

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Тамара М. Кукољ

**Утицај LPS и IL-33 на адултне матичне
ћелије ткива периодонцијума: функцијске
промене и активирани молекулски
механизми**

Докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tamara M. Kukolj

**The influence of LPS and IL-33 on adult stem
cells of periodontal ligament: functional
changes and activated molecular mechanisms**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

МЕНТОРИ:

др Дренка Тривановић, научни сарадник
Универзитет у Београду-
Институт за медицинска истраживања

др Диана Бугарски, научни саветник
Универзитет у Београду-
Институт за медицинска истраживања

ЧЛАН КОМИСИЈЕ:

др Александра Кораћ, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Датум одбране:

Ова докторска дисертација у потпуности је урађена у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду у оквиру пројекта “Регенеративни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија” ОИ 175062 финансираног од стране Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије, чији је руководилац др Диана Бугарски.

Захвалница

Највећу захвалност у реализацији докторске дисертације дугујем својој менторки др Дренки Тривановић без чијег преданог ангажовања ова теза никада не би била приређена. Најискреније јој се захваљујем на пренесеном знању, стрпљењу, иницијативи, безрезервној посвећености и свесрдној подршци. Њена пожртвованост била је пресудна у изради ове тезе, а уједно и инспирација за мој истраживачки развој. Од срца јој се захваљујем на пријатељској сарадњи.

Посебно велику захвалност дугујем својој менторки др Диани Бугарски на великодушним саветима и исцрпним смерницама који су допринели коначном облику ове тезе. Најискреније јој се захваљујем на пруженој подршци током докторских студија, али пре свега, на указаном поверењу и прилици да истраживачики рад наставим у оквиру Лабораторије за експерименталну хеамтологију и матичне ћелије Института за медицинска истраживања .

Најискреније хвала проф. др Александри Кораћ на корисним саветима и сугестијама приликом обликовања ове дисертације. Неизмерно хвала на инспиративним предавањима, пруженом знању током студија и свесрдној подршци у кључним тренуцима током докторских студија.

Велико хвала дугујем др Александри Јауковић на несебичној подршци и драгоценим саветима, не само у изради ове дисертације, већ и у мом целкупном истраживачком раду и научном усавршавању.

Др Весни Илић и др Хуану Францску Сантибањезу хвала на пруженом знању и многобројним корисним саветима при извођењу експерименталних задатака.

Најсрдачније хвала др Славку Мојсиловићу на помоћи при тумачењу резултата проточне цитометрије, али и корисним саветима приликом техничког обликовања ове тезе. Драгим колегиницама, др Ивани Окић Ђорђевић, др Јелени Крстић, Христини Обрадовић, Анђелији Петровић, као и Снежани Марковић велико хвала на свој помоћи, сврсисходним сугестијама, великој подршци, али и колегијалности при свакодневном раду.

Велику захвалност дугујем др Срђи Јанковићу на практичној помоћи чије знање и уложени труд су умногоме допринели изради ове дисертације.

Хвала др Маји Милетић која нам је омогућила да прикупимо ткива периодонцијума како би се спровела истраживања спроведена у оквиру ове дисертације.

Свим колегама Института за медицинска истраживања хвала на сарадњи и колегијалности.

Изнад свега, највећу захвалност дугујем својој породици и блиским пријатељима на безрезервној подршци, стрпљењу и разумевању, али и пруженој љубави и извору инспирације.

УТИЦАЈ LPS И IL-33 НА АДУЛТНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ ТКИВА ПЕРИОДОНЦИЈУМА: ФУНКЦИЈСКЕ ПРОМЕНЕ И АКТИВИРАНИ МОЛЕКУЛСКИ МЕХАНИЗМИ

Резиме

Савремени начини лечења различитих обољења усне дупље, насталих услед урођених деформитета, механичких оштећења или поремећаја узрокованим инфламаторним или туморским обољењима могу представљати комплексан клинички задатак с обзиром да се намеће захтев обнове функције, али и естетике орофацијалног региона. Значајну улогу у одржању структуре и функције орофацијалног система има потпорно ткиво зуба у оквиру кога ткиво периодонцијума представља везу између зуба и алвеоларне кости. Ткиво периодонцијума је богато мезенхимским матичним ћелијама (ММЋ), те може бити погодан извор популације ММЋ за потенцијалну терапијску примену. Услед оштећења ткива периодонцијума успостављање структуре и функције зуба, а тиме и орофацијалног система је веома отежано чак и уз примену најсавременијих протетских третмана. Ипак, функцијске особине ММЋ периодонцијума (ПД-ММЋ) нису у потпуности испитане, што представља неопходан услов за њихову примену. Посебно важан аспект представља познавање понашања ПД-ММЋ у инфламаторној средини, будући да до разарања ткива периодонцијума најчешће долази услед пародонтопатије, хроничног инфламаторног обољења потпорног ткива зуба које може довести до губитка зуба. Поред тога, инфламација потпорног ткива може бити пратећа компликација након постављања денталних имплантата што такође указује на потребу за побољшавањем постојећих протетских третмана.

Истраживања обухваћена овом дисертацијом имала су за циљ добијање података о утицају фактора који се могу наћи у ниши ткива периодонцијума на функцијска својства ПД-ММЋ. Испитиван је утицај LPS,

као снажног иницијатора инфламаторног процеса, на регенеративна и имуномодулаторна својства ПД-ММЋ. На молекулском нивоу утврђивани су механизми који посредују у ефектима LPS, при чему је анализирана активност MAPK (од енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) сигналних путева. Поред тога, утврђиван је ефекат IL-33, као ендогеног алармина, на регенеративна својства ПД-ММЋ. У склопу утврђивања молекулских механизма који се налазе у основи деловања IL-33 испитивана је укљученост NF-кВ (од енгл. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) и β-катенин сигналних путева.

Добијени резултати показују да испитивани фактори имају значајан утицај на функцијска својства ПД-ММЋ, при чему ни LPS ни IL-33 не утичу на вијабилност, морфолошка као ни фенотипска својства ових ћелија. Ефекат LPS огледа се у значајној инхибицији остеогенезе, што је праћено стимулацијом хондрогене и адипогене диференцијације посредством ERK1,2 (од енгл. *Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) сигнализације. Истовремено, LPS не утиче на миграторну способност ПД-ММЋ, али подстиче њихову контрактилност, односно стицање миофибробластног фенотипа кроз стимулацију експресије молекула карактеристичних за миофибробласте што је посредовано ERK1,2 сигналним путем. Резултати анализе имуномодулаторних својстава ПД-ММЋ у присуству LPS показују да, активирајући ERK1,2 сигнални пут, код ПД-ММЋ LPS инхибира трансендотелску миграцију (ТЕМ) мононуклеарних ћелија периферне крви (МНЋ), док благо утиче на смањење експресије површинског маркера CD29 код МНЋ. Са друге стране, LPS не модификује способност ПД-ММЋ да инхибирају пролиферацију митогеном стимулисане CD4⁺ субпопулације МНЋ, као ни однос заступљености CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} лимфоцита. У контексту анализе модулације својстава ћелија мијелоидног порекла, истраживања обухваћена овом дисертацијом показују да LPS не утиче на способност ПД-ММЋ да инхибирају TEM полиморфонуклеарних ћелија периферне крви (ПМЋ), на способност ПД-ММЋ да модификују респираторни прасак ПМЋ, као ни на заступљеност CD33⁺, CD45⁺ и CD34⁺ ћелија у популацији МНЋ. Са друге стране, претретман ПД-ММЋ са LPS значајно

инхибира заступљеност CD14⁺ МНЋ уз учешће ERK1,2 сигналног пута. Поред тога, LPS, активацијом ERK1,2 сигналног пута, блокира стимулаторни ефекат ПД-ММЋ на формирање укупног броја колонија одређених хематопоеетских прогенитора присутних у популацији МНЋ периферне крви, међу којима су најзаступљеније CFU-GM колоније. Анализа утицаја LPS на експресију имуномодулаторних молекула код ПД-ММЋ показује да LPS не утиче на конститутивну експресију *HLA-A* и *HLA-DR* гена, док стимулише генску и протеинску експресију COX-2 и IL-6 код ПД-ММЋ. Стимулација експресије COX-2 и IL-6 под утицајем LPS код ПД-ММЋ посредована је ERK1,2 сигналним путем. Поред тога, ПД-ММЋ конститутивно експримирају *ST2* и *IL-33* ген, при чему LPS повећава експресију *ST2* гена, али смањује експресију гена за *IL-33*.

Резултати испитивања утицаја IL-33 на регенеративна својства ПД-ММЋ показују да овај цитокин стимулише експресију маркера плурипотентности код ПД-ММЋ (OCT-4, SOX-2 и NANOG) где је уочена укљученост NF-κB и β-катенин сигналних путева. Са друге стране, IL-33 инхибира остеогену диференцијацију ПД-ММЋ посредством NF-κB и β-катенин сигналних путева, док претретман ПД-ММЋ са IL-33 стимулише остеогену диференцијацију на нивоу активности ензима алкалне фосфатазе (ALP, од енгл. *Alkaline phosphatase*). Насупрот утицају на остеогенезу, IL-33 не утиче на хондрогену и адипогену диференцијацију ПД-ММЋ. Међутим, током остеогене диференцијације IL-33 стимулише пролиферативну активност ПД-ММЋ посредством β-катенина. Истовремено IL-33 подстиче способност формирања CFU-F (од енгл. *Colony Forming Unit – Fibroblast*) колонија ПД-ММЋ у стандардном медијуму, али не модификује стимулаторни ефекат самог остеогеног медијума. Уз то, испитивање ћелијског старења, показује да IL-33 инхибира активност ензима β-галактозидазе код ПД-ММЋ култивисаних у стандардном и остеогеном медијуму, при чему сам остеогени медијум значајно редукује проценат ћелија које експримирају β-галактозидазу.

На основу изложених резултата може се закључити да LPS, кроз модулацију диференцијационог потенцијала, представља значајан фактор у регулацији регенеративног потенцијала ПД-ММЋ. Истовремено, LPS је и

регулатор имуномодулаторних активности ових ћелија како кроз модулацију интеракције ПД-ММЋ и имунских ћелија, тако и кроз модулацију продукције имуномодулаторних фактора. За разлику од LPS, на основу представљених резултата може се закључити да је IL-33 као ендогени алармин, претежно укључен у регулацију остеогене диференцијације испољавајући протективне ефекте на популацију прогениторских ћелија периодонцијума, кроз спречавање старења ПД-ММЋ, подстицање пролиферације и клоногености, односно матичности. Ови налази доприносе бољем сагледавању испољавања функцијских својстава ПД-ММЋ у условима инфламаторне средине, што је важно за разумевање физиологије ових ћелија у нормалним и патолошким стањима, као и за разумевање процеса који се налазе у основи функционисања ПД-ММЋ. Истовремено, ови налази значајни су и за унапређивање постојећих метода лечења потпорног апарата зуба, али уједно и основа за развој нових приступа лечења у оквиру регенеративне медицине заснованих на примени ПД-ММЋ.

Кључне речи: *мезенхимске матичне ћелије, периодонцијум, LPS, IL-33, диференцијациони потенцијал, имуномодулација, матичност, пролиферација*

Научна област: *Биологија*

Ужа научна област: *Биологија ћелија и ткива*

УДК број:

THE INFLUENCE OF LPS AND IL-33 ON ADULT STEM CELLS OF PERIODONTAL LIGAMENT: FUNCTIONAL CHANGES AND ACTIVATED MOLECULAR MECHANISMS

Summary

Contemporary methods for treating various diseases of the oral cavity, caused by congenital deformities, mechanical damage or damage caused by inflammatory or tumor diseases can be a complex clinical task, given that the requirement for restoration of function and aesthetics of the orofacial region is imposed. The supporting tissue of the tooth in which the tissue of the periodontium represents the connection between the teeth and the alveolar bone, has an important role in maintaining the structure and function of the orofacial system. The tissue of the periodontium is very rich with mesenchymal stem cells (MSC) and can be a suitable source of MSC population for potential therapeutic use. Due to periodontium damage, the establishment of teeth structure and function, and consequently the orofacial system, is very difficult, even with the application of the most modern prosthetic treatments. However, functional features of MSC from periodontium (PD-MSC) have not been fully revealed, which is a necessary requirement for their application. A particularly important aspect is understanding of PD-MSC's behavior in the inflammatory microenvironment, since the periodontium destruction is most often caused by periodontal disease, chronic inflammatory disease of the supporting tissue of the teeth that can lead to tooth loss. In addition, inflammation of the teeth supportive tissue may be an accompanying complication after the dental implant, which also indicates the need to improve existing prosthetic treatments.

The aim of the research covered by this dissertation was to obtain data about effects of factors frequently associated with the periodontium niche on the functional properties of PD-MSC. The influence of LPS, as a strong initiator of the inflammatory process, on the regenerative and immunomodulatory PD-MSC was examined. On the molecular level mechanisms mediating the effects of LPS were determined, wherein the activity of MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) signaling pathways was determined. In addition, the effect of IL-33, as an endogenous alarm signal, on the regenerative properties of PD-MSC was examined. As a part of the determination of the

molecular mechanisms underlying IL-33 effects, involvement of NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) and β -catenin signaling pathways was examined.

