацијама из наше лабораторије нађена је повећана продукција TGF- β у В типу PL (Čolić *u cap.* 2009c), као и да TGF- β продукују бројне стромалне ћелије и инфилтришући лимфоцити укључујући Т регулацијске лимфоците у PL (Čolić *u cap.* 2009b). Осим тога, егзогено додат у културу инфламацијских ћелија, TGF- β смањује продукцију про-инфламацијских цитокина у syPL (Gazivoda *u cap.* 2009). На протективну улогу овог цитокина у PL (гранулома) додатно указује негативна корелација између TGF- β и RANKL (Fukada *u cap.* 2009). Наши налази показују да је у ко-култури PL-MSC и гранулоцита продукција TGF- β била повећана у ко-култури где су коришћени активисани гранулоцити, стимулирани са LPS-ом. Ови налази јасније указују на доминантну супресију имунских и инфламацијских процеса од стране PL-MSC, а који је мање изражен код снажније стимулације запаљења. Таква ситуација се дешава код егзацербације процеса у PL.

Осим до сада анализираних цитокина у испитиваном моделу, највише нас је интересовало каква је продукција IL-6, обзиром да је у литератури показано да

међу 120 тестираних цитокина помоћу RT-PCR методе, управо IL-6 главни имуномодулацијски цитокин MSC (Park *и сар.* 2009). Такође је у многим публикацијама показано да је базална продукција овог цитокина у култури MSC из различитих ткива и органа висока (Blaber *и сар.* 2012, Chan *и сар.* 2012, Kyurkchiev *и сар.* 2014). Претпоставили смо да и PL-MSC, попут осталих типова MSC управо преко IL-6 путем одређених механизма могу усмеравати реакцију гранулоцита у PL. Један од механизма у који су различите MSC укључене, а заснован је управо на продукцији IL-6 од стране BM-MSC, W-MSC (енгл. *Wharton's jelly*) и трабекуларне кости (B)-MSC у ко-култури са ендотелним ћелијама крвних судова (EC), заснива се на смању осетљивости EC на проинфламацијске цитокине (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) што резултира смањеном експресијом адхезионих молекула и приливом неутрофила у ткиво (Liu *и сар.* 2013, Munir *и сар.* 2016). Наши резултати показују да је продукција IL-6 у ко-култури PL-MSC и гранулоцита у директном контакту била повећана у односу на збир продукције овог цитокина у појединачним културама, за сва три испитивана модела гранулоцита (нестимулисани, LPS и fMLP активисани). Обзиром да је базална продукција IL-6 у култури PL-MSC значајно већа од продукције овог цитокина у култури неутрофилних гранулоцита, закључили смо да гранулоцити путем директних контаката утичу на PL-MSC да додатно повећају продукцију IL-6. На основу досадашњих резултата можемо претпоставити да су директни контакти PL-MSC и гранулоцита, из којих произилази снижена продукција TNF- α од стране гранулоцита и повишена продукција IL-6 од стране PL-MSC, узрок смањења прилива нових неутрофила у PL. Осим тога, недавни подаци указују на могућност MSC изолованих из илијачне кости (B-MSC) да мигрирају из васкулатуре парацелуларно, између EC и трансцелуларно, кроз EC у ткиво након стимулације ендотела са TNF- α (Тео *и сар.* 2012). У контексту ових литературних података, посматрано кроз призму интеракције PL-MSC и гранулоцита преко продукције поменутих цитокина, можемо претпоставити да се поред смањења прилива нових гранулоцита смањује и потенцијална миграција прекурсорних MSC из крви у PL. Овим пројектом нису обухваћена испитивања миграције PL-MSC, тако да је неопходно посебним експериментима тестирати ову хипотезу.

Међутим, овако продуковани цитокини се не могу само посматрати у једном затвореном систему ког би чинила два типа ћелија као што су PL-MSC и

гранулоцити. Нарочито је то незахвално када се узме у обзир да и други фактори могу директно модулирати продукцију цитокина од стране ових ћелија појединачно. Тако се на пример, за разлику од свега до сада наведеног у вези повећане продукције IL-6, резултати могу дискутовати и другачије. Наиме, добро је познато да је IL-6 уједно и проинфламацијски и имунореглацијски цитокин (Scheller *u cap.* 2011), да има битну улогу у диференцијацији Th17 ћелија (McGeachy и Sua 2008) и одржавању баланса Tregs/Th17 (Kimura и Kishimoto 2010). Недавно је предложен и нов модел Th17 диференцијације, у коме је показано да се наивне CD4⁺ Т ћелије прајмоване од стране DC, након стимулације са IL-6 и TGF- β диференцирају у IL-17 продукујуће Т ћелије (Geginat *u cap.* 2016). Обзиром да је у испитиваном систему интеракције PL-MSC и гранулоцита детектована повећана продукција IL-6 од стране PL-MSC и повећана продукција TGF- β од стране LPS активисаних гранулоцита, може се претпоставити да ови цитокини заједно утичу на диференцијацију Th17 ћелија. Ова хипотеза је у сагласности са већ публикованим резултатима да је продукција IL-17 значајно већа у култури PL-MNC у односу на PB-MNC (Čolić *u cap.* 2007), као и на постојање позитивне корелације између продукције IL-17 и броја неутрофила у syPL (Čolić *u cap.* 2009c), што у клиничком погледу има везе са егзацербацијом акутних симптома PL. Најновији литературни подаци показују да је у стању сепсе миграција гранулоцита посредством fMLP-а у инфламацијом захваћено ткиво зависна од концентрације екстраћелијског ATP (Li *u cap.* 2016). Наиме, ови аутори су показали да се након смањења екстраћелијског ATP-а долази до реверзије усмерене миграције гранулоцита активисаних са fMLP. Ми смо показали да је експресија CD73 молекула на мембрани PL-MSC повећана након третмана са агонистима TLR и коктелом проинфламацијских цитокина, што је у директној вези са метаболизмом екстраћелијског ATP-а. С тим у вези, PL-MSC би могле индиректно да утичу на повећање миграције гранулоцита у инфламирано ткиво. Овакво гледиште иде у прилог хипотезе да PL-MSC у интеракцији са гранулоцитима имају проинфламацијске особине. Међутим, ова претпоставка не мора бити и тачна, имајући у обзир да и PL-MSC и гранулоцити у току интеракције граде динамичан систем који зависи од фаза развоја лезије и различитих биохемијских активатора. Тако, на самом почетку PL-MSC су изложене утицају LPS-а, а доспели гранулоцити су неактивисани. У интеракцији таквих ћелија долази до смањења продукције IL-27 и

то путем директних контаката као и TNF- α путем солубилних фактора продукованих од стране PL-MSc. Главни солубилни фактор LPS-стимулисаних PL-MSc у тој фази је IL-6. С друге стране, неактивисани гранулоцити додатно доприносе повећању IL-6 од стране PL-MSc путем директних међућелијских контаката. Оваква интеракција, међутим, кратко траје, обзиром да гранулоцити након преласка из циркулације у ткиво бивају рапидно активисани различитим бактеријским продуктима (fMLP и LPS). PL-MSc у интеракцији са гранулоцитима стимулираних са fMLP битније не мењају продукцију цитокина. То значи да PL-MSc у почетној фази развоја лезије делујући на смањење продукције TNF- α и IL-27 од стране нестимулисаних и fMLP „прајмованих“ гранулоцита смањују њихов прилив у ткиво. Обзиром да оба цитокина, делујући на HEV, повећавају миграцију гранулоцита. С друге стране, PL-MSc истовремено путем деградације екстраћелијског АТФ-а усмеравају приспеле гранулоците у одређени фокус ткива.

У наредној фази гранулоцити бивају активисани са LPS-ом. Овако активисани гранулоцити стимулишу повећање продукције TGF- β од стране PL-MSc, што заједно са IL-6 доводи до активације Th17 и следствене егзацербације инфламације, а што је праћено приливом свежих гранулоцита у PL. На основу наших резултата интеракције PL-MSc и гранулоцита се може претпоставити да PL-MSc не утичу примарно на њихову миграцију из циркулације у PL, већ на унутарлезијско усмеравање. Недвосмислено је да томе највише доприносе цитокини, од којих је најзначајнији IL-6.

Да је IL-6 у директној вези са повећаним преживљавањем неутрофила у PL говоре публиковани радови којима се имунобиологија овог цитокина повезује са анти-апоптотским ефектима. До сада је показано да IL-6 утиче на преживљавање бројних ћелија активацијом ћелија преко STAT-3 (Hodge *и сар.* 2005). Такође је показано да MSc из различитих ткива и органа путем IL-6 смањују апоптозу неутрофила у култури (Raffaghello *и сар.* 2008, Maqbool *и сар.* 2011, Zhu *и сар.* 2014a). Зато је један од циљева наших истраживања био да проверимо да ли и PL-MSc због својих специфичности имају сличан ефекат. Показали смо да је генерално апоптоза гранулоцита била снижена у свим испитиваним моделима ко-културе, независно да ли се ради о директним контактима или систему са уметком. Оно што је на први поглед било упадљиво јесте да је смањење апоптозе у култури MSc и гранулоцита из PL било израженије (70% инхибиција) у односу на апоптозу

нестимулисаних гранулоцита из крви (45% инхибиција). Ова разлика је највероватније последица активације гранулоцита у PL. Обзиром да је сличан анти-апоптотски ефекат показан и у систему са уметком могло се претпоставити да су солубилни фактори, продуковани од стране PL-MSC, највероватније одговорни за описани феномен. Имајући у виду налазе о знатној продукцији IL-6 од стране PL-MSC и утицају овог цитокина на апоптозу претпоставили смо да је анти-апоптотски механизам PL-MSC на гранулоците посредован са IL-6. Ову хипотезу смо најпре тестирали у експериментима додавајући rhIL-6 у културу гранулоцита и резултате апоптозе упоредили са CM PL-MSC. Добијени резултати су показали да IL-6 смањује апоптозу гранулоцита на дозно зависан начин. Специфичност ефекта смо потврдили применом anti-IL-6 mAb. Међутим, реверзија апоптозе у култури гранулоцита са CM (74%) није била потпуна као у културама са rhIL-6. На основу ових података се могло закључити да иако IL-6 има доминантан утицај, смањењу апоптозе доприносе и неки други солубилни фактори продуковани од стране PL-MSC.