Obtained results show that the investigated factors have significant effects on the PD-MSC functional properties, while neither LPS nor IL-33 affect viability, morphological or phenotypic properties of these cells. The LPS effect is manifested in a significant inhibition of osteogenesis, followed by stimulation of chondrogenic and adipogenic differentiation through ERK1,2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) signaling. At the same time, LPS does not affect migratory ability of PD-MSC, but stimulates acquisition of myofibroblast phenotype, by upregulating contractility, and expression of myofibroblast's molecules, via ERK1,2 a signaling pathway. Results of the PD-MSC immunomodulatory properties in the presence of LPS show that, by activating the ERK1,2 signaling pathway in PD-MSC, LPS inhibits transendothelial migration (TEM) of mononuclear peripheral blood cells (MNC), while slightly affecting the expression of surface marker CD29 in MNC. On the other hand, LPS does not modify the ability of PD-MSC to inhibit the proliferation of mitogen-stimulated CD4⁺ subpopulation of MNC, nor the ratio of the CD4⁺CD25^{high}/ CD4⁺CD25^{low} lymphocytes. In the context of modulation of myeloid cells, studies covered by this dissertation, show that LPS does not affect the ability of PD-MSC to inhibit TEM of polymorphonuclear peripheral blood cells (PMC), the PD-MSC capability to modify PMC respiratory burst, as well as the presence of CD33⁺, CD45⁺ and CD34⁺ cells in the MNC population. On the other hand, PD-MSC pretreatment with LPS significantly decreased the presence of CD14⁺ MNC via ERK1,2 signaling pathway. In addition, LPS blocks the stimulatory effect of PD-MSC on the formation of the total number of colonies of the hematopoietic progenitors present in the peripheral blood MNC population, predominantly of CFU-GM, by activating the ERK1,2 signaling pathway. Analysis of the LPS effect on the immunomodulatory molecules expression in PD-MSC shows that LPS does not affect the constitutive expression of *HLA-A* and *HLA-DR* gene, while stimulates both gene and protein expression of COX-2 and IL-6 in PD-MSC. This stimulation of COX-2 and IL-6 expression is mediated by ERK1,2 signaling pathway. Additionally, PD-MSC constitutively express ST2 and IL-33 gene, whereby LPS increases the expression of ST2 gene, but reduces the expression of the IL-33 gene.

The results of the IL-33 influence on the regenerative properties of PD-MSC show that this cytokine stimulates the expression of pluripotency markers in PD-MSC (OCT-4, SOX-2 and NANOG) through the involvement of NF- κ B and β -catenin signaling pathways. Moreover, IL-33 inhibits osteogenic differentiation of PD-MSC by NF- κ B and β -catenin signaling pathways, although pretreatment of PD-MSC with IL-33 induced stimulation of osteogenic differentiation at alkaline phosphatase activity (ALP, *Alkaline phosphatase*) level. Contrary to the effect of IL-33 on osteogenesis, this cytokine does not affect the chondrogenic and adipogenic differentiation of PD-MSC. However, during osteogenic differentiation, IL-33 stimulates the proliferative activity of PD-MSC via β -catenin. At the same time, IL-33 stimulates the ability to form CFU-F (*Colony Forming Unit - Fibroblast*) colonies of PD-MSC in a standard medium, but does not modify the stimulatory effect of osteogenic media alone. Additionally, cellular aging assays indicate that IL-33 inhibits the activity of β -galactosidase enzyme in PD-MSC cultured in standard and osteogenic medium, wherein the osteogenic medium alone substantially reduces the percentage of cells expressing β -galactosidase.

Considering the presented results, it can be concluded that LPS, through the modulation of the differentiation potential, represents a significant factor involved in the regulation of the regenerative potential of PD-MSC. At the same time, LPS is the regulator of immunomodulatory activity of these cells through modulation of PD-MSC interaction with immune cells, as well as through the modulation of the production of immunomodulatory factors. Unlike LPS, IL-33, as an endogenous alarmin, is mainly involved in the regulation of osteogenic differentiation, showing protective effects, by prevention of PD-MSC aging, promotion of their proliferation and clonogenicity, i.e. stemness.

Taken together, these findings contribute to better understanding of PD-MSC's functional properties under inflammatory conditions, which is important for understanding the physiology of these cells in normal and pathological conditions, as well as understanding of the processes underlying PD-MSC functioning. At the same time, these findings can be significant for the improvement of existing methods of treatment of the tooth support tissues, and also as a basis for the development of new treatment approaches within regenerative medicine based on the application of PD-MSC.

Keywords: mesenchymal stem cells, periodontium, LPS, IL-33, differentiation potential, immunomodulation, stemness, proliferation

Scientific field: *Biology*

Scientific subfield: *Cell and Tissue Biology*

UDC number:

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
1.1. Матичне ћелије.....	1
1.1.1. Адултне матичне ћелије.....	3
1.1.1.1. Хематопоеетске матичне ћелије.....	4
1.1.1.2. Мезенхимске матичне ћелије	10
1.1.1.3. Усна дупља као извор популација мезенхимских матичних ћелија.....	19
1.1.1.3.1 Популација матичних ћелија периодонцијума.....	21
1.2. Функцијски одговор мезенхимских матичних ћелија	24
1.2.1. Пролиферација и диференцијација мезенхимских матичних ћелија	25
1.2.1.1. Пролиферација и самообнављање мезенхимских матичних ћелија.....	25
1.2.1.2. Диференцијација мезенхимских матичних ћелија.....	27
1.2.2. Имуноски статус мезенхимских матичних ћелија	32
1.3. Микросредина усне дупље	38
1.3.1. Биолошке функције LPS.....	41
1.3.2. Биологија IL-33.....	43
1.3.3. Микросредина усне дупље и регулација регенеративних и имуномодулаторних својства мезенхимских матичних ћелија периодонцијума.....	51
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	55
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	60
3.1. Хумани материјал	60
3.1.1. Мезенхимске матичне ћелије	60
3.1.2. Ћелије периферне крви	61
3.1.3. Ћелијске линије	62
3.2. Коришћени реагенси.....	62
3.3. Експериментални дизајн.....	67
3.3.1. Испитивање утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом.....	67
3.3.2. Испитивање утицаја LPS на имуномодулаторна својства и функције ПД-ММЋ.....	68
3.3.3. Испитивање утицаја IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом.....	70

3.4. Примењени методи.....	72
3.4.1. Анализа ћелијских функција.....	72
3.4.1.1. Испитивање вијабилности ПД-ММЋ.....	72
3.4.1.1.1. Одређивање метаболичке активности ПД-ММЋ применом МТТ теста	72
3.4.1.1.2. Одређивање броја ПД-ММЋ применом виталне боје Трипан плаво	73
3.4.1.1.3. Анализа ћелијског циклуса ПД-ММЋ.....	73
3.4.1.1.4. Клоногени потенцијал ПД-ММЋ	74
3.4.1.1.5. Анализа старења ПД-ММЋ	75
3.4.1.2. Испитивање способности миграције ПД-ММЋ.....	76
3.4.1.3. Испитивање способности диференцијације ПД-ММЋ.....	76
3.4.1.3.1. Остеогена диференцијација ПД-ММЋ	77
3.4.1.3.2. Хондрогена диференцијација ПД-ММЋ.....	78
3.4.1.3.3. Адипогена диференцијација ПД-ММЋ	78
3.4.1.3.4. Тест контрактилности ПД-ММЋ	79
3.4.1.4. Испитивање имуномодулаторног капацитета ПД-ММЋ.....	79
3.4.1.4.1. Анализа трансендотелске миграције имунских ћелија у <i>transwell</i> систему	79
3.4.1.4.2. Анализа пролиферативног капацитета МНЋ.....	80
3.4.1.4.3. Анализа респираторног праска ПМЋ.....	81
3.4.1.4.4. Анализа способности формирања колонија хематопоетских ћелија од стране МНЋ периферне крви.....	82
3.4.2. Анализа ћелијских протеина	84
3.4.2.1. Имунофлуоресцентно обележавање ћелија.....	84
3.4.2.1.1. Анализа површинских антигена	84
3.4.2.1.2. Анализа унутарћелијских антигена индиректном имунофлуоресценцом	85
3.4.2.2. Анализа ћелијских протеина применом <i>Western blot</i> метода	87
3.4.2.2.1. Изолација укупних ћелијских протеина	87
3.4.2.2.2. Одређивање концентрације протеина ћелијских лизата	88
3.4.2.2.3. Електрофореза на полиакриламидном гелу (SDS PAGE).....	88
3.4.2.2.4. Имуноблот	89

3.4.3. Анализа генске експресије	90
3.4.3.1. Изолација укупне РНК	90
3.4.3.2. Реверзна транскрипција.....	92
3.4.3.3. Реакција ланчаног умножавања (PCR).....	92
3.4.3.4. Електрофореза и визуелизација PCR продуката	93
3.4.4. Статистичка анализа резултата.....	97
4. РЕЗУЛТАТИ.....	99
4.1. Утицај LPS на својства и функције ПД-ММЂ повезане са регенеративним потенцијалом.....	99
4.1.1. Утицај LPS на метаболичку активност ПД-ММЂ	99
4.1.2. Утицај LPS на пролиферацију и ћелијски циклус ПД-ММЂ.....	100
4.1.3. Утицај LPS на морфолошка и имунофенотипска својства ПД-ММЂ.....	101
4.1.4. Утицај LPS на диференцијацију ПД-ММЂ.....	103
4.1.5. Утицај LPS на активацију ERK1,2, JNK и p38 MAPK у ПД-ММЂ	105
4.1.6. Улога ERK1,2 у промени диференцијационог потенцијала ПД-ММЂ оствареној деловањем LPS.....	107
4.1.7. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута у стицању својстава миофибробласта ПД-ММЂ	110
4.1.7.1. Утицај LPS на миграцију ПД-ММЂ.....	110
4.1.7.2. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута у регулацији контрактилности ПД-ММЂ	111
4.1.6.3. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута у регулацији експресије миофибробластних маркера код ПД-ММЂ	113
4.2. Утицај LPS на имуномодулаторна својства и функције ПД-ММЂ.....	115
4.2.1. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЂ да модулишу трансендотелску миграцију МНЂ.....	115
4.2.2. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЂ да модулишу пролиферацију и заступљеност CD4 ⁺ CD25 ^{високо} код МНЂ	116
4.2.3. Утицај LPS на способност ПД-ММЂ да модулишу трансендотелску миграцију ПМЂ.....	119
4.2.4. Утицај LPS на способност ПД-ММЂ да модулишу респираторни прасак ПМЂ.....	120
4.2.5. Утицај LPS и улога ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЂ да модулишу фенотип и клоногеност мијелоидних МНЂ.....	121

4.2.6. Утицај LPS и активираног ERK1,2 сигналног пута у експресији молекула значајних за имуномодулаторно деловање ПД-ММЋ.....	123
4.3. Утицај IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом.....	127
4.3.1. Утицаја IL-33 на метаболичку активност ПД-ММЋ	127
4.3.2. Утицај IL-33 на морфолошка и имунофенотипска својства ПД-ММЋ	128
4.3.3. Утицај IL-33 на диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ	130
4.3.4. Утицај IL-33 на пролиферативну активност ПД-ММЋ током остеогене диференцијације.....	134
4.3.5. Утицај IL-33 на експресију NF-κB и β-катенина код ПД-ММЋ	140
4.3.6. Улога NF-κB и β-катенина у стимулисаној експресији фактора повезаних са плурипотенцијом код ПД-ММЋ у присуству IL-33	142
4.3.7. Улога NF-κB и β-катенина у инхибицији остеогене диференцијације ПД-ММЋ у присуству IL-33.....	145
4.3.8. Улога NF-κB и β-катенина у модулацији пролиферације ПД-ММЋ индуковане присуством IL-33 током остеогене диференцијације	147
5. ДИСКУСИЈА	150
6. ЗАКЉУЧЦИ	179
7. ЛИТЕРАТУРА	183

1.

УВОД

1. УВОД

1.1. МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Ограничени регенеративни капацитет условљава потребу за развојем нових метода лечења разних дисфункционих стања ткива и/или органа. Стога су задаци савремене регенеративне медицине усмерени ка конципирању различитих стратегија и технологија у циљу обнављања или успостављања нормалне функције оштећеног/нефункционог ткива или органа. Како регенеративна медицина представља комплексну област, у циљу успостављања успешних методолошких приступа намеће се потреба интердисциплинарног сагледавања ове проблематике, што се остварује кроз комбиновање стратегија биотехнолошких наука и ткивног инжењеринга. (**Mirono et al., 2004; Mason & Dunnill 2008; Colombo et al., 2017**).

Један од главних истраживачких праваца савремене регенеративне медицине представља испитивање могућности примене хуманих матичних ћелија (МЋ), које теоријски, дајући друге типове специјализованих ћелија под одговарајућим условима могу бити основа стварања ткива или органа (**Heidary Rouchi & Mahdavi-Mazdeh 2015**). Са друге стране, овим ћелијама може се обезбедити и довољна бројност што је такође значајна одлика, с обзиром да различити методолошки приступи у регенеративној медицини захтевају одговарајући број ћелија са терапеутским ефектом (**Fisher & Mauck 2013**).

Као неспецијализоване ћелије МЋ имају способност самообнове сопствене популације и могућност диференцирања у већи број специјализованих ћелија под одговарајућим условима (**Weisman 2000; Snippert & Clevers 2011; Wei et al., 2013**). Међутим, иако се на основу ове две особине МЋ разликују од других типова ћелија, међу њима постоје и значајне разлике у потенцијалу самообнове, клоналности и диференцијационом капацитету. У раним фазама ембрионалног развића, захваљујући тотипотентном потенцијалу диференцијације зигота, од МЋ може настати било који ћелијски тип, односно читав организам укључујући сам ембрион, као и екстраембрионална ткива. Њиховим умножавањем и диференцијацијом развијају се плурипотентне МЋ у оквиру унутрашње ћелијске масе бластоциста од којих настаје велики број специјализованих, зрелих ћелија

које граде ткива и органе. Диференцијациони капацитет се са развојем даље смањује, тако да феталне и адултне МЋ, односно ткивно-специфичне МЋ карактерише мултипотентност што подразумева способност самообнове и диференцирања у ограничен број типова ћелија у оквиру одређеног органа или ткива у циљу одржања ткивне хомеостазе. На овом ступњу развића постоје и олигопотентне и унипотентне матичне ћелије чијом диференцијацијом се ствара само неколико, односно један тип ћелија (**Wobus & Boheler 2005**).

Имајући у виду разноврсност ткива и органа који могу бити извор различитих типова МЋ, дефинисање њихових функцијских карактеристика умногоме је отежано. То за последицу има и успорен развој одговарајућих метода терапијске примене МЋ која је још увек ограничена на мањи број обољења. Стога је даљи напредак регенеративне медицине условљен разумевањем биологије МЋ, и њихових одговора на стимулусе микроокружења.

Теоријски, регенеративни потенцијал плурипотентних МЋ скоро је неограничен (**Keller & Snodgrass 1999; Daughtry & Mitalipov 2014**). Међутим, иако је њихово постојање у раној фази ембрионалног развоја било прихваћено деценијама, изолација плурипотентних матичних ћелија код сисара први пут је експериментално изведена 1981. године, када су ћелије изоловане из мишијих ембриона (**Evans & Kaufman 1981; Martin 1981**). Основне карактеристике ових ћелија, означених као ембрионалне матичне ћелије (ЕМЋ), представљају неограничена у условима *in vitro* пролиферација уз одсуство диференцијације, нормалан диплоидни кариотип, способност формирања тератома *in vivo* приликом чега се ове ћелије диференцирају у ћелије сва три клицина листа, док се у условима *in vitro* диференцирају у различите типове ћелија и експримирају маркере плурипотентности (**Wolf et al., 2016**). Хумане ЕМЋ изоловане су две деценије касније када су као извор плурипотентних МЋ послужили ембриони развијени у репродуктивне сврхе које су донирали парови подвргнути *in vitro* фертилизацији (**Thomson et al., 1998**). Ова открића побудила су велику пажњу и отворила могућности коришћења ових ћелија у лечењу потенцијално многих обољења. Ипак, услед значајних етичких и технолошких препрека, употреба ЕМЋ у клиничке сврхе није одобрена (**Simonson et al., 2015**). Из истих разлога, данашња сазнања о ЕМЋ заснована су на експерименталним подацима ћелијских

линија добијеним из ЕМЋ које су дугорочно умножаване у лабораторијама, али не и примарним ЕМЋ. Стога су савремени правци истраживања плурипотентних ћелија усмерени ка проналажењу нових, хистокомпатибилних извора ових ћелија који данас укључују ЕМЋ настале соматским нуклеарним трансфером, односно клонирањем, ЕМЋ настале партеногенезом, као и индуковане плурипотентне ћелија (iPSC, од енгл. *Induced Pluripotent Stem Cell*) (**Daughtry & Mitalipov 2014; Wolf et al., 2016**). За разлику од прва два типа ЕМЋ чије се успостављање заснива на употреби јајне ћелије и стварања преимплантационих ембриона (**Wolf et al., 2016**), генерисање iPSC подразумева репрограмирање диференцираних соматских ћелија активацијом ембрионалних транскрипционих фактора, те због једноставнијих метода представљају погоднији извор плурипотентних ћелија. Међутим, изражена генетичка нестабилност, као и склоност ка формирању тумора представљају заједничке особине свих плурипотентних ћелија што онемогућава њихово коришћење у терапеутске сврхе (**Simonson et al., 2015; Nishio et al., 2016**), премда ове ћелије могу представљати вредан модел-систем у клиничким испитивањима лекова, моделовању различитих обољења и развоју индивидуалне терапије (**Rodolfa 2008**). С обзиром на ограничену терапијску примену плурипотентних МЋ, успостављање метода ћелијске терапије које се заснивају на употреби ћелија које имају регенеративну улогу у одраслом организму, односно адултних МЋ (АМЋ), представља неопходан услов у циљу унапређивања стратегија регенеративне медицине (**Lane et al., 2014; Trounson & DeWitt 2016**).

1.1.1. АДУЛТНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Након рођења, током раста и развоја организма, свакодневно одржавање или опоравак оштећених ткива омогућен је присуством АМЋ које задржавају способност самообнове, али се и диференцирају у ограничен број ћелијских типова у оквиру одређеног органа или ткива доприносећи одржавању ткивне хомеостазе (**Li & Clevers 2010; Snippert & Clevers 2011; Ahmed et al., 2017**). Иако најчешће означене као адултне, ове ћелије се налазе и у постнаталним ткивима,

те је прецизнији назив за ове МЋ соматске МЋ. Због велике разноврсности разликује се више типова ових ћелија међу којима су две највеће групе хематопоеетске (ХМЋ) и мезенхимске МЋ (ММЋ) до сада највише изучаване (**Alison & Islam 2009; Chagastelles & Nardi 2011; Gonzalez & Bernard 2012**). Поред ових АМЋ, данас се интензивно изучавају матичне или прогениторске ћелије епителног (**Blanpain et al., 2007; Blanpain & Fuchs 2014**) и нервног ткива (**Doe 2008; Gage & Temple 2013**).

Како је главни предуслов за терапијску примену ћелија једноставност процедура изолације, прикупљања и *ex-vivo* експанзије, адултне, ткивно специфичне МЋ издвајају се као најприступачнији извор МЋ (**Reisman & Adams; Zomer et al., 2015; Rizvanov et al., 2016**). Ипак, за сада ХМЋ представљају једини тип МЋ који се примењује у клиничке сврхе, што подразумева њихову трансплантацију код различитих обољења крвног система укључујући имунодефицијенције, генетске поремећаје попут таласемије, хематолошких малигнитета и обнављања хематопоеетског система пацијената након хемиотерапије (**Bryder et al., 2006; Daley 2012; Lane et al., 2014**).

1.1.1.1. Хематопоеетске матичне ћелије

Постојање АМЋ претпостављено је крајем 19. века на основу истраживања ћелијских елемената присутних у крви (**Pappenheim 1896; Ramalho-Santos & Willenbring 2007; Maehle 2011**). Наиме, испитујући формирање црвених крвних зрнаца немачки хематолог *Artur Pappenheim* први пут је изнео претпоставку да црвене и беле ћелије крви настају од једне заједничке прекурсорске ћелије, односно МЋ (**Pappenheim 1896; Pappenheim 1907**). Сличне ставове заступао је и немачки патолог *Ernst Neumann* који је дефинисао костну срж као место настанка ћелија крви код сисара (**Maehle 2011**). У циљу објашњавања присуства крвних ћелија различитих морфологија у костној сржи, руски биолог и хистолог *Alexander Maximow* поставио је хипотезу да процес хематопоезе подразумева хијерархијску организацију скупа ћелија које настају од једне заједничке ћелије (унитарна теорија) означене као хематопоеетска МЋ (ХМЋ), као и да је за тај процес значајно

специфично микроокружење костне сржи (**Maximow 1909**). Иако контраверзна за то време, ова хипотеза посредно је доказана након Другог светског рата када је примећено да услед радијације долази до оштећења костне сржи, а да администрација здравих ћелија слезине или костне сржи код озрачених мишева доводи до опоравка мишева (**Lorenz et al., 1951; Doulatov et al., 2012**). Коначна потврда унитарне теорије хематопоезе добијена је у функционим експериментима 1960-тих година које су спровели *Ernest McCulloch* и *James Till* током испитивања ефектата радијације на хематопезу код мишева. Прегледајући слезину мишева озрачених леталном дозом зрачења којима је по озрачивању убризгана костна срж здравих мишева, уочили су присуство чворића видљивих голим оком. С обзиром да је број чворића био пропорционалан броју убризганих ћелија костне сржи, *McCulloch* и *Till* су закључили да сваки чворић заправо представља колонију која настаје од једне ХМЋ коју су назвали јединицом формирања колонија у слезини (CFU-S, од енгл. *Colony Forming Unit-Spleen*) (**McCulloch & Till 1960; Till & McCulloch 1961; Siminovitch et al., 1963**). Иако су каснија истраживања показала да овако описане CFU-S настају од зрелијих прекурсорских ћелија (**Bryder et al., 2006**), овај тест је био и први квантитативни тест за крвотворне ћелије и још увек представља релевантан тест у испитивањима хематопоезе (**Maehle 2011**). Осим тога, резултати ових експеримената имали су кључну улогу у покретању развоја области биологије АМЋ кроз доказивање фундаменталних концепата МЋ која подразумевају самообнову и мултипотентност, а који и данас представљају особине којима се дефинишу АМЋ (**Bryder et al., 2006; Snippert & Clevers 2011**). Истовремено, након ових резултата уследила су испитивања која се односе на идентификацију, карактеризацију и пречишћавање популације ХМЋ (**Bryder et al., 2006**), те су интензивна истраживања процеса стварања ћелија крви резултовала да ХМЋ буду прве ткивно специфичне МЋ чија је изолација успостављена (**Bryder et al., 2006**).

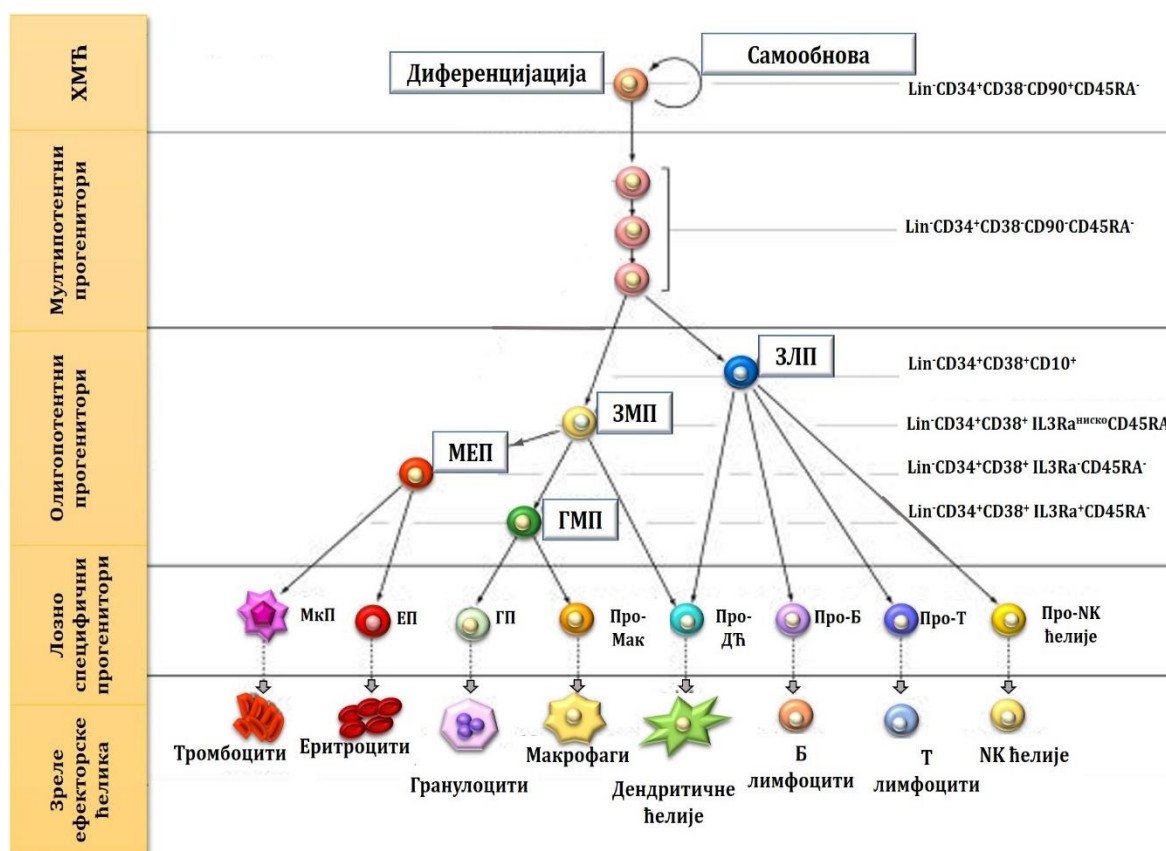
Иако су ХМЋ најдуже изучавана популација АМЋ и уједно најбоље описане ткивно специфичне МЋ (**Bryder et al., 2006; Doulatov et al., 2012; Muller-Sieburg et al., 2012**), још увек постоје значајне непознанице у погледу дефинисања услова њихове култивације, фенотипа и молекулских механизма регулације самообнове

и диференцијације (**Muller-Sieburg et al., 2012; Eaves 2015**). Наиме, ХМЋ су веома ретка популација у костној сржи, те се у укупној популацији од 10^4 - 10^6 ћелија детектује једна ћелија са хематопоеетским потенцијалом (**Wang et al., 1997; Muller-Sieburg et al., 2012**), а само мали број ових ћелија се налази у мирујућем стању, представљајући примитивну популацију ХМЋ (**Nakamura-Ishizu et al., 2014**). Како би се очувао хематопоеетски потенцијал током времена ова популација ћелија ретко подлеже деобама (**Wilson et al., 2008; Qiu et al., 2014**), при чему контрола броја деоба представља важан механизам регулације одржавања регенеративног потенцијала ХМЋ (**Bernitz et al., 2017**). Са друге стране, хијерархијски организован процес хематопоезе омогућава да ова малобројна популација ХМЋ, пролазећи кроз континуиране процесе пролиферације и диференцијације одржава физиолошку бројност ћелија крви, као и да се у зависности од потреба организма усмерава процес стварања одговарајућег типа ћелија крви. Стога се хематопоеетски систем описује као развојни континуум ћелија различитог степена зрелости и диференцијације код којих се са опредељивањем сукцесивно губи способност самообнове и смањује диференцијациони потенцијал, док се зрелијим ћелијама истовремено повећава пролиферативни капацитет (**Bryder et al., 2006; Muller-Sieburg et al., 2012; Qiu et al., 2014**).