Већ је раније коментарисано да LPS активира гранулоците и да је LPS један од кључних индуктора у раној фази стварања PL и у процесима егзацербације. Такође је показано да LPS инхибира апоптозу гранулоцита (Sabroe *u cap.* 2003, Sabroe *u cap.* 2005). Овај процес се дешава још током њихове трансмиграције а повезан је са повећањем експресије бета-2 интегрина и снижењем експресије L-селектина (Watson *u cap.* 1997, Zhou *u cap.* 2005). Ми смо такође потврдили да LPS такође инхибира апоптозу гранулоцита, а која је додатно инхибирана у ко-култури са PL-MSC. Ови налази се могу упоредити са појединим подацима из литературе који показују да MSC, стимулисане са Poly I:C, повећано продукују IL-6, G-CSF и GM-CSF што у ко-култури са неутрофилима доводи до повећања оксидативног праска (активације) али и смањења апоптозе неутрофилних гранулоцита (Cassatella *u cap.* 2011, Park *u cap.* 2012, Zhang *u cap.* 2014). У нашем моделу IL-6 би свакако могао бити цитокин који са LPS делује синергистички на инхибицију апоптозе гранулоцита. Међутим, у томе могу бити значајни и други фактори. У том контексту су интересантни налази да MSC из различитих ткива и органа, након стимулације са LPS-ом и малим количинама IFN- γ и TNF- α , повећавају продукцију IL-8 и фактора инхибиције миграције макрофага (енгл. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF), што доводи до повећане активације и прилива неутрофилних

гранулоцита, а што даље смањује њихову апоптозу (Bartaula-Brevik *u cap.* 2014, Brandau *u cap.* 2014, Gazdić *u cap.* 2015).

Такође смо испитивали улогу PL-MSC на апоптозу гранулоцита у систему где су ове ћелије стимулисане са fMLP. Познато је да изложеност гранулоцита хемоатрактантима попут fMLP доводи до формирања актинских псевдоподија тј. морфолошке поларизације у гранулоцитима (Wright *u cap.* 2010). Осим тога, fMLP у току 24 часовне стимулације доводи до повећања синтезе и ослобађања супероксидних јона (ROS) од стране неутрофила (функционална активација) при чему је истовремено повећана и њихова апоптоза (Kettritz *u cap.* 1997). Ми смо такође показали да је апоптоза гранулоцита након третмана са fMLP повишена. Разлика није била статистички значајна највероватније јер је спонтана апоптоза гранулоцита након 24 часа у култури била преко 80%. Међутим, PL-MSC су смањиле апоптозу гранулоцита активисаних са fMLP скоро као и у контроли из чега се може закључити да је њихов анти-апоптотски ефекат присутан у свим функционалним статусима гранулоцита (мирујући неактивисани гранулоцити – гранулоцити периферне крви; „прајмовани“ гранулоцити – гранулоцити третирани са fMLP; активисани гранулоцити третирани са LPS-ом и гранулоцити из PL).

Из свега наведеног, може се генерално закључити да у интеракцији PL-MSC и гранулоцита *in vitro*, долази до формирања цитокинског миљеа карактеристичног за имунорегулацијски систем. Међутим, када се овај систем разматра у склопу једног патолошког ентитета, као што су PL, анализа је много комплекснија. У том контексту, смањење продукције проинфламацијских цитокина (TNF- α), а повећање продукције Tregs (TGF- β) и IL-6 доводи до повећаног преживљавања гранулоцита у PL због инхибиције апоптозе. Са друге стране индиректно долази до њихове мобилизације из циркулације у PL (повећање експресије CD73 на PL-MSC), као и стимулације прилива нових гранулоцита путем Th1/17 осовине (IL-6 и TGF- β), што је одлика про-инфламацијске активности, односно егзацербације инфламације. Другим речима, са аспекта сагледавања функције PL-MSC, снижена продукција TNF- α и повећана IL-6 продукција у фази „прајмовања“ гранулоцита може довести до смањења осетљивости ендотелних ћелија у погледу трансендотелне миграције гранулоцита. Међутим, потпуна активација (стимулација са LPS-ом) поспешује прилив свежих гранулоцита у ткиво (комбинација IL-6 и TGF- β) истовремено смањујући њихову апоптозу *in situ*. Ови процеси могу бити од значаја за бољу

функционалну активност гранулоцита у циљу елиминације патогених микробских агенаса.

5.7. Утицај NET-а на продукцију цитокина у култури PL-MSc

Интеракцију MSc и гранулоцита, осим преко продукције цитокина и модулације апоптозе на *in vitro* инфламацијском моделу PL, додатно смо употпунили испитивањем ефекта NET-а на продукцију цитокина у култури PL-MSc као и утицаја PL-MSc на процес NET-озе, вођени чињеницом да одређени проценат неутрофила улази у процес NET-озе индуковане бактеријским метаболитима, коју за разлику од апоптозе карактерише руптура плазма мембране и ослобађање DNK у виду мреже (Amulic и Hayes 2011). NET је заправо вид механизма урођеног имунског одговора у оквиру којег неутрофили хватају и фиксирају микроорганизме у NET мрежама што их чини доступнијим како неутрофилима тако и осталим ћелијама имунског система (Brinkmann *u cap.* 2004, Urban *u cap.* 2006, Mantovani *u cap.* 2011).

На основу ових чињеница најпре смо желели да проверимо да ли PL-MSc имају утицај на NET-озу имајући у виду налазе о њиховом анти-апоптотском ефекту на гранулоците. Међутим, након мерења NET-озе у култури неутрофила закључили смо да је уплив наших PL-MSc у овај вид механизма урођене имуности практично безначајан. Сходно томе претпоставили смо да је анти-апоптотски механизам PL-MSc или инхибиран фактором индукције NET-озе, или маскиран активацијом неутрофилних гранулоцита од стране NET индукујућих агенаса.

Иако PL-MSc нису утицале на процес формирања NET-а, у наредним експериментима испитивали смо какав би утицај могао имати локално формиран NET на продукцију цитокина и пролиферацију PL-MSc у оквиру двосмерних комуникација са гранулоцитима. Ранија истраживања су показала да NET смањује продукцију IL-6 од стране DC активисаних помоћу LPS-а (Barrientos *u cap.* 2014). Међутим нисмо пронашли сличне резултате који се односе на MSc. Супротно очекиваном нашли смо да NET доводи до стимулације продукције про-инфламацијских цитокина (IL-6, IL-8 и IL-12p70), на основу чега се може претпоставити да NET индукује MSc1 поларизацију. У том контексту, IL-6 би могао инхибирати апоптозу преосталих неутрофила у PL, док би IL-8 могао имати улогу у мобилизацији нових неутрофила из крви. IL-12 би, између осталих

функција, највероватније могао утицати на диференцијацију IFN- γ /IL-17 продукујућих Th1/17 (exTh1/17) ћелија, одговорних за егзацербацију процеса (Geginat *u cap.* 2016). С друге стране, у култури PL-MSC стимулираних NET-ом детектовали смо повећану продукцију појединих Th2 (IL-4) и Tregs цитокина (TGF- β), али је продукција IL-5 и IL-10 остала непромењена у односу на контролу. У једној од наших ранијих публикација смо показали да DC диференциране у присуству про-инфламацијских цитокина и PL-MSC, индукују Th2 поларизацију и стимулишу диференцијацију CD4⁺CD25^{high}CD39⁺ Т регулацијских ћелија, што је праћено повећаном продукцијом TGF- β (Ђокић *u cap.* 2013). У складу са овим резултатима може се претпоставити да повишена продукција IL-4 од стране PL-MSC у присуству NET-а може подстицати диференцијацију DC *in situ*. Међутим, повећана продукција IL-6 и TGF- β може указивати да PL-MSC путем ових цитокина стимулишу Th17 ћелије (Geginat *u cap.* 2016). Такође је показано да IL-6 ограничава Th2 диференцијацију у присуству IL-4 (Mauger *u cap.* 2014), што заједно указује на проинфламацијски модалитет деловања NET-а на PL-MSC а што може бити од значаја за поспешивање одбрамбених механизма у раној фази стварања PL или у току егзацербације запаљенских процеса.

На крају поглавља о интеракцији PL-MSC и неутрофилних гранулоцита, у оквиру двосмерних комуникација са освртом на модулацију продукције цитокина у култури PL-MSC од стране NET-а, можемо рећи да повећана продукција IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-4 и TGF- β сугерише на фаворизацију Th17 имунског одговора. Овој хипотези иде у прилог и чињеница да продукција осталих Th2 цитокина (IL-5) и имунорегулацијских цитокина (IL-10) није значајно модулирана у систему NET-ом стимулираних PL-MSC, као и да стимулација одређеног типа имунског одговора (Th1, Th2 и Tregs) зависи управо од ћелијских и структурних компоненти PL са којима PL-MSC комуницирају.

5.8. Интеракција PL-MSC и M \emptyset

Последњи део овог пројекта се односио на испитивање интеракције PL-MSC и M \emptyset у овину које је испитивана експресија маркера и продукција цитокина од стране оба типа ћелија у ко-култури. Најпре смо по моделу који је примењен у проучавањима интеракције PL-MSC и гранулоцита, проверавали присуство међућелијских контаката између PL-MSC и M \emptyset а на основу експресије маркера за

PL-MSc (CD146) и MØ (CD68). Анализом криостатских пресека ткива гранулома помоћу светлосног и конфокалног микроскопа, показали смо да PL-MSc остварују бројне међућелијске контакте са локално ткивним MØ у периваскуларном региону око крвних судова (артериоле и пост-капиларне венуле) али и у строми гранулома (контакти појединачних ћелија). Овакви налази су представљали основ за даље моделовање интеракција ових ћелија *in vitro*.

Као што је већ раније описано, MØ се диференцирају од моноцита, након њихове миграције у ткиво при чему у току трансендотелне миграције бивају изложене дејству различитих фактора раста попут M-CSF и GM-CSF продукованих од стране локалних ћелија. У току ових процеса оне попримају фенотипске и функционалне карактеристике ткивно-специфичних MØ. У литератури је показано да у зависности од фактора раста моноцити могу попримити фенотип проинфламацијских (GM-CSF индуковани, M1) или имунорегулацијских (M-CSF индуковани, M2) ћелија (Sesia *u cap.* 2015). У складу са овим подацима, а у циљу постављања што вернијег модела за испитивање интеракције PL-MSc и MØ *in vivo*, у експериментима смо користили 3 типа MØ, спонтано диференциране (sMØ, без додатка фактора раста), макрофаге индуковане са M-CSF (mMØ) и индуковане са GM-CSF (gmMØ).

Познато је да sMØ експримирају пан-макрофагни интрацелуларни (CD68) маркер карактеристичан за M1 тип, као и M2 маркер (CD206), што указује да су sMØ хетерогена популација ћелија, при чему је удео M2 макрофага скоро 4 пута већи у односу на M1 (Tedesco *u cap.* 2015). Осим тога показано је да LPS/IFN- γ стимулисане sMØ поседују фибробластоидну морфологију у култури за разлику од IL-4/IL-13 индукованих M2 макрофага који су углавном округлог облика (Vogel *u cap.* 2014, Tedesco *u cap.* 2015). Ми смо у нашим испитивањима показали да PL-MSc доводе до смањења експресије CD206 молекула на sMØ, док је експресија CD73 била повећана што указује на повећану метаболичку активност ових ћелија. Са друге стране, нађена је снижена интрацелуларна експресија IL-10 и TGF- β као и продукција IL-13 (M2 индуктора) од стране sMØ у ко-култури са PL-MSc. На основу ових резултата може се закључити да PL-MSc фаворизују M1 поларизацију sMØ у ко-култури. Међутим, експресија TLR4 на sMØ је снижена што може указивати да sMØ смањују осетљивост на LPS. Међутим, продукција IFN- γ (M1

индуктора) и TNF- α је такође била снижена од стране sM \emptyset у ко-култури са PL-*MSC*, што иде у прилог M2 поларизације.

До сада је показано да *MSC* преко IL-6 утичу на M2 поларизацију M \emptyset тако што повећавају експресију CD206 молекула (Fernando *и сар.* 2014). Ми смо показали да је продукција IL-6 од стране PL-*MSC* повећана у ко-култури са sM \emptyset , али да је истовремено експресија CD206 на sM \emptyset снижена. С друге стране, исти аутори сугеришу да IL-6 у комбинацији са IFN- γ доводи до повећања продукције TNF- α од стране M \emptyset . За разлику од тога, ми смо показали да је продукција TNF- α значајно снижена од стране sM \emptyset . Сумирајући све резултате можемо закључити да PL-*MSC* преодоминантно фаворизују M1 поларизацију при чему се може претпоставити да је повећана продукција IL-6 недовољна да усмери диференцијацију у правцу M2 фенотипа. Остаје отворена и друга могућност да је у хетерогеној популацији sM \emptyset могућа диференцијација како у правцу M1 тако и M2 субпопулације од стране PL-*MSC*.

У наредним експериментима испитивали смо интеракцију PL-*MSC* и mM \emptyset . У литератури смо пронашли податак да је експресија CD80 молекула повећана на mM \emptyset након њихове M1 поларизације помоћу LPS/IFN- γ (Jaguin *и сар.* 2013). Овакав феномен запазили смо у нашим испитивањима интеракције PL-*MSC* и mM \emptyset . Осим тога, нашли смо повећање експресије CD86, CD73 и CD39 молекула на mM \emptyset . Ранија истраживања су показала да је на IL-4 стимулираним (M2) mM \emptyset повећана експресија CD206, а снижена експресија CD14, док је експресија CD16 повећана на IL-10 стимулираним (M2) mM \emptyset (Ambarus *и сар.* 2012). Ми смо показали да је експресија CD206 на mM \emptyset повећана у ко-култури са PL-*MSC*, што је у складу са подацима из литературе. Међутим експресија CD14 молекула је такође била повећана, што је у супротности са литературом. Иако је продукција IL-10 у ко-култури PL-*MSC* и mM \emptyset била повећана, експресија CD16 на mM \emptyset није била значајно модулирана. У литератури је такође показано да је способност mM \emptyset да поларизују у смеру M1 удружена са повећаном продукцијом TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 (Jaguin *и сар.* 2013). Ми смо у нашим испитивањима показали да је продукција IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-27 и IL-12p70 била снижена, као и интрацелуларна експресија IL-12p40 у од стране mM \emptyset у ко-култури са PL-*MSC*. Обзиром да је продукција IL-1 β , TNF- α , IL-27 и IL-12p70 била значајно снижена у ко-култури са директним контактом и уметком, претпоставили смо да је ово

последица утицаја солубилног фактора продукованог од стране PL-MSC, док су за снижење продукције IL-8 највероватније одговорни међућелијски контакти PL-MSC и mMØ. Нашли смо да PL-MSC смањују и продукцију IFN- γ од стране mMØ у култури што можда смањује аутокрини ефекат овог молекула на mMØ у правцу M1 поларизације. Шта више, експресија неких Th2 (IL-4 и IL-5) и Tregs (IL-10 и TGF- β) цитокина у ко-култури ових ћелија је била повећана. Обзиром да је интрацелуларна експресија IL-10 и TGF- β била повећана у mMØ и непромењена у PL-MSC, претпоставили смо да је повећање продукције ових цитокина у супернатантима култура може бити последица утицаја PL-MSC на mMØ.

Осим поменутих цитокина, наши резултати су показали да mMØ стимулишу IL-6 продукцију од стране PL-MSC и то путем директних међућелијских контаката. Обзиром да је за снижење продукције проинфламацијских цитокина одговоран солубилни фактор продукован од стране PL-MSC, као и да је од раније познато да MSC преко IL-6 повећавају експресију CD206 молекула на MØ (Fernando *u cap.* 2014), претпоставили смо да је овај цитокин такође одговоран за смањење продукције Th1 цитокина од стране mMØ. За овај феномен делом је можда одговоран и IDO-1. Показано је да IDO-1 поспешује диференцијацију моноцита у M2 (CD14⁺CD206⁺) макрофаге (Francois *u cap.* 2012). Наши резултати у складу са литературом показују да је IDO-1 интрацелуларна експресија у PL-MSC значајно повећана у ко-култури са mMØ, као и експресија CD206 и CD14 на mMØ. Подаци из литературе указују да је експресија CD206 маркера, карактеристичног за алтернативно активирани MØ, повећана као и интрацелуларна експресија IL-10 и IL-12 у sMØ у ко-култури са BM-MSC (Kim и Nemati 2009). Такође је у ко-култури са гингивалним (G)-MSC осим повећане експресије CD206, нађена повишена продукција IL-10 и IL-6 а снижена продукција TNF- α (Zhang *u cap.* 2010b).

На основу изнетих резултата, закључили смо да PL-MSC претежно фаворизују M2 поларизацију mMØ на тај начин што повећавају експресију CD206 и CD14 молекула на mMØ, смањују продукцију проинфламацијских а повећавају продукцију Th2 и Tregs цитокина. Осим тога mMØ утичу на PL-MSC да повећано продукују IL-6 и IDO-1.

У последњем делу испитивана је интеракција PL-MSC и gmMØ. Познато је да gmMØ карактерише M1 фенотип (Sesia *u cap.* 2015). Досадашња истраживања су показала да у интеракцији плаценталних (p)MSC и gmMØ долази морфолошких

(издужена, фибробластоидна форма MØ прелази у звездасту), затим фенотипских промена gmMØ које карактерише повећање експресије CD14 и CD206, а смањење експресије ко-стимулаторних молекула CD80 и CD86. Такође је снижена продукција про-инфламацијских (IL-1 β и IL-12p70), а повећана продукција имунорегулацијских (IL-10) цитокина (Abumaree *и сар.* 2013). У литератури је такође показано да је експресија CD206 и CD16 повећана на MØ у култури са AT-MSK (Adutler-Lieber *и сар.* 2013). Ми смо, слично овим налазима, показали да је у на gmMØ повећана експресија CD14 и CD16 молекула, док је истовремено снижена продукција про-инфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-8). Продукција IL-1 β , TNF- α и IFN- γ била снижена у ко-култури са директним контактом и култури gmMØ третираних са CM PL-MSK, на основу чега смо закључили да је солубилни фактор продукован од стране PL-MSK највероватније довео до снижења ових цитокина, док су за снижење продукције IL-8 одговорни директни међућелијски контакти. Међутим продукција IL-12p70 није била значајно промењена у ко-култури ових ћелија за разлику од IL-6 чија је продукција била повишена од стране PL-MSK, а за шта су највероватније одговорни директни међућелијски контакти PL-MSK и gmMØ. Продукција IL-6 је такође била повишена у култури gmMØ третираних са CM PL-MSK, што је последица продукованих солубилних фактора од стране PL-MSK. Осим снижења продукције про-инфламацијских цитокина од стране овако добијених gmMØ, показали смо да је продукција IL-4 и TGF- β повишена, док је истовремено снижена продукција IL-13 у ко-култури PL-MSK и gmMØ.

Осим поменутих маркера резултати показују да је експресија CD209 (DC *sign*) и CD1a такође повећана на gmMØ у ко-култури са PL-MSK. На основу само овог резултата може се рећи да је у популацији GM-CSF индукваних MØ присутан одређен удео DC. Међутим базална експресија CD11c (маркер MØ) на gmMØ је била око 80% и није битније модулирана у ко-култури са PL-MSK. На основу експресије ова два површинска маркера, може се рећи да се у процесу диференцијације са GM-CSF добија прелазна форма MØ са појединим карактеристикама DC.

Сумарно, наши резултати показују да PL-MSK имају значајну и веома комплексну улогу у патогенези PL. У томе су битне двосмерне комуникације између PL-MSK и фагоцита (претежно гранулоцита и макрофага) које се остварују

преко директних контаката и солубилних фактора. Исход ових интеракција зависи од функционалног статуса како PL-MSС тако и фагоцита интеракције између MSС изолованих из запаљенских лезија и фагоцита, до сада нису испитивани на оваквим моделима и зато представљају погодну основу за дизајнирање нових експеримената, а у циљу бољег разумевања функције PL-MSС као циљних ћелија у терапији PL.