С обзиром на релативно мали број ХМЋ и хетерогеност ћелија костне сржи посебна проблематика изучавања ХМЋ представља фенотипска и функцијска карактеризација ХМЋ различитог степена зрелости (**Bryder et al., 2006; Muller-Sieburg et al., 2012**) будући да се ХМЋ не могу идентификовати на основу морфолошких карактеристика, већ се у сврхе доказивања ХМЋ примењују имунофенотипске анализе и функцијски тестови (**Eaves 2015**). Иако хумане ХМЋ још увек нису у потпуности фенотипски окарактерисане, утврђено је да ХМЋ не експримирају ни један лозно-специфични (Lin, од енгл. *Lineage specific*) антиген зрелих хематопоеетских ћелија, па се означавају као Lin⁻ ћелије (**Wognum et al., 2003; Mayani 2016**) (Слика 1). У циљу обogaћивања популација ХМЋ за терапијске, али и за истраживачке потребе, као кључан маркер узима се и присуство CD34 антигена. Овај површински гликопротеин предствља један од најважнијих маркера ХМЋ који се испољава код хематопоеетских и ендотелских

прогенитора, али не и код зрелих ћелија (**Doulatov et al., 2012; Aqmasheh et al., 2017**). С друге стране, показано је да се у оквиру хуманих ХМЋ налази и CD34 негативна попуација (CD34⁻ CD38⁻ Lin⁻) чији дорманатни деобни статус указује да би ова попуација могла бити на врху хијерархије хематопоеетског система (**Anjos-Alfonso et al., 2013; Mayani 2016**). Стога се сматра да је стање дормантности квалитентнији показатељ присуства мултипотентних ХМЋ у хетерогеним попуацијама хематопоеетских ћелија у односу на присуство антигена. Поред ових маркера, хумане ХМЋ експримирају CD49f, CD90 и CD117, али не и CD38 и CD45RA (**Seita & Weissman 2011; Doulatov et al., 2012; Aqmasheh et al., 2017**) (Слика 1). Уз експресију специфичних маркера, ХМЋ се могу идентификовати на основу способности да избацују одређене флуоресцентне боје попут родамина (Rho, од енгл. *Rhodamine-123*) или *Hoechst 33342* боје (**Wognum et al., 2003; Mayani 2016**) захваљујући експресији ABC транспортера (од енгл. *ATP-Binding Cassette*) (**de Grouw et al., 2006; Tang et al., 2010**). Наиме, ABC транспортери имају улогу у избацивању штетних супстанци кроз ћелијску мембрану, те се њиховом високом заступљеношћу омогућава дугорочна заштита ХМЋ и чува интегритет МЋ (**Tang et al., 2010; Rossi et al., 2011**). Са друге стране, са сазревањем код мултипотентних прогенитора губи се експресија CD90, док се код одређених прогенитора детектује експресија CD38 (**Seita & Weissman 2011; Aqmasheh et al., 2017**) (Слика 1). Функционо, сматра се да се на врху налазе ХМЋ са способношћу самообнове и диференцијације у ћелије свих крвних лоза, односно способношћу да у потпуности реконституишу хематопоезу код примаоца (Слика 1). У оквиру њих грубо се разликују примитивније, дуготрајно репопулишуће ХМЋ (LT-HSC, од енгл. *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*) које дугорочно обнављају хематопоезу и зрелије, краткотрајно репопулишуће (ST-HSC, од енгл. *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*) чији потенцијал обнављања хематопоезе је ограничен и краткотрајан (**Liu et al., 2012; Aqmasheh et al., 2017**). Деобом и диференцијацијом ове попуације настаје хетерогена попуација мултипотентних прекурсора које не поседују способност самообнове, али задржавају потпуни диференцијациони потенцијал. Сазревањем прогениторских ћелија такође настаје хетерогена група одређених хематопоеетских прогенитора већег пролиферативног капацитета у оквиру којих се могу разликовати олигопотентне ћелије лимфопоезе означене

као заједнички лимфоидни прогенитор (ЗЛП) и олигопотентне ћелије мијелопоезе означене као заједнички мијелоидни прогенитор (ЗМП). И током ових процеса долази до промене експресије маркера, па тако експресија CD10 на Lin⁻ CD34⁺ CD38⁺ ћелијама дефинише лимфоидне прекурсоре, док експресија IL-3α^{ниско} (CD123), Lin⁻ CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ ћелијама дефинише мијелоидне прекурсоре (Seita & Weissman 2011; Chotinantakul & Leeanansaksiri 2012; Aqmasheh et al., 2017). Даљом диференцијацијом ЗЛП стварају се прекурсори Б, Т, НК ћелија (НК, од енгл. *Natural Killer*), док диференцијацијом ЗМП дају еритроците и прекурсоре тромбоцита и гранулоцита, а дендритичне ћелије (ДЋ) могу настати како од ЗЛП тако и од ЗМП (Wang & Wagers 2011; Seita & Weissman 2011; Saleh et al., 2015; Aqmasheh et al., 2017) (Слика 1).



Слика 1. Хијерархијски модел хематопоезе код човека. ХМЋ-хематопоеетске матичне ћелије; ЗМП-заједнички мијелоидни прогенитори; ЗЛП-заједнички лимфоидни прогенитори; МЕР-мегакариоцитни-еритроцитни прогенитори; ГМП-гранулоцитно-моноцитни прогенитори; МкП-мегакариоцитни прогенитори; ЕП-еритроцитни прогенитори; ГП-гранулоцитни прогенитори; Про-Мак, ДЋ, Б, Т, НК ћелије- прогенитори макрофага, дендритичних ћелија, Т и Б лимфоцита и НК ћелија. Преузето и измењено према Seita & Weissman, 2011.

У складу са потребама организма, динамика настанка зрелих ћелија крвног и имунског система регулисана је на сваком ступњу процеса хематопоезе, при чему су вијабилност, самообнова, пролиферација, опредељеност и диференцијација ХМЋ контролисани активношћу бројних сигнала присутних како у окружењу, тако и у самој ћелији. Јединствена грађа костне сржи омогућава близак контакт ХМЋ и различитих типова ћелија укључујући стромалне ћелије (ММЋ, остеобласти, фибробласти, адипоцити и ендотелске ћелије) и имунске ћелије попут лимфоцита или макрофага. На тај начин различите ћелије формирају јединствену микросредину, која се означава као ниша, а која има улогу стварања одговарајућих услова за функционисање процеса хематопоезе (**Boulais & Frenette 2015; Reagan & Rosen 2016**), при чему се у костној сржи може разликовати неколико хематопоеетских ниша укључујући ендостеалну и васкуларну у близини артериола и синусоида (**Morrison & Scadden 2014; Boulais & Frenette 2015; Mayani 2016**). Оваквом организацијом у оквиру нише, као регулаторне јединице, омогућена је изложеност ХМЋ различитим комбинацијама биофизичких и биохемјских сигнала, али и директним контактима са ћелијама у окружењу, чиме се усаглашено координише процес хематопоезе (**Boulais & Frenette 2015; Wohrer et al., 2014**). Уједно, ова организација представља и основу хетерогености ХМЋ, односно одржавања хематопоеетских ћелија које се разликују у способности самообнављања и диференцијације (**Crisan & Dzierzak 2016**). Стога је идентификација молекулских механизма који регулишу судбину ХМЋ у оквиру специфичних ниша неопходна како би се разумео процес хематопоезе како у физиолошким, тако и у патолошким стањима (**Boulais & Frenette 2015**).

1.1.1.2. Мезенхимске матичне ћелије

На могућност да се у костној сржи поред ХМЋ налазе и МЋ од којих настају нехематопоеетске ћелије први пут је указао немачки патолог *Cohnheim* 1867. године. Анализирајући састав ћелија током процеса зарастања рана *Cohnheim* је уочио да се на местима повреда поред имунских ћелија налазе и ћелије које морфолошки личе на фибробласте. Према његовим закључцима ћелије на месту повреде биле су пореклом из крвотока, односно посредно из костне сржи, на основу чега је изнео хипотезу да костна срж може бити извор фибробласта који стварају влакна колагена током физиолошког процеса зарастања повреда. Иако, ови налази у каснијим истраживањима нису у потпуности потврђени (**Prockop 1997**) на присуство и значај нехематопоеетских ћелија у костној сржи почетком 20. века указује и руски научник *Aleksandar Maksimov* према чијој теорији се процес хематопоезе, односно сазревање ХМЋ одвија под утицајем сигнала које стварају стромалне ћелије костне сржи (**Friedenstein 1989**).

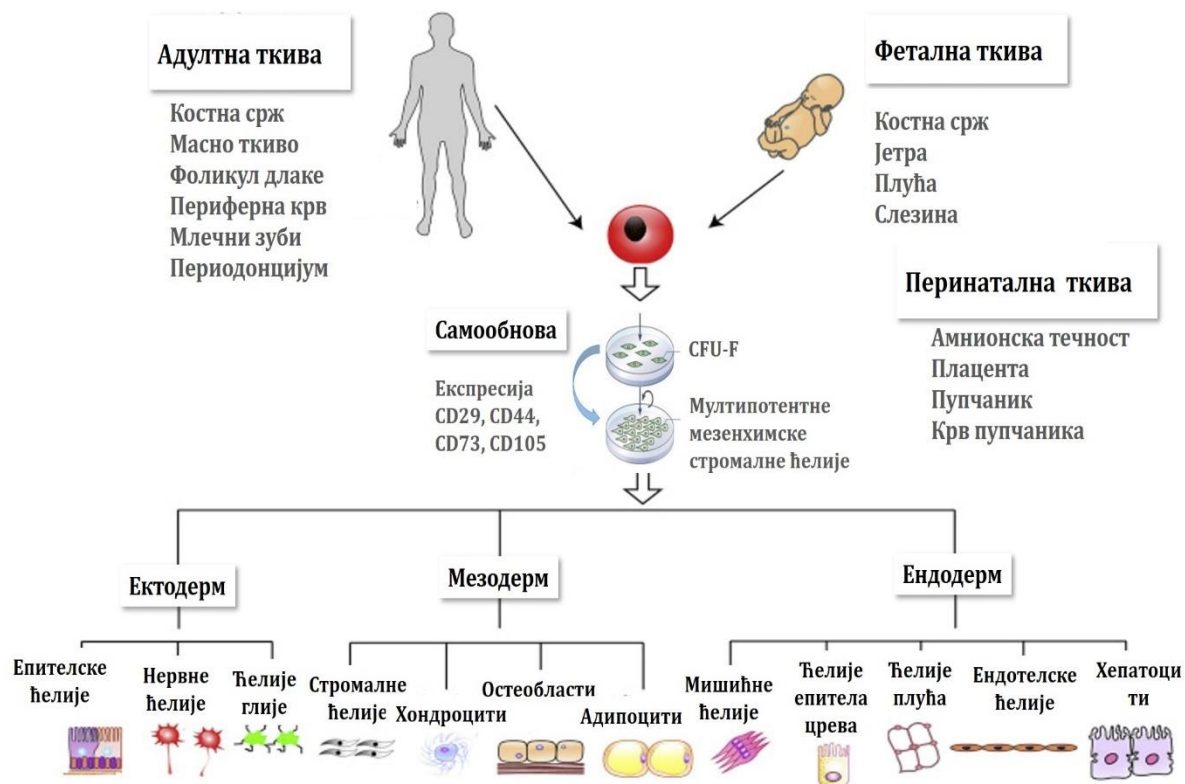
Значајнија експериментална потврда присуства нехематопоеетских МЋ у костној сржи дошла је тек 1970-тих година када су *Friedenstein* и сарадници на моделу полу-сингених животиња након трансплантације костне сржи уочили присуство коштаног ткива пореклом од донора (**1968**), а слична запажања имали су и *Tavassoli & Crosby* (**1968**). Неколико година касније, коначан доказ да костна срж садржи ћелије које се могу диферентовати у фибробласте, као и у друге мезенхимске ћелије дао је *Friedenstein* са сарадницима. Наиме, засејавањем ћелија костне сржи миша на пластичну подлогу и одстрањивањем неадхерентне фракције ћелија након неколико сати, на подлози су идентификоване адхерентне ћелије вретенастог облика, сличне фибробластима. Ове хетерогене ћелије формирале су колоније, а након “мирујућег периода” од 2-4 дана, ћелије у колонијама почеле су да се веома брзо умножавају. После неколико пасажа ћелије су постале морфолошки униформније, али је њихова најупечатљивија карактеристика била способност диференцијације у мале колоније ћелија округластог облика, налик на ћелије ткива хрскавице или кости. Водећи се овим резултатима *Friedenstein* означава стромалне ћелије као јединце формирања колоније фибробласта CFU-F (од енгл. *Colony Forming Unit – Fibroblast*)

(Friedenstein et al., 1970; Friedenstien et al., 1974; Friedenstien et al., 1976; Friedenstien 1976).

У каснијим истраживањима, ћелије сличних својстава изоловане су и из аспириата хумане костне сржи (Castro-Malaspina et al., 1980; Gartner & Kaplan 1980), а 1985. године Owen, правећи аналогију са хематопоеетским системом ћелија, дефинише “систем стромалних ћелија” кога чине не само стромалне ћелије костне сржи које подржавају хематопоезу, већ и мезенхимске МЋ (и њихово потомство) које поседују способност самообнове и диферентовања у различита везивна ткива, укључујући хрскавицу, кост, масно ткиво, фиброзно ткиво и строму хематопоеетске микросредине (Owen 1985). Следствена истраживања потврдила су да се ове стромалне ћелије у условима *in vitro* могу диференцирати у ћелије различитих везивних ткива (остеобласте, хондробласте и адипоците), те су означене као „стромалне МЋ костне сржи” (Owen & Friedenstien 1988; Prockop 1997; Kfoury & Scadden 2015), док је Caplan 1991. године ове ћелије костне сржи дефинисао као „мезенхимске МЋ” (Caplan 1991). Међутим, иако су првобитно прихваћене као популација МЋ, било је неопходно потврдити њихову способност самообнове и остеогени диференцијациони потенцијал у условима *in vivo*, што је први пут показано тек крајем 1990-тих година. Тада је након субкутане трансплантације ћелија појединачних колонија хумане костне сржи (на носачима изграђених из хидроксиапатита и трикалцијум фосфата) имунодефицијентним мишевима утврђено да у различитом степену долази до развоја коштаног ткива, а да се у најразвијенијим коштаном трансплантатима ствара хематопоеетско ткиво (Kuznetsov et al., 1997). С обзиром да је само одређени проценат ћелија формирао коштаном ткиво, на основу ових резултата могло се закључити и да у оквиру овог типа ћелија матичне ћелије представљају само један део ћелијске популације (Kfoury & Scadden 2015), односно да изоловане ћелије нису хомогена популација, што су многобројни радови касније и потврдили (Hass et al., 2011; Phinney 2012; Hart 2014; Jones & Schäfer 2015).