6. Закључци

У складу са постављеним циљевима, а на основу добијених резултата могу се извести следећи

ЗАКЉУЧЦИ:

1. MSC успостављене из хуманих PL поседују морфолошке карактеристике фибробласта, поседују капацитет за самообнављање, формирају колоније у култури и показују експоненцијални ток раста, достижући плато у периоду између 5. и 7. дана.
2. PL-MSC имају способност диференцијације у остеобласте, хондробласте и адипоците, при чему је потенцијал остеогенезе највећи а адипогенезе најмањи.
3. PL-MSC испољавају маркере типичне за MSC других денталних ткива са највећом експресијом CD90, CD73, CD56, CD105 и CD166, умереном експресијом CD146 и CD44 и најмањом експресијом CD39, SSEA4 и STRO-1 молекула.
4. Ни један од испитиваних маркера на изолованим, и у култури пропагираним PL-MSC, није специфичан за MSC *in situ*. Највећи број маркера је испољен на ендотелу крвних судова капилара и посткапиларних венула као и појединих перицита, на основу чега се може претпоставити да је највероватније субпопулација перицита резервоар PL-MSC.
5. PL-MSC су подложне деловању агониста TLR и проинфламацијских медијатора.
6. LPS повећава експресију CD73 и IDO-1 као и продукцију IL-6, IL-8 и IFN- γ од стране PL-MSC. Poly I:C повећава експресију CD73 и IDO-1 и продукцију IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10 и IL-27. Ram3CSK4 повећава експресију CD73 и IDO-1 и продукцију IL-6 и IL-12 а смањује експресију CD166 и продукцију IL-1 β , TGF- β и IL-27. Коктел проинфламацијских медијатора (IL-1 β , IL-6, TNF- α и PGE₂) повећава експресију CD73, IDO-1, IL-4 и IL-5 а смањује продукцију IL-8 и TGF- β од стране PL-MSC.
7. PL-MSC, успостављене из асимптоматских PL, повећавају продукцију имунорегулацијских цитокина (IL-10, IL-27 и TGF- β) у култури од стране IC из асимптоматских PL. Ефекат PL-MSC на продукцију IL-10 и IL-27 је

- посредован солубилним факторима а за ефекат на продукцију TGF- β су највероватније одговорни директни међућелијски контакти.
8. PL-MSc изоловане из клинички различитих лезија (симптоматске и асимптоматске) имају сличан модулацијски утицај на PL-MNC, али је одговор PL-MNC различит.
 9. Су PL-MNC смањују продукцију сва три проинфламацијска цитокина (IL-1 β , TNF- α и IL-8), а повећавају продукцију TGF- β у ко-култури са PL-MSc. AsPL-MNC смањују продукцију IL-1 β и TNF- α а повећавају продукцију TGF- β и IL-10 под истим експерименталним условима.
 10. PL-MSc (перипити) остварују блиске контакте са гранулоцитима и макрофагима *in situ*, што може бити основа њихових двосмерних комуникација показаних у *in vitro* испитивањима.
 11. PL-MSc смањују продукцију TNF- α од стране нестимулисаних и активисаних (LPS, fMLP) гранулоцита периферне крви путем солубилних фактора, док сва три типа гранулоцита посредством директних контаката стимулишу продукцију IL-6 од стране PL-MSc. PL-MSc такође смањују продукцију IL-27 од стране fMLP активисаних гранулоцита преко солубилних медијатора, док LPS активисани гранулоцити путем директних контаката повећавају продукцију TGF- β од стране PL-MSc.
 12. PL-MSc инхибирају апоптозу, како нестимулисаних тако и стимулисаних (LPS или fMLP) гранулоцита периферне крви, као и гранулоцита из PL, највероватније путем директних међућелијских контаката и солубилних продуката, од којих IL-6 има доминантан ефекат.
 13. NET повећава продукцију IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-4, TGF- β а смањује продукцију IFN- γ и IL-27 од стране PL-MSc у култури.
 14. PL-MSc смањују експресију CD206 и TLR-4 и продукцију TNF- α , IFN- γ , IL-13, IL-10 и TGF- β , а повећавају експресију CD73 од стране sM \emptyset у култури, што указује на потенцијалну диференцијацију sM \emptyset у субпопулацију M1 фенотипа.
 15. PL-MSc повећавају експресију CD80, CD86, CD14, CD206, CD73 и CD39 и продукцију IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и TGF- β , а смањују продукцију IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12p40, IL-12p70 и IFN- γ од стране mM \emptyset , што указује на поларизацију mM \emptyset у правцу M2 фенотипа.

16. PL-MSc повећавају експресију CD14, CD16, CD73, CD209 и CD1a и продукцију IL-4 и IL-6, а снижавају продукцију IL-1 β , TNF- α , IL-8 и IFN- γ од стране gmM \emptyset , што указује на њихову поларизацију у правцу M2 фенотипа.
17. Све три субпопулације M \emptyset стимулишу продукцију IL-6 од стране PL-MSc у ко-култури али различито модулирају фенотипска својства ових ћелија.

7. Литература

- Abou-Rass M, Bogen G (1998) Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* **31**(1), 39-47.
- Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, Fatani AS, Chamley LW, Knawy BA (2013) Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* **9**(5), 620-641.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**(6797), 782-787.
- Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, Asher E, Loberman D, Raanani E, Leor J (2013) Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **18**(1), 78-86.
- Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**(4), 1815-1822.
- Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K (2010) In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant* **24**(2), E23-28.
- Airas L (1998) CD73 and adhesion of B-cells to follicular dendritic cells. *Leuk Lymphoma* **29**(1-2), 37-47.
- Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S (1997) Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol* **136**(2), 421-431.
- AlAmer N, Bondalapati A, Garcia-Godoy F, Kandalam U (2016) Osteogenic Differentiation of Orofacial Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells- A Review. *Current Tissue Engineering* **5**(1), 11-20.
- Algars A, Karikoski M, Yegutkin GG, Stoitzyner P, Niemela J, Salmi M, Jalkanen S (2011) Different role of CD73 in leukocyte trafficking via blood and lymph vessels. *Blood* **117**(16), 4387-4393.
- Alkaisu A, Ismail AR, Mutum SS, Ahmad ZA, Masudi S, Abd Razak NH (2013) Transplantation of human dental pulp stem cells: enhance bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* **71**(10), 1758 e1751-1713.
- Alkhalil M, Smajilagic A, Redzic A (2015) Human dental pulp mesenchymal stem cells isolation and osteoblast differentiation. *Med Glas (Zenica)* **12**(1), 27-32.

- Allard U, Nord CE, Sjoberg L, Stromberg T (1979) Experimental infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* in the jaws of dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **48**(5), 454-462.
- Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, Tak PP, Baeten DL (2012) Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* **375**(1-2), 196-206.
- Amulic B, Hayes G (2011) Neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **21**(9), R297-298.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* **197**(12), 1701-1707.
- Anderson CF, Mosser DM (2002) A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol* **72**(1), 101-106.
- Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zoller M (1992) Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* **257**(5070), 682-685.
- Arora H, Madapusi BT, Ramamurti A, Narasimhan M, Periasamy S, Rao SR (2016) Immunohistochemical Localization of Epithelial Mesenchymal Transition Markers in Cyclosporine A Induced Gingival Overgrowth. *J Clin Diagn Res* **10**(8), ZC48-52.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**(7), 1303-1313.
- Asanbe O, Hooper R, Elshazly T, Osoria H, Jacoby A, Joyce J, Weinreb R, Stroock A, Spector J, Walters R, Bernstein J, Vishnevsky B, Morgan J (2014) Innovative 3D Collagen Microsphere Scaffold (MSS) Promotes Robust Cellular Invasion. *Plastic and Reconstructive Surgery* **134**, 28.
- Atari M, Barajas M, Hernandez-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Ferres Padro E, Giner L, Casals N (2011) Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol* **26**(8), 1057-1070.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**(4), 1045-1049.
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W (2011) Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* **88**(2), 130-141.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* **18**(1), 767-811.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**(6673), 245-252.

- Bansal R, Jain A (2015) Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med* **6**(1), 29-34.
- Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, Sampol J, Dignat-George F (2001) Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* **98**(13), 3677-3684.
- Barraud P, Stott S, Mollgard K, Parmar M, Bjorklund A (2007) In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* **85**(2), 250-259.
- Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, de Chaisemartin L, Gorges R, Sandre C, Mascarell L, Balabanian K, Kerdine-Romer S, Pallardy M, Marin-Esteban V, Chollet-Martin S (2014) Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **193**(11), 5689-5698.
- Bartaula-Brevik S, Pedersen TO, Blois AL, Papadakou P, Finne-Wistrand A, Xue Y, Bolstad A, Mustafa K (2014) Leukocyte transmigration into tissue-engineered constructs is influenced by endothelial cells through Toll-like receptor signaling. *Stem Cell Res Ther* **5**(6), 143.
- Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Muller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Buhning HJ (2009) Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **94**(2), 173-184.
- Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. (1991) Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* **17**(8), 380-383.
- Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* **173**(3), 771-774.
- Beadling C, Slifka MK (2006) Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**(1), 15-24.
- Bernardo ME, Fibbe WE (2013) Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* **13**(4), 392-402.
- Bianco P (2014) "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 677-704.
- Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, Herbert BR (2012) Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* **10**, 172.
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**(5), 657-670.
- Bosmann M, Ward PA (2013) Modulation of inflammation by interleukin-27. *J Leukoc Biol* **94**(6), 1159-1165.