Иако њихово развојно порекло још увек није дефинисано, истраживања су показала да ћелије окарактерисане као ММЋ нису присутне само у костној сржи, ткиву мезенхимског порекла (Via et al., 2012; Murray & Peault 2015). Наиме, ове ћелије изоловане су из скоро свих ткива и органа адулта и фетуса, али и

перинаталних ткива (Hass et al., 2011; Via et al., 2012; de Girolamo et al., 2013; Zhao et al., 2016) (Слика 2). Осим тога, уз потенцијал за диференцијацију у ткива мезодермалног порекла, показано је да ММЋ под одговарајућим условима култивације могу да се диференцирају и у различите типове ћелија ектодермалног и ендодермалног порекла (неурони, кардиомиоцити, хепатоцити, ендотелске ћелије) (Bianco et al., 2008; Huang et al., 2015; Schäfer et al., 2016). Ипак, ови налази су још увек врло упитни због недовољно *in vivo* потврда (Quinn & Flake 2008; Nombela-Arrieta et al., 2011; Strioga et al., 2012). Како ММЋ представљају хетерогену популацију ћелија у оквиру које је само један део заправо МЋ, а многобројни радови заснивају се на ћелијама чија матичност није тестирана и доказана, данас постоји изражена потреба за променом назива ове популације ћелија, односно њиховим прецизнијим означавањем (Lindner et al., 2010; Kfoury & Scadden 2015; Caplan 2017). Такође, претпоставља се да услови култивације у којима се најчешће одвија пропација ММЋ, не могу стимулирати или одрзати малу популацију правих МЋ унутар ове адхерентне популације, па се култивисане ММЋ често називају мезенхимске стромалне ћелије које се могу изоловати из многих везивних ткива. Са друге стране, хистолошки термин „мезенхим“ односи се пре свега на привремено ембрионално ткиво од ког се развија не само везивно ткиво, већ и елементи крвног система, што имплицира да различита везивна ткива не могу имати заједничке ММЋ (Bianco 2014; Robey 2017). У прилог промене назива ММЋ посебно се истиче проблематика матичности ових ћелија. Наиме, с обзиром да улога ММЋ у условима *in vivo* није у потпуности разјашњена, а мултипотентни потенцијал диференцијације се још увек испитује недовољно ригорозним *in vitro* тестовима матичност ових ћелија се данас значајно доводи у питање (Bianco 2014; Caplan 2017).



Слика 2. Извори и диференцијациони потенцијал хуманих ММЋ. Преузето и измењено према Zhao et al., 2016; Nombela-Arrieta et al., 2011.

Ако се изузме неусаглашеност око назива и порекла данас се под појмом ММЋ подразумева тип мултипотентних МЋ које се у култури могу одржавати без промена у кариотипу. Ове ћелије се могу изоловати из различитих адултних или феталних ткива где њихова биолошка улога подразумева омогућавање структурне подршке овим органима и одржавање ткивне хомеостазе (Zomer et al., 2015; Ullah et al., 2015) (Слика 2). Међутим, велика хетерогеност у оквиру одређене популације ММЋ, као и варијабилна функциона својства ММЋ различитих ткива и донора, уз недовољно стандардизоване услове култивације, условила су и велику недоследност добијених резултата и отворила питање њихове упоредивости (Horwitz & Keating 2000). Из тих разлога су на иницијативу Комитета за мезенхимске и ткивне матичне ћелије Међународног удружења за ћелијску терапију (ISCT, од енгл. *The International Society for Cellular Therapy*) успостављени неопходни критеријуми при дефинисању хуманих ММЋ, а који подразумевају присуство скупа карактеристика у оквиру ћелијске популације. Као први услов за идентификацију ММЋ постављена је адхезивност

за пластичну подлогу при стандардним условима *in vitro* култивисања. Поред тога, потребно је да изоловане ћелије експримирају површинске антигене (CD105, CD73, CD90) уз одсуство експресије хематопоеетских маркера (CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD29 α или CD19, као и маркера главног хистокомпатибилног комплекса HLA-DR). Истовремено, ћелијска популација мора да поседује мултипотентни потенцијал диференцијације ка најмање три ћелијске лозе мезодермалног порекла (остеогена, хондеогена и адипоегена) у одговарајућим *in vitro* условима. (Horowitz et al., 2005; Dominici et al., 2006; Klimczak & Kozłowska 2015; Kobolak et al., 2015; Al-Shaibani et al., 2015).

Премда су сазнања о својствима ММЋ временом знатно проширена, питање њихове идентификације још увек је отворено с обзиром да не постоји јединствена дефиниција нити квалитативни метод којом би се идентификовале ММЋ (Horowitz et al., 2005; Keating 2012; Murray & Peault 2015). Наиме, стромално порекло ММЋ доказује се брзом адхезијом за подлогу као и морфологијом која подсећа на фибробласте (Zomer et al., 2015), али се запажају морфолошке разлике између различитих субпопулација ММЋ (Whitfield et al., 2013; Rennerfeldt & Van Vliet., 2016). Осим тога, експресија специфичних маркера ових ћелија на основу којих би се оне разликовале од других ћелија није још увек дефинисана (Lv et al., 2014; Klimczak & Kozłowska 2015). Велика хетерогеност ММЋ одражава се на функцијске варијације у самообнови и диференцијационом потенцијалу између различитих популација и субпопулација ММЋ (Hass 2011; Phinney 2012). Један од главних недостатака међу критеријумима ISCT (Dominici et al., 2006) јесте недефинисана способност самообнове коју изоловане ћелије морају поседовати, а која представља главни параметар регенеративног потенцијала ММЋ. Наиме, иако ММЋ поседују способност формирања колонија у условима *in vitro* као манифестације самообновљивости ћелија, истраживања показују да се у оквиру тих колонија налазе ћелије различитог нивоа зрелости/диференцираности, као и да разлике постоје између самих колонија. Уз то, ММЋ експримирају и релативно висок ниво маркера плурипотентности који су присутни код ЕМЋ као што су OCT-4 (од енгл. *OCTamer-binding transcription factor 4*), SOX-2 (*sex determining region Y-box 2*) и NANOG који као транскрипциони фактори учествују у регулацији мултипотентности, самообнове и пролиферације

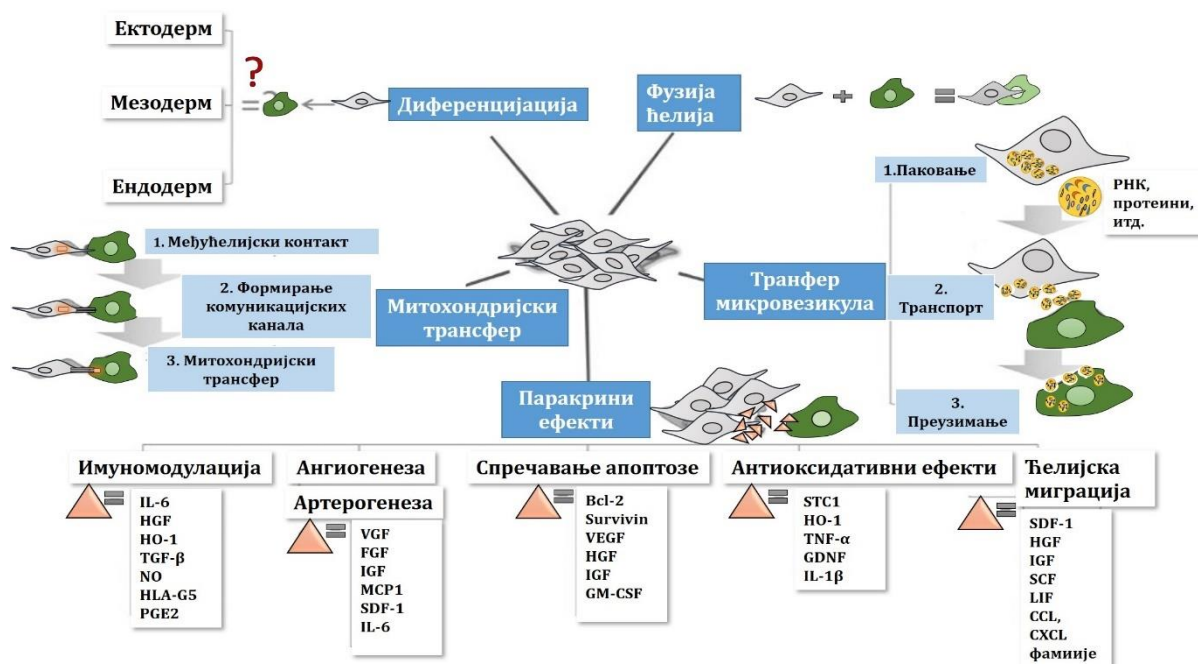
ММЋ, али њихова улога није до краја расветљена (**Pierantozzi et al., 2011; Tsai & Hung 2012**). Хетерогеност колонија ММЋ и потенцијал самообнове ММЋ још увек су нејасни и предмет су истраживања многих студија (**Samsonraj et al., 2015; Rennerfeldt & Van Vliet 2016**). Ипак највеће потешкоће у идентификацији нативних ММЋ представљају још увек непотврђени *in vivo* потенцијал диференцијације, те се заправо не може дефинитивно потврдити да наведене *in vitro* карактеристике представљају адекватан показатељ природе ММЋ у условима *in vivo* (**Lin et al., 2013; Murray & Peault 2015; Kfoury & Scadden 2015**). Из ових разлога намећу се питања биолошке еквивалентности ћелија изолованих на основу способности за адхезију и експресије површинских маркера, као и да ли се разлике последица различите биологије ткива из којих су ММЋ изоловане (**Kalinina et al., 2011; Nombela-Arrieta et al., 2011**).

Имајући у виду проблематику идентификације и карактеризације ММЋ, недвосмислено се намеће закључак да шира клиничка употреба ових ћелија још увек није могућа, иако је због једноставних процедура изолације откриће ових ћелија побудило велика очекивања у регенеративној медицини (**Zomer et al., 2015; Schäfer et al., 2016**). Уз диференцијациони потенцијал, показано је да у условима *in vitro* ММЋ продукују широк спектар биоактивних фактора који помажу ремоделовање ткива и испољавају имунорегулаторна својства (**Caplan 2007; Hoogduijn et al., 2010; Wu et al., 2013**). С обзиром на то, поред идентификације и карактеризације, детаљно познавање биолошких карактеристика ММЋ представља полазну основу за њихову одговарајућу примену у ћелијској терапији (**Schäfer et al., 2016**). Како су ММЋ костне сржи највише изучавана популација ММЋ (**Maffei 2014; Merino-González et al., 2016**) разумевање функционисања ММЋ данас се углавном заснива на резултатима добијеним истраживањима ММЋ костне сржи (**Wu et al., 2013**). Са друге стране, иако показују велике сличности са ММЋ костне сржи, ММЋ пореклом из других ткива поседују и одређене особености у погледу биолошких функција које су још увек недовољно расветљене (**Nombela-Arrieta et al., 2011; Sacchetti et al., 2016; Merino-González et al., 2016**). Стога је испитивање функција ММЋ различитих ткива у оквирима специфичних ниша постало актуелно поље истраживања (**Kalinina et al., 2011**).

Кључан аспект у дефинисању функције ММЋ у условима *in vivo* представља утврђивање њихове микроанатомске локализације у оквиру различитих органа. Резултати указују да се резидентне ММЋ налазе у близини крвних судова (**da Silva et al., 2012; Murray & Peault 2015**) што указује на могућност да ММЋ слично перицитима учествују у одржању хомеостазе крвних судова, као и да реагујући на оштећење ткива одговарају стимулацијом регенеративних процеса, локалном модулацијом инфламаторне реакције и улазе у системску циркулацију под утицајем градијента цитокина како би населиле оштећено ткиво (**Via et al., 2012; Wong et al., 2015; da Silva et al., 2016**). Међутим, понашање ММЋ *in vivo* није још увек у потпуности разјашњено (**Murray & Peault 2015**), нити је у потпуности потврђено да су ћелије ММЋ у условима *in vivo* заиста на периваскуларној локацији (**de Souza et al., 2016; Guimarães-Camboa et al., 2017**).

Ипак, данас се подразумева да биолошка функција ММЋ представља одржање ткивне хомеостазе, односно регенерација, што се заснива на самообнови и мултипотентном потенцијалу диференцијације, као и подржавању хематопоезе уз потенцијалну способност модулације имунског одговора (**Carrion & Figueroa 2011; Wei et al., 2013; Zomer et al., 2015**). Ови процеси одвијају се у интеракцијама са околним ћелијама и укључују истовремено деловање великог броја сигналних молекула. Њиховом одговарајућом обрадом одређује се и усмерава активност ММЋ како у физиолошким, тако и у патолошким условима (**Wei et al., 2013; Wu et al., 2014**). На тај начин, резидентне ММЋ регулишу физиолошко обнављање ткива и одржавају ткивну хомеостазу (**Kalinina et al., 2011; Wong et al., 2015**). Наиме, како би се након оштећења ткива одржала хомеостаза, на месту повреде покреће се серија координисаних процеса (**Wong et al., 2015**), што укључује хемостазу (коагулација и активација тромбоцита), акутну инфламацију (активација и миграција имунских ћелија), стварање грануломатозног ткива (регрутације и пролиферације фибробласта и МЋ, ангиогенезе, обнављање епитела) и ремоделовање (синтезе и реорганизације ванћелијског матрикса - ВЋМ) (**Dimarino et al., 2013; Lee et al., 2016**). На месту повреде продукује се велики број солубилних медијатора који усмеравају активност ћелија и покрећу имунски одговор специфичан за ткиво и тип повреде, а који су кључни за регенерацију ткива (**Wong et al., 2015; Kanji & Das 2017**).