- Brandau S, Jakob M, Bruderek K, Bootz F, Giebel B, Radtke S, Mauel K, Jager M, Flohe SB, Lang S (2014) Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One* **9**(9), e106903.
- Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, Lang S (2010) Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol* **88**(5), 1005-1015.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**(5663), 1532-1535.
- Buckwalter MR, Albert ML (2009) Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr Biol* **19**(9), R355-361.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C (2008) Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* **45**(2), 115-120.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* **1**(12), 1623-1634.
- Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* **213**(2), 341-347.
- Carlsson J (1990) Microbiology of plaque associated periodontal disease. In: *Textbook of clinical periodontology*. Lindhe J, editor. Copenhagen: Munksgaard, 129-152.
- Carneiro-Ramos MS, da Silva VB, Coutinho MB, Jr., Battastini AM, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML (2004) Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* **265**(1-2), 195-201.
- Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, Beretti F, Maraldi T, Zavatti M, Cavallini GM, La Sala GB, Ferrari A, De Pol A (2013) In vitro differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig Liver Dis* **45**(8), 669-676.
- Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, Pizzi G, Nunnari M, Gitto G, Fabiano V, Parisi A, Venuti A (2009) Ultrastructural descriptions of pericyte/endothelium peg-socket interdigitations in the microvasculature of human gastric carcinomas. *Anticancer Res* **29**(1), 449-453.
- Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G (1992) IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* **148**(10), 3216-3220.
- Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C, Calzetti F, Pelletier M, Pizzolo G, Krampera M (2011) Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal

- Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. *Stem Cells* **29**(6), 1001-1011.
- Chan C-K, Wu K-H, Lee Y-S, Hwang S-M, Lee M-S, Liao S-K, Cheng E-H, See L-C, Tsai C-N, Kuo M-L, Huang J-L (2012) The Comparison of Interleukin 6–Associated Immunosuppressive Effects of Human ESCs, Fetal-Type MSCs, and Adult-Type MSCs. *Transplantation Journal* **94**(2), 132-138.
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY (2005) NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* **84**(11), 994-998.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**(27), 19027-19030.
- Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* **3**(4), e1886.
- Chen YK, Huang AH, Chan AW, Lin LM (2013) Human dental pulp stem cells derived from cryopreserved dental pulp tissues of vital extracted teeth with disease demonstrate hepatic-like differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Chen YK, Huang AH, Chan AW, Shieh TY, Lin LM (2011) Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *J Oral Pathol Med* **40**(10), 793-800.
- Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS (2014) The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol* **41**(6), 541-549.
- Choi H, Jin H, Kim JY, Lim KT, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung PH (2014) Hypoxia promotes CEMP1 expression and induces cementoblastic differentiation of human dental stem cells in an HIF-1-dependent manner. *Tissue Eng Part A* **20**(1-2), 410-423.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* **2**(2), 351-360.
- Čolić M, Gazivoda D, Majstorović I, Dragičević A, Vasilijić S, Rudolf R, Milosavljević P, Vučević D (2009a) Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *J Dent Res* **88**(12), 1142-1147.
- Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Majstorović I, Vasilijić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P (2009b) Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res* **88**(11), 997-1002.
- Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A (2009c) Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* **47**(1), 101-113.

- Čolić M, Lukić A, Vučević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M, Dimitrijević J (2006) Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol* **51**(12), 1120-1130.
- Čolić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vučević D, Marjanović M, Lukić A (2007) Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci* **115**(4), 315-320.
- Collins DP (2000) Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. *J Immunol Methods* **243**(1-2), 125-145.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**(1), 367-372.
- Corselli M, Chen CW, Sun B, Yap S, Rubin JP, Peault B (2012) The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **21**(8), 1299-1308.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**(3), 301-313.
- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR (2008) Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**(3), C675-682.
- Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**(3), 375-386.
- Cui L, Xu SM, Ma DD, Wu BL (2014) The effect of TRPM7 suppression on the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Int Endod J* **47**(6), 583-593.
- Culty M, Miyake K, Kincade PW, Sikorski E, Butcher EC, Underhill C (1990) The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1), 2765-2774.
- Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T (2014) Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* **33**(10), 1104-1116.
- Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N (2006) Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26), 9912-9917.

- Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L (2000) Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**(4), 514-517.
- Dazzi F, Krampera M (2011) Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**(1), 49-57.
- de Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, de Jesus SF, Vilela DN, Pereira CS, Batista Domingos PL, Viana AG, Jham BC, Batista de Paula AM, Sena Guimaraes AL (2013) Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* **39**(4), 453-455.
- De Rossi A, Fukada SY, De Rossi M, da Silva RA, Queiroz AM, Nelson-Filho P, da Silva LA (2016) Cementocytes Express Receptor Activator of the Nuclear Factor Kappa-B Ligand in Response to Endodontic Infection in Mice. *J Endod* **42**(8), 1251-1257.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* **89**(2-3), 267-270.
- Demircan PC, Sariboyaci AE, Unal ZS, Gacar G, Subasi C, Karaoz E (2011) Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* **13**(10), 1205-1220.
- Djokic J, Tomic S, Cerovic S, Todorovic V, Rudolf R, Colic M (2012) Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol* **39**(9), 807-816.
- Đokić J, Tomić S, Cerović S, Todorović V, Rudolf R, Čolić M (2012) Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol* **39**(9), 807-816.
- Đokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Čolić M (2013) Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **43**(7), 1862-1872.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**(4), 315-317.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* **17**(9), 984-992.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* **80**(6), 1298-1307.

- Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, Nordhues U, Sorg C, Sunderkotter C, Roth J (2007) Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* **109**(3), 1265-1274.
- El Alami M, Vina-Almunia J, Gambini J, Mas-Bargues C, Siow RC, Penarrocha M, Mann GE, Borrás C, Vina J (2014) Activation of p38, p21, and NRF-2 mediates decreased proliferation of human dental pulp stem cells cultured under 21% O₂. *Stem Cell Reports* **3**(4), 566-573.
- Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* **90**(3), 200-206.
- Farea M, Husein A, Halim AS, Abdullah NA, Mokhtar KI, Lim CK, Berahim Z, Mokhtar K (2014) Synergistic effects of chitosan scaffold and TGFbeta1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. *Arch Oral Biol* **59**(12), 1400-1411.
- Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Tan W, Huang D, Lu X, Tao T, Zhang J, Li L, Gu Z (2014a) Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res* **356**(2), 369-380.
- Feng X, Huang D, Lu X, Feng G, Xing J, Lu J, Xu K, Xia W, Meng Y, Tao T, Li L, Gu Z (2014b) Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway. *Development, Growth & Differentiation* **56**(9), 615-624.
- Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM (2014) The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One* **9**(4), e94188.
- Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F (2012) Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PLoS One* **7**(11), e48945.
- Figdor D, Sjogren U, Sorlin S, Sundqvist G, Nair PN (1992) Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Oral Microbiol Immunol* **7**(3), 129-136.
- Fox NW, Damjanov I, Knowles BB, Solter D (1984) Stage-specific embryonic antigen 3 as a marker of visceral extraembryonic endoderm. *Dev Biol* **103**(1), 263-266.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* **2**(3), 216-227.
- Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J (2012) Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* **20**(1), 187-195.

- Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* **24**(1), 25-31.
- Furze RC, Rankin SM (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* **125**(3), 281-288.
- Gabrysova L, Howes A, Saraiva M, O'Garra A (2014) The regulation of IL-10 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **380**, 157-190.
- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* **109**(4), 1743-1751.
- Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B (2013) The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **13**(8), 566-577.
- Gao L, Jiang WX, Niu CG, He ZY, Zhu CL, Huang ZW (2015) [Exploring the stem cell surface markers expressed in human dental pulp stem cells]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **24**(3), 257-262.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M (2007) Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* **10**(3), 149-160.
- Gazdić M, Volarević V, Arsenijević N, Stojković M (2015) Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* **11**(2), 280-287.
- Gazivoda D, Džopalić T, Bozić B, Tatomirović Z, Brkić Z, Čolić M (2009) Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med* **38**(7), 605-611.
- Geginat J, Paroni M, Kastirr I, Larghi P, Pagani M, Abrignani S (2016) Reverse plasticity: TGF-beta and IL-6 induce Th1-to-Th17-cell transdifferentiation in the gut. *Eur J Immunol* **46**(10), 2306-2310.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**(1), 71-82.
- Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brone B, Lambrichts I, Martens W (2015) Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev* **24**(3), 296-311.
- Gilfillan AM, Austin SJ, Metcalfe DD (2011) Mast cell biology: introduction and overview. *Adv Exp Med Biol* **716**, 2-12.
- Glick M, Trope M, Bagasra O, Pliskin ME (1991) Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **71**(6), 733-736.

- Gnecchi M, Melo LG (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol* **482**, 281-294.
- Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K (2007) Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo* **21**(5), 757-769.
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**(12), 953-964.
- Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM (1993) Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol* **151**(3), 1482-1490.
- Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D (1994) Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* **2**(1), 7-14.
- Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M (2001) Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* **31**(1), 48-56.
- Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S (2011) A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol* **698**, 107-121.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25), 13625-13630.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**, 621-667.
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**(8), 571-578.
- Haeryfar SM, Hoskin DW (2004) Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* **173**(6), 3581-3588.
- Harvanova D, Tothova T, Sarisky M, Amrichova J, Rosocha J (2011) Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)* **57**(3), 119-124.
- Hasegawa N, Kawaguchi H, Ogawa T, Uchida T, Kurihara H (2003) Immunohistochemical characteristics of epithelial cell rests of Malassez during cementum repair. *J Periodontal Res* **38**(1), 51-56.
- He F, Yang Z, Tan Y, Yu N, Wang X, Yao N, Zhao J (2009) Effects of Notch ligand Delta1 on the proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Arch Oral Biol* **54**(3), 216-222.

- He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, Zhao X, Wang P (2013) LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J* **46**(2), 128-136.
- Henderson B, Poole S, Wilson M (1996) Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* **60**(2), 316-341.
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* **20**(4), 329-337.
- Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrechts I, Bronckaers A (2013) Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* **353**(1), 65-78.
- Hilkens P, Meschi N, Lambrechts P, Bronckaers A, Lambrechts I (2015) Dental Stem Cells in Pulp Regeneration: Near Future or Long Road Ahead? *Stem Cells Dev* **24**(14), 1610-1622.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* **41**(16), 2502-2512.
- Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P (2009) Elevated circulating and synovial fluid endoglin are associated with primary knee osteoarthritis severity. *Arch Med Res* **40**(7), 590-594.
- Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H (1990) A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* **16**(7), 331-334.
- Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, Ozaki K, Matsuo T (2013) TLR3 agonist enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1beta-stimulated human gingival fibroblasts. *Cell Immunol* **283**(1-2), 8-11.
- Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshiba K, Yoshiba N, Nakaya H, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H (2006) Immunohistochemical localization of alpha-Smooth muscle actin during rat molar tooth development. *J Histochem Cytochem* **54**(12), 1371-1378.
- Hu X, Ivashkiv LB (2009) Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* **31**(4), 539-550.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* **88**(9), 792-806.
- Hume DA (2008) Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol* **1**(6), 432-441.

- Ishkitiev N, Yaegaki K, Kozhuharova A, Tanaka T, Okada M, Mitev V, Fukuda M, Imai T (2013) Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117(+) stem cells. *Regen Med* **8**(5), 597-612.
- Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K (2016) Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg* **45**(1), 124-131.
- Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* **281**(1), 51-61.
- James AW (2013) Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)* **2013**, 684736.
- Janatpour MJ, Hudak S, Sathe M, Sedgwick JD, McEvoy LM (2001) Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *J Exp Med* **194**(9), 1375-1384.
- Jessell TM, Dodd J (1985) Structure and expression of differentiation antigens on functional subclasses of primary sensory neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **308**(1136), 271-281.
- Jiang XX, Zhang Y, Li XS, Wu Y, Yu XD, Tang PH, Mao N (2005) [Osteoblasts derived from mesenchymal stem cells harbor immunoregulatory effect]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **13**(1), 50-53.
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* **46**(12), 3349-3360.
- Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G (2009) Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**, 167-175.
- Kahlert C, Weber H, Mogler C, Bergmann F, Schirmacher P, Kenngott HG, Mattered U, Mollberg N, Rahbari NN, Hinz U, Koch M, Aigner M, Weitz J (2009) Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *Br J Cancer* **101**(3), 457-464.
- Kallioli GD, Zhao B, Triantafyllopoulou A, Park-Min K-H, Ivashkiv LB (2010) IL-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of NFATc1 and suppressing proximal RANK signaling. *Arthritis & Rheumatism*, NA-NA.
- Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, Wada S (2007) Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* **25**(5), 277-285.

- Kansas GS, Wood GS, Tedder TF (1991) Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* **146**(7), 2235-2244.
- Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R (2012) Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp*(69).
- Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH (2015) Porphyromonas gingivalis Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF-kappaB Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem* **290**(33), 20147-20158.
- Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, Yamashiro T (2012) Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res* **318**(5), 453-463.
- Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML (1997) Neutrophil superoxide release is required for spontaneous and FMLP-mediated but not for TNF alpha-mediated apoptosis. *J Am Soc Nephrol* **8**(7), 1091-1100.
- Kim J, Hematti P (2009) Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* **37**(12), 1445-1453.
- Kimura A, Kishimoto T (2010) IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* **40**(7), 1830-1835.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* **9**(1), 204.
- Konno A, Ahn JS, Kitamura H, Hamilton MJ, Gebe JA, Aruffo A, Davis WC (2001) Tissue distribution of CD6 and CD6 ligand in cattle: expression of the CD6 ligand (CD166) in the autonomic nervous system of cattle and the human. *J Leukoc Biol* **69**(6), 944-950.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA (2011) IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12**(3), 231-238.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1996) Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* **27**(5), 852-857.
- Kuci S, Kuci Z, Kreyenberg H, Deak E, Putsch K, Huenecke S, Amara C, Koller S, Rettinger E, Grez M, Koehl U, Latifi-Pupovci H, Henschler R, Tonn T, von Laer D, Klingebiel T, Bader P (2010) CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica* **95**(4), 651-659.

- Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V (2015) Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank* **16**(4), 513-522.
- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N (1999) Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* **59**(4), 856-861.
- Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* **6**(5), 552-570.
- Le Blanc K, Davies LC (2015) Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*.
- Lee JH, Um S, Jang JH, Seo BM (2012) Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Tissue Res* **348**(3), 475-484.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**(5), 1669-1675.
- Lee RS, Ford HC (1988) 5'-Nucleotidase of human placental trophoblastic microvilli possesses cobalt-stimulated FAD pyrophosphatase activity. *J Biol Chem* **263**(29), 14878-14883.
- Lee TH, Kim WT, Ryu CJ, Jang YJ (2015) Optimization of treatment with recombinant FGF-2 for proliferation and differentiation of human dental stem cells, mesenchymal stem cells, and osteoblasts. *Biochem Cell Biol* **93**(4), 298-305.
- Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP (1989) MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24), 9891-9895.
- Leon B, Ardavin C (2008) Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* **86**(4), 320-324.
- Lesley J, Schulte R, Hyman R (1990) Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp Cell Res* **187**(2), 224-233.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**(9), 678-689.
- Li JP, Wu H, Xing W, Yang SG, Lu SH, Du WT, Yu JX, Chen F, Zhang L, Han ZC (2010a) Interleukin-27 as a Negative Regulator of Human Neutrophil Function. *Scandinavian Journal of Immunology* **72**(4), 284-292.
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010b) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine* **207**(9), 1853-1862.

- Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR (2003) Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol* **201**(2), 296-302.
- Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y (2012) Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ* **19**(9), 1505-1513.
- Li X, Kondo Y, Bao YI, Staudenmaier L, Lee A, Zhang J, Ledderose C, Wen F, Junger W (2016) Removal of extracellular ATP improves fMLP-induced neutrophil chemotaxis. *European Respiratory Journal* **48**(suppl 60), PA352.
- Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT (2011) Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod* **37**(9), 1217-1224.
- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D (2003) Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* **36**(7), 464-471.
- Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, Lin CS (2011) Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev* **20**(10), 1747-1752.
- Liu D, Xu J, Liu O, Fan Z, Liu Y, Wang F, Ding G, Wei F, Zhang C, Wang S (2012) Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation. *J Clin Periodontol* **39**(12), 1174-1182.
- Liu Y, Gao Y, Zhan X, Cui L, Xu S, Ma D, Yue J, Wu B, Gao J (2014) TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells. *J Endod* **40**(9), 1375-1381.
- Lojewski X, Srimasorn S, Rauh J, Francke S, Wobus M, Taylor V, Arauzo-Bravo MJ, Hallmeyer-Elgner S, Kirsch M, Schwarz S, Schwarz J, Storch A, Hermann A (2015) Perivascular Mesenchymal Stem Cells From the Adult Human Brain Harbor No Intrinsic Neuroectodermal but High Mesodermal Differentiation Potential. *Stem Cells Transl Med* **4**(10), 1223-1233.
- Lui PP (2015) Stem cell technology for tendon regeneration: current status, challenges, and future research directions. *Stem Cells Cloning* **8**, 163-174.
- Lukić A, Arsenijević N, Vujanić G, Ramić Z (1990) Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* **16**(3), 119-122.
- Lukić A, Vasilijić S, Majstorović I, Vučević D, Mojsilović S, Gazivoda D, Danilović V, Petrović R, Čolić M (2006) Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int Endod J* **39**(8), 626-636.
- Luu NT, McGettrick HM, Buckley CD, Newsome PN, Rainger GE, Frampton J, Nash GB (2013) Crosstalk between mesenchymal stem cells and endothelial cells leads to

- downregulation of cytokine-induced leukocyte recruitment. *Stem Cells* **31**(12), 2690-2702.
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY (2014) Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **32**(6), 1408-1419.
- Mahita VN, Manjunatha BS, Shah R, Astekar M, Purohit S, Kovvuru S (2015) Quantification and localization of mast cells in periapical lesions. *Ann Med Health Sci Res* **5**(2), 115-118.
- Maienschein V, Zimmermann H (1996) Immunocytochemical localization of ecto-5'-nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* **70**(2), 429-438.
- Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al. (1994) The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* **153**(8), 3574-3583.
- Manini I, Gulino L, Gava B, Pierantozzi E, Curina C, Rossi D, Brafa A, D'Aniello C, Sorrentino V (2011) Multi-potent progenitors in freshly isolated and cultured human mesenchymal stem cells: a comparison between adipose and dermal tissue. *Cell Tissue Res* **344**(1), 85-95.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**(8), 519-531.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**(12), 677-686.
- Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R (2011) Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. *Cell Biol Int* **35**(12), 1247-1251.
- Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G, Orrico C, Grossi A, Prati C, Bagnara GP (2009) Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**(3), 699-706.
- Marin-Esteban V, Turbica I, Dufour G, Semiramoth N, Gleizes A, Gorges R, Beau I, Servin AL, Lievin-Le Moal V, Sandre C, Chollet-Martin S (2012) Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infect Immun* **80**(5), 1891-1899.
- Marković M, Tomić S, Đokić J, Mihajlović D, Vučević D, Gazivoda D, Duka M, Čolić M (2016) Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate cytokine production by local immune cells. *Vojnosanit Pregl*(00), 272-272.
- Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrechts I (2012) Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs* **196**(6), 490-500.

- Martin-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009) Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol*(188), 31-49.
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13.
- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jimenez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S (2013) Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* **121**(9), e57-69.
- Marton IJ, Kiss C (2014) Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod* **40**(2), 155-163.
- Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA (2006) Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(1), G45-54.
- Mayer A, Debuissson D, Denanglaire S, Eddahri F, Fievez L, Hercor M, Triffaux E, Moser M, Bureau F, Leo O, Andris F (2014) Antigen presenting cell-derived IL-6 restricts Th2-cell differentiation. *Eur J Immunol* **44**(11), 3252-3262.
- McGeachy MJ, Cua DJ (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**(4), 445-453.
- Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, Granjeiro JM (2006) Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**(3), 404-409.
- Merad M, Manz MG (2009) Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**(15), 3418-3427.
- Mercati F, Pascucci L, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V, Gargiulo AM (2009) Expression of mesenchymal stem cell marker CD90 on dermal sheath cells of the anagen hair follicle in canine species. *Eur J Histochem* **53**(3), 159-166.
- Metzger Z (2000) Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* **16**(1), 1-8.
- Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, Anract P, Cantagrel A, Cattan P, Reimund JM, Aguilar L, Amalric F, Girard JP (2005) A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol* **206**(3), 260-268.
- Mildner A, Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* **40**(5), 642-656.
- Miller WD (1890) The micro-organisms of the human mouth. *Philadelphia: White Dental Mfg. Co.*

- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 5807-5812.
- Mlodzik K, Loffing J, Le Hir M, Kaissling B (1995) Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart. *Histochem Cell Biol* **103**(3), 227-236.
- Moller AJ (1966) Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* **74**(5), Suppl:1-380.
- Moore WE, Moore LV (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 66-77.
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G (2004) Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* **22**(4), 411-417.
- Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* **24**(2), 155-165.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**(12), 958-969.
- Muller WA (2001) New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med* **194**(9), F47-51.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Munir H, Luu NT, Clarke LS, Nash GB, McGettrick HM (2016) Comparative Ability of Mesenchymal Stromal Cells from Different Tissues to Limit Neutrophil Recruitment to Inflamed Endothelium. *PLoS One* **11**(5), e0155161.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG (2002) Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* **81**(11), 761-766.
- Nair PN, Schmid-Meier E (1986) An apical granuloma with epithelial integument. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **62**(6), 698-703.
- Nair PNR (1987) Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* **13**(1), 29-39.
- Nair PNR (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**(6), 348-381.
- Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K (2006) Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol* **154**(6), 1062-1070.