Поред ћелија имунског система које имају важну улогу у процесу обнове ткива, активну улогу имају и резидентне ММЋ. Стимулисани факторима специфичне инфламаторне нише, ММЋ испољавају своје регулаторне функције које укључују модулацију имунског одговора, активације и преживљавања околних ћелија као што су фибробласти, хематопоетске, ендотелске и епителске ћелије, али и стварање ВЋМ и ожиљачног ткива (Seeps et al., 2016; Kanji & Das 2017). У основи ових функција ММЋ налазе се различити молекулскобиолошки механизми. Иако њихова природа да сада није у потпуности позната, претпостављени механизми генерално укључују диференцијацију ММЋ, фузију ММЋ са оштећеним ћелијама, као и међућелијску комуникацију путем трансфера органела попут микровезикула и митохондрија. Такође, продукција многобројних биоактивних молекула, односно паракрина активност, представља важан механизам деловања ММЋ у различитим ћелијским процесима као што су имуномодулација, апоптоза, ангиогенеза, миграција, итд. (Слика 3) (Liang et al., 2014; Seeps et al., 2016).



Слика 3. Механизми испољавања биолошких функција ММЋ. HGF - од енгл. *Hepatocyte Growth Factor*; HO-1 - од енгл. *Heme oxygenase*; NO - азот моноксид; HLA-G5 - од енгл. *Human Leukocyte Antigen G5*; VEGF - од енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*; IGF - од енгл. *insulin-like Growth Factors*. FGF - од енгл. *Fibroblast Growth Factors*. SDF-1 - *Stromal cell-Derived Factor 1*; MCP1 - *Monocyte Chemoattractant Protein 1*; LIF - од енгл. *Leukemia Inhibitory Factor*; SCF - од енгл. *Stem Cell Factor*; GDNF - од енгл. *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*. STC1 - од енгл. *Stanniocalcin-1*; GM-CSF - од енгл. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*; CCL, CXCL - хемокини. Преузето и измењено према Liang et al., 2014.

Преклиничка истраживања хуманих ММЋ, као и студије на анималним моделима показала су да егзогена примена ММЋ доводи до повољних резултата на различитим моделима укључујући зарастање хроничних рана, опекотина, акутне повреде плућа, инфаркта миокарда, дијабетеса, мултипле склерозе, као и поремећаја гастроинтестиналног тракта, бубрега и јетре (**Madrigal et al., 2014; Ji et al., 2017; Arsenijevic et al., 2017; Mao et al., 2017**). Међутим, након апликације, само мали проценат ћелија преживљава дужи временски период, те је вероватноћа да су њихови повољни ефекти који се уочавају већ у првих 1-2 дана након примене последица њихове пролиферације и диференцијације веома мала (**Wu et al., 2014**). Насупрот првобитним очекивањима да се терапутска улога ММЋ заснива на њиховој способности диференцијације, савремена истраживања све више истичу паракрину улогу у обнови ткива (**Madrigal et al., 2014; Merino-González et al., 2016; Li et al., 2017**). Ово становиште подржано је и налазима да кондиционирани медијуми култивисаних ММЋ такође поспешују обнављање ткива (**Padeta et al., 2017; Kay et al., 2017; Jiang et al., 2017**). Сматра се да позитивни ефекти долазе делимично као последица комбинације дејства биоактивних молекула који поседују антиинфламаторна, антипролиферативна и ангиогенетска својства. На тај начин ствара се микрокружење повољно за регенерацију и подстицање обнављања ткива и активације резидентних, ткивно специфичних прогенитора (**Meirelles et al., 2009; Nombela-Arrieta et al., 2011; Manuguerra-Gagné et al., 2013; Iseri et al., 2016; Vizoso et al., 2017**).

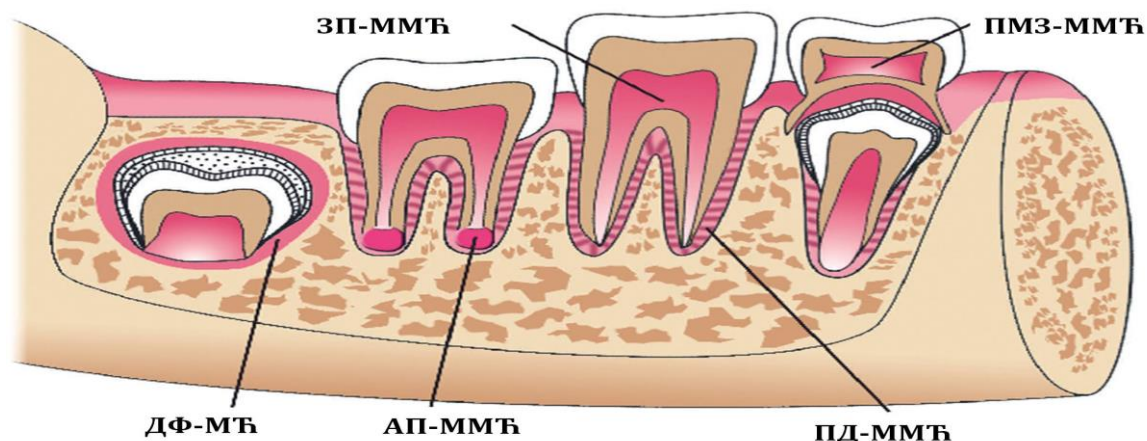
Са друге стране, истим механизмима резидентне ММЋ могу учествовати у формирању патолошких микросредина, које су одлика бројних обољења (**Ridge et al., 2017; Hill et al., 2017**). Допринос ММЋ показан је у развоју различитих врста малигнитета попут хематолошких малигнитета (**Wang et al., 2017; Fracchiolla et al., 2017; Li et al., 2018**), солидних тумора јетре (**Zong et al., 2018**), дојке (**Karnoub et al., 2007**), простате (**Cheng et al., 2016**), главе и врата (**Liu et al., 2018**), дебелог црева (**Tsai et al., 2011; Wu et al., 2016**). Такође, показано је да ММЋ могу поспешивати развој тумора кроз стимулацију отпорности туморских ћелија на лекове, формирањем нише за недиференциране туморске ћелије (**Ma et al., 2015; Gazdic et al., 2017; Yu et al., 2017; Hill et al., 2017**). Осим тога, допринос ММЋ запажа се током развоја фиброзе органа попут јетре, бубрега, срца, коже, али

њихов ефекат још увек није у потпуности разјашњен (**Prockop 2016; El Agha et al., 2017; Li et al., 2017**).

Имајући у виду да ММЋ одговарају на стимулусе микросредине, мењајући свој фенотип и комуникацију са ћелијама у окружењу чиме се остварује њихово учешће у хомеостази, али и патолошким стањима ткива, намеће се потреба за испитивањем ММЋ у контексту најприближнијем физиолошкој ткивној организацији и функцији. Истовремено, детаљно познавање биологије ММЋ сваког ткивног извора, представља неопходан захтев како би се омогућио развој одговарајуће и успешне употребе ткивно-специфичних ММЋ у оквиру терапија регенеративне медицине и ткивног инжењеринга.

1.1.1.3. Усна дупља као извор популација мезенхимских матичних ћелија

Веома богат извор различитих ћелијских популација које поседују одлике матичних и прогениторских ћелија налази се у везивном ткиву орофацијалног система, кога чини скуп ткива и органа који заједнички обављају функције жвакања, гутања, говора, дисања и варења (**Mao & Prockop., 2012; Amrollahi et al., 2016**). Истовремено, ова ткива често бивају одстрањена као медицински отпад током различитих клиничких процедура, те и са аспекта доступности представљају посебно погодан извор за изолацију недиференцираних ћелија, односно МЋ (**Egusa et al., 2012**). До сада, из ткива денталног региона изоловане су и окарактерисане ММЋ зубне пулпе, млечних зуба, периодонцијума (ПД-ММЋ), апикалне папиле и гингиве (**Xiao & Nasu 2014; Rouabhia 2015; Sharp 2016**) (**Слика 4**). Међутим, уз својстава заједничка свим ММЋ, и у оквиру ММЋ ових ткива постоје значајне разлике. У ширем смислу оне се могу поделити на два типа у зависности од могућности формирања структуре дентина у условима *in vivo* што поседују денталне ММЋ попут ММЋ зубне пулпе, ММЋ млечних зуба и ММЋ апикалне папиле. Са друге стране, ПД-ММЋ и ММЋ гингиве сврставају се у неденталне ММЋ које у условима *in vivo* формирају структуре сличне периодонцијуму, али не и дентину (**Xiao & Nasu 2014**).



Слика 4. Извори хуманих оралних ММТ. ЗП - зубна пулпа; ПМЗ - пулпа млечних зуба; ДФ - дентални фоликул; АП - апикална папила; ПД - периодонцијум. Преузето и измењено према **Voјiс et al., 2014.**

Међутим, и поред значајног присуства матичних, односно прогениторских ћелија регенеративни капацитет орофацијалног ткива је ипак ограничен, док је потпуна регенерација скоро немогућа. У највећој мери узрочници патолошких стања зуба и ткива која их окружују представљају механички изазване повреде, као и оштећења изазвана развојем запаљенских процеса оралног ткива (**Caton et al., 2012**). Поред тога, ова патолошка стања су често праћена интензивним болом, али и естетским проблемима. Стога је у лечењу оштећеног орофацијалног ткива и органа неопходно успоставити обнову како функције тако и естетике што може представљати велики клинички изазов. Имајући у виду комплексност ткива усне дупље, као и да процес регенерације подразумева активност великог броја типова ћелија, целовита обнова оштећења овог ткива најчешће није могућа због чега се интензивно ради на развоју нових терапија које укључују примену ММТ (**Scheller et al., 2009; Mitsiadis et al., 2015; Pagella et al., 2015**). Међутим, функцијске разлике између ММТ упућују и на неопходност одабира одговарајућег извора ММТ за регенерацију различитих ткива, где денталне ММТ могу бити погодан извор за регенерацију структуре дентина и пулпе, костију, хрскавице и нервног ткива, док неденталне ММТ могу бити погодне у опоравку периодонцијума, тетива и мишића (**Xiao & Nasu 2014; Alvarez et al., 2015**). Поред тога, испитивање својстава ММТ денталог региона је важно за разумевање учешћа ових ћелија у одржавању функционог интегритета, као и улога које ове ћелије имају у бројним патолошким процесима ових ткива.

1.1.1.3.1 Популација матичних ћелија периодонцијума

Иако у одржању структуре самих зуба главну улогу има зубна пулпа (**Yu & Abot 2007**), укупни животни век зуба одређен је и функционим својствима потпорног ткива зуба (**Maeda et al., 2011**). Потпорно ткиво зуба означено као пародонцијум састоји из два чврста ткива: алвеоларне кости и цемента који покрива корен зуба, као и два мека ткива: периодонцијума и десни. Као део потпорног ткива зуба које се налази између алвеоларне кости и зуба, периодонцијум представља меко специјализовано везивно ткиво чија је главна улога учвршћивање корена зуба за алвеоларну кост, као и ублажавање притиска који се ствара током жвакања. Стога периодонцијум представља динамично везивно ткиво које се кроз моделирање структуре влакана и кости непрекидно прилагођава механичким променама са циљем одржавања структурног интегритета ткива зуба (**Nanci & Bosshardt 2006; Maeda et al., 2011**). Осим тога, периодонцијум не само да пружа потпору у учвршћивању зуба за алвеоларну кост, већ обезбеђује хранљиве материје, штити зуб и учествује у одржавању хомеостазе оралног ткива (**Nanci & Bosshardt 2006; Maeda et al., 2011; Xiao & Nasu 2014**). Уз то, својство формирања минерализованог ткива, односно регулације равнотеже између неминерализованог и минерализованог ткива представља значајан сегмент функционисања овог ткива. Наиме, периодонцијум је смештен између два минерализована ткива, алвеоларне кости и зуба, те је и спречавање прекомерне минерализације посебан функциони захтев ћелија овог ткива (**Lekic & McCulloch 1996; Nanci & Bosshardt 2006**).

Структурно, ткиво периодонцијума састављено је из хетерогене ћелијске популације као и ВЋМ, при чему су главне ћелије које изграђују ово ткиво фибробласти, али су ту присутне и епителске и ендотелске ћелије, остеообласти, цементобласти, одонтокласти, моноцити и макрофаги, као и недиференциране мезенхимске ћелије, док у састав ВЋМ овог ткива улазе како колагене и тако неколагене компоненте. Најзаступљенији су високоорганизовани снопови колагених влакана претежно изграђени из колагена тип I, III и XII, али су ту присутна и еластична влакна окситалана, правећи заједно тродиимнзионалну мрежу која окружује зуб и укотвљује корен зуба за алвеоларну кост. У ВЋМ налазе

се и неколагени протеини попут алкалне фосфатазе, протеогликана и гликопротеина (ундулин, тенасцин и фибронектин) које локално секретују резидентне ћелије, али који могу и путем циркулације доспети у ткиво периодонцијума (**Nanci & Bosshardt 2006; Maeda et al., 2011**).