- Narayanan LL, Vaishnavi C (2010) Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* **13**(4), 233-239.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**(3), 173-182.
- Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F (2013) Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med* **11**(3), 235-242.
- Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**(1), 42-49.
- Nemoto E, Kunii R, Tada H, Tsubahara T, Ishihata H, Shimauchi H (2004) Expression of CD73/ecto-5'-nucleotidase on human gingival fibroblasts and contribution to the inhibition of interleukin-1alpha-induced granulocyte-macrophage colony stimulating factor production. *J Periodontal Res* **39**(1), 10-19.
- Nourshargh S, Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **41**(5), 694-707.
- Ofori-Acquah SF, King JA (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res* **151**(3), 122-128.
- Orciani M, Di Primio R (2013) Skin-derived mesenchymal stem cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol* **989**, 275-283.
- Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ (1995) Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* **131**(3), 775-789.
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A, von Andrian UH (2001) Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* **194**(9), 1361-1373.
- Panaro MA, Mitolo V (2008) Cellular Responses to Fmlp Challenging: A Mini-Review. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **21**(3), 397-419.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **191**(3), 677-691.
- Park BW, Jang SJ, Byun JH, Kang YH, Choi MJ, Park WU, Lee WJ, Rho GJ (2014) Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*.

- Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H (2009) Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells* **2**(1), 59-68.
- Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS (2011) Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol* **38**(8), 721-731.
- Park JY, Jeon HJ, Kim TY, Lee KY, Park K, Lee ES, Choi JM, Park CG, Jeon SH (2013) Comparative analysis of mesenchymal stem cell surface marker expression for human dental mesenchymal stem cells. *Regen Med* **8**(4), 453-466.
- Park YS, Lim GW, Cho KA, Woo SY, Shin M, Yoo ES, Chan Ra J, Ryu KH (2012) Improved viability and activity of neutrophils differentiated from HL-60 cells by co-culture with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **423**(1), 19-25.
- Peola S, Borriore P, Matera L, Malavasi F, Pileri A, Massaia M (1996) Selective induction of CD73 expression in human lymphocytes by CD38 ligation: a novel pathway linking signal transducers with ecto-enzyme activities. *J Immunol* **157**(10), 4354-4362.
- Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, Beebe AM, Bancroft GJ, Young DB, O'Garra A (2012) Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guerin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN-gamma and IL-17 responses and increases protection to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **189**(8), 4079-4087.
- Pochampally R (2008) Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol Biol* **449**, 83-91.
- Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS (2012) Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**(1), 127-134.
- Ponnaiyan D, Jegadeesan V (2014) Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur J Dent* **8**(3), 307-313.
- Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki HA (2011) Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev* **7**(3), 569-589.
- Popović J, Cvetković T, Džopalić T, Mitić A, Nikolić M, Barac R (2015) Concentration of transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* **32**, 43-49.
- Preshaw PM, Taylor JJ (2011) How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 60-84.

- Quirici N, Scavullo C, de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Deliliers GL, Brini AT (2010) Anti-L-NGFR and -CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue. *Stem Cells Dev* **19**(6), 915-925.
- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL (2002) Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* **30**(7), 783-791.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V (2008) Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* **26**(1), 151-162.
- Ramesh V, Balamurali PD, Nirima O, Premalatha B, Karthikshree V, Sudhakar R (2005) Incidence of mast cells in oral inflammatory lesions: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **9**(1), 12.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**(5388), 480-483.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K (2002) The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* **196**(4), 517-527.
- Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, Horwitz EM, Schafer R (2013) Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy* **15**(3), 292-306.
- Realì E, Guerrini R, Moretti S, Spisani S, Lanza F, Tomatis R, Traniello S, Gavioli R (1996) Polymorphonuclear neutrophils pulsed with synthetic peptides efficiently activate memory cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* **60**(2), 207-213.
- Rezai Rad M, Wise GE, Brooks H, Flanagan MB, Yao S (2013) Activation of proliferation and differentiation of dental follicle stem cells (DFSCs) by heat stress. *Cell Prolif* **46**(1), 58-66.
- Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J (2009) Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* **5**(4), 378-386.
- Rincon JC, Young WG, Bartold PM (2006) The epithelial cell rests of Malassez--a role in periodontal regeneration? *J Periodontol Res* **41**(4), 245-252.
- Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, Marin N, Martinez S, Moraleda JM (2011) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* **44**(9), 800-806.
- Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J, Anguille S (2013) CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology* **2**(2), e23037.

- Rowe M, Hildreth JE, Rickinson AB, Epstein MA (1982) Monoclonal antibodies to Epstein-Barr virus-induced, transformation-associated cell surface antigens: binding patterns and effect upon virus-specific T-cell cytotoxicity. *Int J Cancer* **29**(4), 373-381.
- Saalbach A, Hausteil UF, Anderegg U (2000) A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* **115**(5), 882-888.
- Sabatte J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, Ceballos A, Giordano M, Vermeulen M, Geffner J (2007) Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(1-2), 5-17.
- Sabroe I, Dower SK, Whyte MK (2005) The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**, S421-426.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* **170**(10), 5268-5275.
- Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K (1994) Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of pre-dentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* **277**(1), 19-26.
- Salles G, Zain M, Jiang WM, Boussiotis VA, Shipp MA (1993) Alternatively spliced CD44 transcripts in diffuse large-cell lymphomas: characterization and comparison with normal activated B cells and epithelial malignancies. *Blood* **82**(12), 3539-3547.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**(4), 1109-1118.
- Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G (2001) CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol* **13**(12), 1571-1581.
- Sato K, Fujita S (2007) Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* **56**(3), 183-191.
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**(1), 195-203.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**(5), 878-888.
- Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D (2009) Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. *J Endod* **35**(5), 634-642.

- Scotton CJ, Martinez FO, Smelt MJ, Sironi M, Locati M, Mantovani A, Sozzani S (2005) Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13. *J Immunol* **174**(2), 834-845.
- Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS (2006) Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* **86**(2), 141-153.
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223.
- Seltzer S, Soltanoff W, Bender IB (1969) Epithelial proliferation in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **27**(1), 111-121.
- Sengelov H (1996) Secretory vesicles of human neutrophils. *Eur J Haematol Suppl* **58**, 1-24.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**(9429), 149-155.
- Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmuller G, Johnson JP (1993) Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8514-8518.
- Sers C, Riethmuller G, Johnson JP (1994) MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Res* **54**(21), 5689-5694.
- Sesia SB, Duhr R, Medeiros da Cunha C, Todorov A, Schaeren S, Padovan E, Spagnoli G, Martin I, Barbero A (2015) Anti-inflammatory/tissue repair macrophages enhance the cartilage-forming capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Cell Physiol* **230**(6), 1258-1269.
- Shah HN, Collins MD (1988) Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**(1), 128-131.
- Sharpe PT (2016) Dental mesenchymal stem cells. *Development* **143**(13), 2273-2280.
- Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG (2011) Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* **34**(4), 590-601.
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* **18**(4), 696-704.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* **29**(6), 532-539.
- Shih IM (1999) The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* **189**(1), 4-11.

- Shojaei S, Jamshidi S, Faradmal J, Biglari K, Khajeh Ahmadi S (2015) Comparison of Mast Cell Presence in Inflammatory Periapical Lesions Including Periapical Cyst and Granuloma Using Cd117 (C-KIT). *Avicenna Journal of Dental Research* **7**(1).
- Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**(3), 151-161.
- Shortman K, Naik SH (2007) Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**(1), 19-30.
- Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ (2005) Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* **20**(5), 310-316.
- Singer NG, Caplan AI (2011) Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* **6**, 457-478.
- Skoberne M, Beignon AS, Bhardwaj N (2004) Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* **10**(6), 251-257.
- Smeltz RB, Chen J, Ehrhardt R, Shevach EM (2002) Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol* **168**(12), 6165-6172.
- Somoza RA, Acevedo CA, Albornoz F, Luz-Crawford P, Carrion F, Young ME, Weinstein-Opppenheimer C (2015) TGFbeta3 secretion by three-dimensional cultures of human dental apical papilla mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* **34**(2), 166-171.
- Spratt DA, Weightman AJ, Wade WG (1999) Diversity of oral asaccharolytic Eubacterium species in periodontitis--identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa. *Oral Microbiol Immunol* **14**(1), 56-59.
- Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V, Altaner C (2014) Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **158**(3), 373-377.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY (1992) Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* **18**(9), 422-426.
- Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Gunthert U (1995) CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* **85**(10), 2885-2899.
- Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**(5), 1142-1162.

- Steinman RM, Hemmi H (2006) Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17-58.
- Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, Thompson LF, Carlson SL, Moe SJ, Carnes DK, Mrsny RJ, Madara JL (1997) Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest* **99**(11), 2588-2601.
- Strojny C, Boyle M, Bartholomew A, Sundivakkam P, Alapati S (2015) Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. *J Endod* **41**(8), 1259-1264.
- Suchanek J, Klepova TS, Kapitan M, Soukup T (2013) The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **56**(4), 142-149.
- Sundqvist G (1994) Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **78**(4), 522-530.
- Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A (1985) Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented Bacteroides. *J Med Microbiol* **19**(1), 85-94.
- Swart GW (2002) Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* **81**(6), 313-321.
- Tang X, Meng H (2009) Osteogenic induction and 1,25-dihydroxyvitamin D3 oppositely regulate the proliferation and expression of RANKL and the vitamin D receptor of human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* **54**(7), 625-633.
- Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, Cignarella A (2015) Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* **220**(5), 545-554.
- Teitelbaum SL (2000) Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* **289**(5484), 1504-1508.
- Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervasio AM, Souza CJ, Rodrigues V, Jr., Loyola AM (2010) Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* **39**(3), 250-256.
- Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, Dvorak AM, Karp JM, Carman CV (2012) Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells* **30**(11), 2472-2486.
- Terada T (2013) Expression of NCAM (CD56), chromogranin A, synaptophysin, c-KIT (CD117) and PDGFRA in normal non-neoplastic skin and basal cell carcinoma: an immunohistochemical study of 66 consecutive cases. *Med Oncol* **30**(1), 444.
- Thompson LF, Ruedi JM, Low MG, Clement LT (1987) Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies. *J Immunol* **139**(12), 4042-4048.

- Tomić S, Đokić J, Vasilijić S, Vučević D, Todorović V, Šupić G, Čolić M (2011) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev* **20**(4), 695-708.
- Travis MA, Sheppard D (2014) TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* **32**, 51-82.
- Trubiani O, Cataldi A, De Angelis F, D'Arcangelo C, Caputi S (2012) Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *Int Endod J* **45**(1), 19-25.
- Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, Marchisio M, Giancola R, Pizzicannella J, Buhning HJ, Piattelli M, Caputi S, Nanci A (2010) Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **225**(1), 123-131.
- Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara ES, Pham HT, Nakajima R, Sonoyama W, Kuboki T (2014) A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Res Ther* **5**(1), 31.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* **219**, 118-142.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**(10), e1000639.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**(4), 668-676.
- Ustiashvili M, Kordzaia D, Mamaladze M, Jangavadze M, Sanodze L (2014) Investigation of functional activity human dental pulp stem cells at acute and chronic pulpitis. *Georgian Med News*(234), 19-24.
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM (1998) Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* **78**(1), 19-21.
- van Kilsdonk JW, Wilting RH, Bergers M, van Muijen GN, Schalkwijk J, van Kempen LC, Swart GW (2008) Attenuation of melanoma invasion by a secreted variant of activated leukocyte cell adhesion molecule. *Cancer Res* **68**(10), 3671-3679.
- Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, Silva A, Gamonal J (2006) RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis* **12**(3), 283-289.

- Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V (2016) Not All Pericytes Are Born Equal: Pericytes from Human Adult Tissues Present Different Differentiation Properties. *Stem Cells Dev.*
- Virtej A, Loes SS, Berggreen E, Bletsa A (2013) Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. *J Endod* **39**(5), 605-611.
- Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS (2013) Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent* **16**(5), 423-428.
- Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH (2014) Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* **219**(9), 695-703.
- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C (2006) Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* **312**(5), 623-629.
- Vong L, Sherman PM, Glogauer M (2013) Quantification and visualization of neutrophil extracellular traps (NETs) from murine bone marrow-derived neutrophils. *Methods Mol Biol* **1031**, 41-50.
- Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP (2003) Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**(2), 128-137.
- Wang JJ, Sun XC, Hu L, Liu ZF, Yu HP, Li H, Wang SY, Wang DH (2013) Endoglin (CD105) expression on microvessel endothelial cells in juvenile nasopharyngeal angiofibroma: tissue microarray analysis and association with prognostic significance. *Head Neck* **35**(12), 1719-1725.
- Wang TF, Guidotti G (1998) Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res* **790**(1-2), 318-322.
- Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K (2012) Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol* **57**(9), 1231-1240.
- Wang Y, Yu X, Chen E, Li L (2016) Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases. *Stem Cell Res Ther* **7**(1), 71.
- Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, Teixeira FB, Preisser JS (2010) Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod* **36**(5), 820-825.
- Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V (2015) Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **349**(6245), 316-320.

- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM (2010) A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* **5**(4), e10088.
- Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC (1997) Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J Immunol* **158**(2), 945-953.
- Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* **34**(6), 747-754.
- Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G (2004) ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* **57**(11), 1160-1164.
- Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, Swart GW (2010) ALCAM/CD166: cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics* **7**(5), 231-243.
- Wittgow WC, Jr., Sabiston CB, Jr. (1975) Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* **1**(5), 168-171.
- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW (2010) Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* **49**(9), 1618-1631.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**(4975), 1431-1433.
- Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J, Wang JM (1998) Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* **255**(1), 67-73.
- Xia L, Zhang Z, Chen L, Zhang W, Zeng D, Zhang X, Chang J, Jiang X (2011) Proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells on akermanite and beta-TCP bioceramics. *Eur Cell Mater* **22**, 68-82; discussion 83.
- Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H (1992) Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* **18**(10), 501-504.
- Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, Laurent AB, Resta R, Khare K, Coe A, Kincade PW, Thompson LF (1998) CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol* **28**(10), 2981-2990.
- Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H (2014) Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* **2**(1), 1.

- Yang L, Kobie JJ, Mosmann TR (2005) CD73 and Ly-6A/E distinguish in vivo primed but uncommitted mouse CD4 T cells from type 1 or type 2 effector cells. *J Immunol* **175**(10), 6458-6464.
- Yano A, Suzuki K, Yamamoto M, Yamada S (2012) Pam3CSK4, a TLR2 Agonist, Induces Osteoclastogenesis in RAW 264.7 Cells. *Dental Medicine Research* **32**(3), 181-188.
- Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T (2012) Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol* **138**(4), 583-592.
- Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* **147**(6), 781-792.
- Yu D, Zhuang L, Sun X, Chen J, Yao Y, Meng K, Ding Y (2007) Particular distribution and expression pattern of endoglin (CD105) in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **7**, 122.
- Zarbock A, Ley K (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* **172**(1), 1-7.
- Zavan B, Giorgi C, Bagnara GP, Vindigni V, Abatangelo G, Cortivo R (2007) Osteogenic and chondrogenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured into polymeric scaffolds. *Eur J Histochem* **51 Suppl 1**, 1-8.
- Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, Sester M, Bohm M, Fliser D, Heine GH (2012) Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* **217**(12), 1273-1284.
- Zhang C, Yang L, Peng B (2010a) Critical role of NFATc1 in periapical lesions. *Int Endod J* **43**(2), 109-114.
- Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW, Le AD (2010b) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells* **28**(10), 1856-1868.
- Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA (2006) Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* **12**(10), 2813-2823.
- Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA (2008) In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med* **2**(2-3), 117-125.
- Zhang X, Zhu Q, Yuan X, Xu W (2014) Mesenchymal Stem Cells in Cancer: a New Link to Neutrophils. *Cancer Cell & Microenvironment*.

-
- Zhou X, Gao XP, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, Malik AB (2005) LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(4), L655-662.
- Zhu Q, Zhang X, Zhang L, Li W, Wu H, Yuan X, Mao F, Wang M, Zhu W, Qian H, Xu W (2014a) The IL-6-STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression. *Cell Death Dis* **5**(6), e1295.
- Zhu Y, Yang Y, Zhang Y, Hao G, Liu T, Wang L, Yang T, Wang Q, Zhang G, Wei J, Li Y (2014b) Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther* **5**(2), 48.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**(16), e74-80.
- Zimmerlin L, Donnerberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Peault B, Rubin JP, Donnerberg AD (2010) Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* **77**(1), 22-30.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**(2), 211-228.

8. Биографија аутора

Др Милан Марковић је рођен 25. фебруара 1984. године у Крушевцу. Основну школу је завршио у Г. Ратају са одличним успехом и као добитник Вукове дипломе је проглашен за ђака генерације. Средњу школу је завршио у Блацу са одличним успехом где је такође добитник Вукове дипломе и ђак генерације. У току средњошколског образовања двоструки је добитник награда за освојено прво место на републичком такмичењу из предмета Биологија организованом 2002. и 2003. године.

Др Милан Марковић је завршио Медицински факултет, одсек стоатологија Универзитета у Нишу 30 октобра 2009. године са просеком оцена 10.00. У току студија је био демонстратор на вежбама из предмета Анатомија човека у периоду 2004/2005 и Медицинска физиологија у периоду 2005/2008 година. Добитник је бројних награда додељиваних за најбоље студенте од којих су најзначајније:

- **2005.** Стипендије Фондације за развој научног и уметничког подмлатка Републике Србије (III година студија);
- **2005.** Признање Факултета за најбољег студента Стоматологије на III години студија;
- **2007.** Стипендије Фондације Хемофарм;
- **2007.** Eurobank EFG школарина за најбољег студента завршне године студија;
- **2008.** Признање факултета за најбољег студента Стоматологије на V години студија;
- **2007., 2008. и 2009.** Похвалница Српске народне одбране у Америци, Фонд за стипендирање студената Михајло Пупин, Чикаго, САД.

По завршетку основних студија, др Милан Марковић је уписао последипломске студије на Медицинском факултету Универзитета у Нишу, одсеку Базична истраживања у стоматологији (АДС-БС, индек бр. 14/09). У току докторских студија ангажован је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ 175102) од 1. октобра 2011. године као истраживач приправник. За време рада на пројекту изабран је у више истраживачко звање (истраживач сарадник) 26. октобра 2016.

Др Милан Марковић је члан Друштва имунолога Србије и учесник је IV европског конгреса имунолога (EFIS; *European Federation of Immunological Societies*)

одржаног у Бечу од 6.-9. септембра 2015. У току рада на пројекту аутор је и коаутор 3 рада објављених у научним часописима од међународног значаја (M21-M23), једног рада објављеног у научном часопису од националног значаја (M52) и 10 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу M34.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА И ФАГОЦИТА

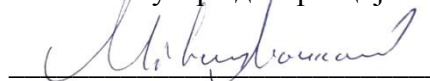
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 19.12.2016. год.

Потпис аутора дисертације:



др Милан З. Марковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

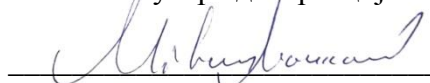
Наслов дисертације:

**ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ
ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА И ФАГОЦИТА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 19.12.2016. год.

Потпис аутора дисертације:



др Милан З. Марковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА И ФАГОЦИТА

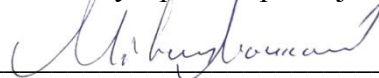
Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 19.12.2016. год.

Потпис аутора дисертације:



др Милан З. Марковић