Иако представљају важну компоненту одржавања хомеостазе овог везивног ткива, недиференциране мезенхимске ћелије периодонцијума из хуманог ткива описане су први пут од стране Seo и сарадника 2004. године. У овом истраживању показано је да изоловане ПД-ММЋ поседују маркере карактеристичне за ММЋ (STRO-1 и CD146/MUC18), као и да се при одговарајућим условима култивисања могу диференцирати у цементоблсате, адипоците и ћелије које продукују колаген. Поврх тога, у истом истраживању, на моделу имунокомпромитованих глодара, показано је да након трансплантације хуманих ПД-ММЋ долази до формирања структура сличних комплексу ткива периодонцијума и цемента, а следствено и опоравка оштећеног ткива (**Seo et al., 2004**). Потом су и радови других аутора (**Nagatomo et al., 2006; Gay et al., 2007; Park et al., 2011; Miletić et al., 2014**) потврдили присуство популације ММЋ у популацији култивисаних ћелија периодонцијума које задовољавају минималне критеријуме ISCT за дефинисање ММЋ, укључујући мултипотентни потенцијал диференцијације у условима *in vitro*, као и присуство површинских маркера. Такође, на моделима свиње или глодара, следствене студије показале су да ПД-ММЋ саме (**Ding et al., 2010a**), генетски модификоване и/или у комбинацији са различитим носачима и факторима (**Su et al., 2015; Wang et al., 2016; Zhang L et al., 2017; Zhang C et al., 2017**) могу доприносити опоравку потпорног ткива зуба *in vivo*, што указује да ове ћелије испољавају ефекте од терапеутског значаја те могу бити важан извор за ћелијску терапију. Ипак, својства ПД-ММЋ нису у потпуности разјашњена и могу зависити од различитих фактора (**Zhu & Liang 2015**) укључујући и место прикупљања ткива, с обзиром да је показано да ПД-ММЋ са површине алвеоларне кости испољавају већи капацитет регенерације алвеоларне кости у поређењу са ПД-ММЋ са површине корена зуба (**Wang et al., 2011**). Поред тога, подаци указују да ткиво периодонцијума током развића настаје од ћелија које мигрирају из ткива нервне кресте (**Chai et al., 2000; Yao et al., 2008; Dupin & Sommer 2012**), као и да периодонцијум представља једно од

ткива у коме се налазе мултипотентне ћелије нервне кресте (**Dupin & Coelho-Aguiar 2012**), те да се тиме може објаснити експресија маркера својствених недиференцираним ћелијама нервног порекла као што су Nestin, HNK-1, p75, Slug и SOX-10 код постнаталних ПД-ММЋ (**Coura et al., 2008; Bueno et al., 2013; Fortino et al., 2014**). У складу са тим, студије показују да ПД-ММЋ испољавају изражен потенцијал диференцијације ка прогениторима нервних ћелија (**Lee et al., 2014; Ullah et al., 2016; Romeo et al., 2018**). Са друге стране, слично другим ткивним изворима ММЋ, запажена је локализација ПД-ММЋ у близини крвних судова, као и експресија маркера перицита попут CD146 и NG-2 (од енгл. Neural/Glial antigen 2) (**Sonoyama et al., 2006; Iwasaki et al., 2013; Pitaru et al., 2015; Zhu & Liang 2015**). Стога се сматра да се у оквиру популације ПД-ММЋ заправо налазе прогениторске ћелије које онтогенетски потичу од нервног ткива, али и прогениторске ћелије мезодермалног порекла који потичу од околног васкуларног ткива и ткива костне сржи (**Acharya et al., 2010**). Могућност локализације ПД-ММЋ у близини крвних судова и нервног ткива су такође важни за разумевање регенеративних својстава ових ћелија и њихове комуникације са ћелијама окружења.

Све ове чињенице указују на специфичност периодонцијума као нише ПД-ММЋ која регулише функцијска својства ових ћелија како у физиолошким тако и у патолошким стањима.

1.2. ФУНКЦИЈСКИ ОДГОВОР МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

У физиолошким условима АМЋ налазе се у стању мировања све док их различити сигнали из окружења, створени услед оштећења ткива или регенеративних потреба, не подстакну на пролиферацију и/или диференцијацију (Symonds et al., 2009). Поред регулације сопствене бројности, интегрисањем сигнала микроокружења, сходно потребама у датим околностима, успоставља се функцијски одговор ММЋ који се остварује кроз продукцију солубилних фактора и директне међућелијске контакте. На тај начин ММЋ учествују и у регулацији активности околних ћелија, као и реорганизацији ВЋМ (Akhmanova et al., 2015; Kyurkchiev et al., 2014; Ma et al., 2014; Ruster et al., 2006; Jiang et al., 2017; Gattazzo et al., 2014).

Посебан интерес данас усмерен је ка разумевању утицаја фактора инфламаторне микросредине у обликовању својстава и функционог одговора ММЋ, односно разумевању односа ММЋ и хуморалних и ћелијских чинилаца имунског система с обзиром да имунски систем представља важну компоненту у одржању хомеостазе и регенерације ткива. Са друге стране, неодговарајући имунски одговор налази се у основи многобројних обољења те модулација активности имунског система представља основу за развој различитих имунотерапија где примена ММЋ може имати значајан допринос. Ипак резултати клиничких истраживања још увек нису конзистентни (Zhao et al., 2016; Kyurkchiev et al., 2014; Bernardo et al., 2009).

Стога су савремена истраживања усмерена ка разумевању механизма регулације функцијског одговора ММЋ укључујући пролиферацију и диференцијацију, способност модулације имунског одговора, али и разумевању утицаја чинилаца имунског система на функцијска својства ММЋ.

1.2.1. ПРОЛИФЕРАЦИЈА И ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈА МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

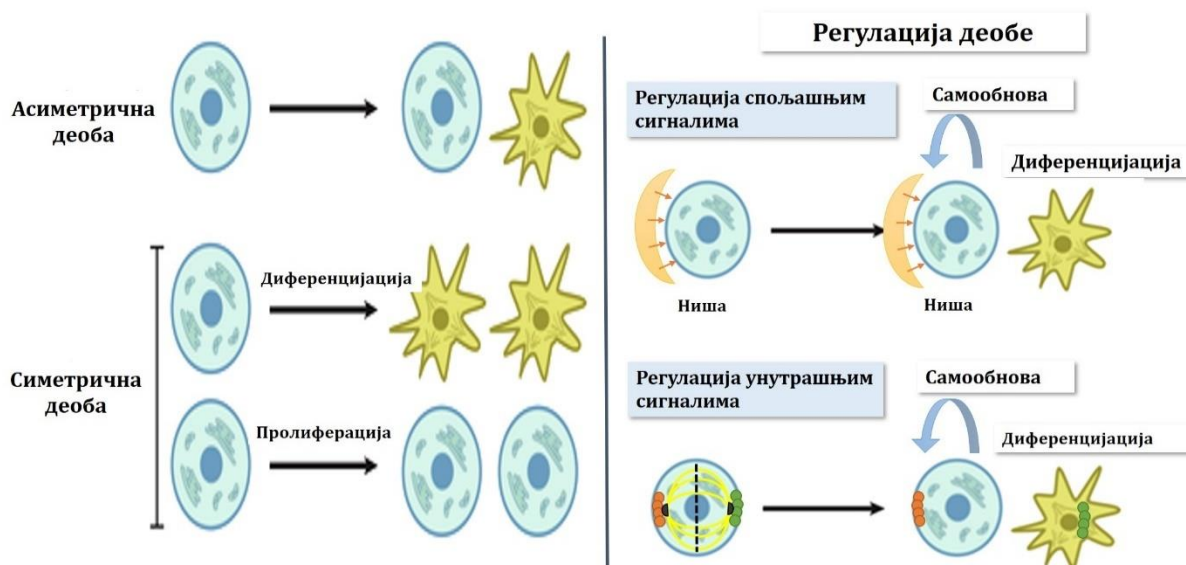
1.2.1.1. Пролиферација и самообнављање мезенхимских матичних ћелија

Уравнотеженим односом између пролиферације и диференцијације, као алтернативних судбина МЋ успоставља се бројност популације (Yamashita et al., 2010). Супротно, немогућност одржавања одговарајуће бројности МЋ може водити ка хиперплазији ткива услед хиперпролиферације МЋ, као и дегенерацији ткива или старењу услед смањења активности МЋ или њихове бројности (Morrison & Kimble, 2006; Rando 2006).

Акумулацијом пролиферативних сигнала (митогена), у датом тренутку МЋ може се поделити асиметрично или симетрично у зависности од потреба организма (Слика 5), што указује да су током индукције деобног циклуса истовремено активни и механизми укључени у детерминисање судбина ћерки ћелија. Асиметрична деоба одвија се у циљу одржања ткивне хомеостазе и подразумева настанак једне МЋ и једне ћелије предодређене за диференцијацију (Yamashita & Fuller, 2008), док симетрична деоба резултује у настанку две МЋ или две диференциране ћелије (Shahriyari & Komarova, 2013), што представља механизам ћелијске експанзије неопходан током развића, као и регенерације након повреде (Yamashita & Fuller 2008). Из тог разлога се сматра да је факултативни начин деобе ћелија кључна адаптација у одржавању регенеративног капацитета адулног организма (Morrison & Kimble, 2006). Међутим, механизми регулације деобе МЋ у највећој мери засновани су на резултатима добијених применом различитих модел-система попут *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, епителних и неуроепителних ћелија миша (Lechler & Fuchs, 2005; Morrison & Kimble 2006; Florian & Geiger, 2010), док код ММЋ ови процеси нису расветљени.

Посебан проблем дефинисања механизма регулације деобе и самообнове код ММЋ представља хетерогеност ћелија у оквиру колонија које ММЋ формирају у условима *in vitro*, где се истиче да култивисане ММЋ стварају колоније које нису увек формиране од стране једне ћелије. Додатан проблем идентификације

клоналности ММЋ је што *in vitro* услови *per se* могу стимулирати диференцијацију ММЋ (Samsonraj et al., 2015; Rennerfeldt & Van Vliet 2016), чиме се малобројна популација МЋ у оквиру култивисаних ММЋ исцрпљује и мења. За разлику од пролиферације, појмови способности самообнове и клоногености детерминисани на основу *in vitro* истраживања се из ових разлога код ММЋ не могу у потпуности изједначити .



Слика. 5. Симетрична и асиметрична деоба МЋ; Регулација деобе спољашњим и унутрашњим сигналима. Преузето и измењено према Yamashita et al., 2010; Yang et al., 2015

Поред регулације деобе, способност самообнове МЋ подразумева и одржавање мултипотентности или плурипотентности зависно од типа МЋ. За разлику од ЕМЋ, код којих се плурипотентност одржава спречавањем диференцијације и стимулацијом пролиферације, капацитет самообнове АМЋ подразумева могућност индуковане деобе уз одржавање недиференцираног стања, те су истовремено са одржавањем мирујућег стања и спречавањем апоптозе и старења (сенесценције), активни и механизми који одржавају матичност ћелија (He et al., 2009). На молекулском нивоу заједничка карактеристика матичног стања ММЋ и ЕМЋ укључује присуство ембрионалних транскрипционих фактора (SOX-2, Oct 3/4, Klf4 (од енгл. *Kruppel-Like Factor 4*), c-Мус, NANOG) који регулишу матичност. Њихова активност контролисана је спољашњим сигналима (Niwa 2007; Kolf et al., 2007), при чему је за матичност ММЋ показано учешће LIF

фактора (од енгл. *Leukemia Inhibitory Factor*) и других фактора попут из фамилије FGF протеина (од енгл. *Fibroblast Growth Factor*), као и фактора који припадају *Wnt* фамилији протеина (Kolf et al., 2007). Иако улоге ембрионалних транскрипционих фактора, нису у потпуности познате, сматра се да SOX-2, Oct 3/4 и NANOG чине језгро регулаторне мреже која контролише процесе самообнове и диференцијације. У оквиру ове мреже активност транскрипционих фактора одређена је позитивним и негативним спрегама којима је међусобно регулисана активност сваког фактора, док сваки транскрипциони фактор има и способност сопствене регулације. Са друге стране, мале промене у експресији једне компоненте ове петље последично доводи до промене у другим компонентама што потом одређује укупан диференцијациони статус ћелије (Liu et al., 2007; Niwa 2007).

1.2.1.2. Диференцијација мезенхимских матичних ћелија

Иако механизми који током и након деобе одређују судбину ћерка ћелија нису довољно познати, основни услов за диференцијацију ММЋ представља сложена сигнална каскада чија активност индукује репрограмирање генома кроз интеракцију великог броја транскрипционих фактора који, између осталог, модификују структуру хроматина (Huang et al., 2015; Almalki & Agrawal 2016). Као последица ових промена, инхибира се експресија гена карактеристичних за стање матичности, док се активира експресија гена који учествују у диференцијацији (Liu et al., 2007). Осим тога, с обзиром да се ММЋ у условима *in vitro* могу диференцирати у ћелије различитих везивних ткива (остеоците, адипоците, хондроците, миоците, фибробласте) јасно је да се у основи диференцијације ка одређеном правцу налазе и сложени механизми који активирају генску експресију специфичну за један правац уз истовремено блокирање експресије гена специфичних за друге правце диференцијације (Слика 6) (Del Fattore et al., 2012). Са друге стране, усмеравање процеса диференцијације ММЋ ка одређеном типу зрелих ћелија контролисан је присуством различитих цитокина, фактора раста, молекула ВЋМ, односно специфичном нишом у којој се ММЋ налазе (Almalki & Agrawal 2016).



Слика 6. Схематски приказ диференцијационих процеса ММТ и транскрипционих фактора који их регулишу. Преузето и измењено према Venayahu et al., 2008.

У процесу остеогене диференцијације ММТ главну улогу има активација транскрипционог фактора Runx2 (од енгл. *Runt related transcription factor 2*), с обзиром да је показано да код мишева који не експримирају овај фактор не долази до диференцијације остеобласта, и последично, формирања костију. Код људи, у случају хаплоинсуфицијенције *Runx2* гена развија се аутозомно доминантно обољење клеидокранијална дисплазија када се развијају абнормалности у костима које се формирају интрамембранском осификацијом. Ипак, експресија Runx2 није довољна за потпуну диференцијацију остеобласта, већ је неопходна активност других фактора који припадају Wnt сигнализацији (β -катенин зависној и β -катенин независној), *Hedgehog* и NELL-1 (од енгл. *Neural Epidermal growth factor-like protein 1*) сигнализацијама (Rucci 2008; Kim et al., 2013; Xu et al., 2015; Pang et al., 2015; Almalki & Agrawal 2016). Последњих година улога Wnt сигнализације у остеогенези посебно привлачи пажњу, с обзиром да је код одређених обољења коштаног система људи показана повезаност патолошких стања са неадекватном Wnt сигнализацијом (Kim et al., 2013). Активација β -катенин зависног Wnt сигналног пута подразумева везивање Wnt за свој рецептор *Frizzled* и корецептор скрасеница LRP5/6 (од енгл. *Low-*

density lipoprotein Receptor-related Protein). Овај сигнал блокира активност ензима β киназе 3 гликоген синтазе ($GSK3\beta$) што омогућава стабилизацију β -катенина у цитоплазми. Након постизања одређене концентрације овај протеин се транслоцира у једру где као транскрипциони фактор регулише транскрипцију циљних гена Wnt сигнализације (**Rucci 2008; Almalki & Agrawal 2016**). Као резултат ове активности, стимулише се експресија фактора остеогене диференцијације попут Runx2, Dlx5 (од енгл. *Distal-less homeobox 5*) и Osx (од енгл. *Osterix*) (**Rucci 2008; Almalki & Agrawal 2016**). Истовремено, овим процесима се инхибира експресија транскрипционих фактора хондрогене и адипогене диференцијације (**Bennett et al., 2005; Kang et al., 2007**). Након ових корака, опредељени остеопрогенитори пролазе кроз фазу пролиферације када експримирају алкалну фосфатазу. Овај ензим уједно представља и један од најранијих маркера у диференцијацији остеобласта. Како преостеобласти престају са деобом, тако се и њихова морфологија мења. Из вретенастог облика ћелије прелазе у велике кубоидалне, диференциране остеобласте богате ензимом алкалне фосфатазе. Диференцирани остеобласти секретују протеине као што су колаген тип I, остеопонтин, остеонектин, BSP II (од енгл. *Bone Sialo Protein II*), а који улазе у састав коштаног матрикса. Експресија раних маркера прекурсора остеобласта се повећава са сазревањем остеобласта и депоновањем матрикса. Зрели и активирани остеобласти почињу да експримирају гене који су укључени у минерализацију матрикса као што је остеокалцин. Овај протеин представља маркер зрелих остеобласта са хормонском активношћу, а даљом диференцијацијом остеобласта настају остеоцити који више не експримирају маркере раних остеобласта, већ граде и одржавају архитектуру коштаног ткива (**Rucci 2008**).

Хондрогена диференцијација ММЋ заснива се на активности Sox-9 транскрипционог фактора (од енгл. *SRY-box 9*) који контролише експресију гена чији протеински производи, попут колагена типа II, IX, XI и протеогликана, улазе у састав ВЋМ хрскавице. Истовремено, Sox-9 инхибира даљу диференцијацију хондроцита спречавањем формирања хипертрофичних хондроцита који представљају почетну фазу у развоју коштаног ткива током ендохондралне осификације. Значај овог фактора у хондрогенези додатно потврђују и

истраживања која показују да је дефектан Sox-9 ген одговоран за кампомеличну дисплазију, ретко и летално генетско обољење скелетног система које је праћено значајним скраћивањем удова код људи (**Kondo et al., 2014; Almalki & Agrawal 2016**).

У оквиру диференцијације ММЋ у адипоците могу се разликовати две фазе, а главни транскрипциони фактори ових процеса су C/EBPs (од енгл. *CAAT/Enhancer Binding ProteinS*) и PPAR- γ (од енгл. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ). Током прве фазе МЋ прелази у преадипоцит, који се морфолошки не разликује од своје прекурсорске ћелије, али више не поседује мултипотентни потенцијал диференцијације. У завршној фази преадипоцити прелазе у зреле адипоците што подразумева морфолошке промене, присуство и активност протеина неопходних за транспорт и синтезу липида, дејство инсулина, као и продукцију протеина специфичних за адипоците. Такође, ове промене праћене су променама у компонентама ВЋМ и цитоскелетних елемената, као и експресији гена специфичних за адипоците и накупљање липида (**Du et al., 2010; Moreno-Navarrete & Fernandez-Real, 2012; Almalki & Agrawal 2016**).

Ипак, ови механизми изучавани су у условима *in vitro* (**Gimble et al., 2008**), док се у циљу одржавања хомеостазе, ММЋ у условима *in vivo* диференцирају у ћелије ткива у оквиру кога се налазе, те је за сагледавање карактеристика диференцијационог капацитета ММЋ, који би потенцијално могао бити искоришћен у регенеративној медицини, неопходно имати у виду ткивно порекло популације ММЋ.

Диференцијациони процеси који карактеришу ћелије ткива периодонцијума огледају се пре свега у одржању степена минерализације ткива, односно регулацији остеогене диференцијације. Наиме, упркос чињеници да се налази између два чврста, минерализована ткива, јединствена способност ткива периодонцијума испољава се у одржавању релативно уједначене ширине неминерализованог везивног ткива током времена. При томе, прилагођавајући се функционим захтевима ткиво периодонцијума има способност промена, па тако са повећањем потреба ширина ткива се може увећати и за 50% кроз задебљавање снопова влакана. Насупрот томе, смањење функције периодонцијума огледа се у сужавању дебљине ткива кроз смањење броја и дебљине влакана (**Nanci &**

Bosshardt 2006; Lekic & McCulloch 1996). Стога се намеће закључак да ћелије ткива периодонцијума укључујући и ПД-ММТ иако поседују изражени остеогени потенцијал (**Lekic & MacCulloch 1996; Choi et al., 2013; Alvarez et al., 2015**), са друге стране морају поседовати и механизме који контролишу минерализациони процес (**Lekic & McCulloch 1996; Takimoto et al., 2015**). Неоспорни докази говоре у прилог да ћелије у оквиру овог ткива како током развоја тако и током регенерације, секретују молекуле који регулишу степен минерализације и уједно спречавају спонтано срастање корена зуба и алвеоларне кости, односно анкилозу (**Nanci & Bosshardt 2006**). Иако су механизми инхибиције минерализације ткива периодонцијума слабо познати, до сада је показано да регулацији одржања неминерализованости може доприносити присуство матриксног *Gla* протеина (MGP, од енгл. *Matrix Gla Protein*), познатог инхибитора минерализације (**Nanci & Bosshardt 2006**), гликозаминогликана, простагландина, колаген-асоцираног протеина (*RGD-cementum attachment protein*) (**Lekic & MacCulloch 1996; McCauley & Somerman 2012**), PLAP-1 (од енгл. *Periodontal Ligament-Associated Protein-1*)/аспорин (**Yamada et al., 2007**). Осим тога, на ћелијском нивоу показано је да транскрипциони регулатор *Msx2* спречава остеогену диференцијацију фибробласта периодонцијума кроз блокирање транскрипционе активности *Runx2/Osf2* (од енгл. *Osteoblast-Specific Factor 2*) (**Yoshizawa et al., 2004**). Стога регулација диференцијације ћелија ткива периодонцијума, представља и важан аспект разумевања процеса минерализације орофацијалног ткива (**Nanci & Bosshardt 2006; McCauley & Somerman 2012**).

1.2.2. ИМУНСКИ СТАТУС МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

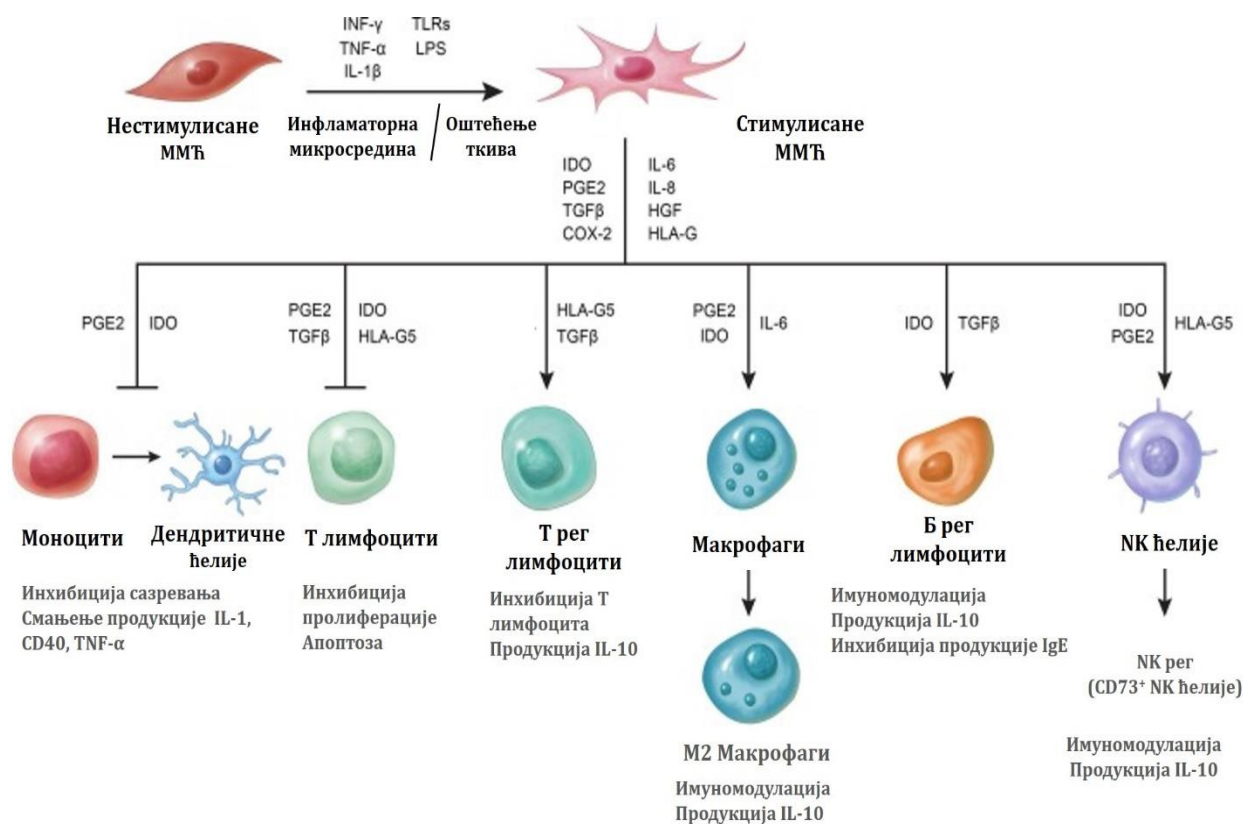
Имајући у виду да су ММЋ претежно локализоване у близини крвних судова, односно у регионима који представљају прву линију одбране организма и интеракцију са ћелијама крви, претпоставља се да ММЋ захваљујући својој функционој пластичности, слично другим типовима немијелоидних (нехематопоеетских) ћелија као што су фибробласти, ендотелске и епителне ћелије, могу активно учествовати у обликовању имунског одговора (**Le Blanc & Davies 2015; Caplan 2016**). Широка заступљеност рецептора који препознају молекулске обрасце патогена (PAMP, од енгл. *Pathogen Associated Molecular Pattern*) на ММЋ попут TLR (од енгл. *Toll Like Receptors*) указује на важну улогу ММЋ у модулацији раног имунског одговора (**Waterman et al., 2010; DelaRosa & Lombardo 2010; Rashedi et al., 2017**). Следствено томе, модулирајући урођени имунски одговор ММЋ могу посредно учествовати и у обликовању и усмеравању стеченог имунског одговора, те се на основу истраживања интеракција ММЋ и имунских ћелија, може закључити да се ефекти ММЋ како на урођени, тако и на стечени имунски одговор могу окарактерисати као двојаки (проинфламаторни и антинфламаторни), али и двосмерни с обзиром да и ћелијске и солубилне компоненте имунског система модулирају функциони статус ММЋ. Иако, специфични ћелијски и молекулски механизми укључени у имуномодулаторну активност ММЋ још увек захтевају опсежна истраживања, данас је познато да ММЋ активно учествују у модулацији имунског одговора како посредством директних међућелијских контаката, тако и продуковањем солубилних фактора. Својим деловањем, ММЋ могу утицати на фенотип и функције имунских ћелија, попут пролиферације, сазревања, поларизације и миграције (**Bernardo & Fibbe 2013; Le Blanc & Davies 2015; Ma & Chan 2016; Zhao et al., 2016; Gao et al., 2016**).

Првобитне студије указале су на имуносупресивна својства ММЋ, с обзиром да је на ксеногеном моделу трансплантације хуманих ММЋ у фетус овце, показано да до одбацивања примењених ћелија не долази ни када се оне апликују након развијања имунолошке баријере код фетуса. На основу тога се могло закључити да ММЋ имају способност избегавања имунског одговора домаћина захваљујући имунским одликама које би могле бити корисне у ткивном инжењерингу и

ћелијској терапији (**Liechty et al., 2000**). Имунопривилегованост ММЋ се огледа у испољавању ниског нивоа површинских молекула—МНС I (од енгл. *Major Histocompatibility Complex*), док је експресија МНС II, CD40, CD80 и CD86 молекула одсутна (**Le Blanc & Ringden 2005; Chamberlain et al., 2007; DelaRosa & Lombardo 2010**). Међутим, иако је показано да ММЋ могу спречити одбацивање трансплантираног ткива код различитих врста (**Bartholomew et al., 2002; Djouad et al., 2003; Sun et al., 2009**), конзистентност овог својства ММЋ није потврђена, због чега се статус имунопривилегованости ових ћелија данас доводи у питање (**Eliopoulos et al., 2005; Nauta et al., 2006; Ankrum et al., 2014; Gu et al., 2015**).

На основу почетних истраживања запажено је и да ММЋ имају способност инхибиције пролиферације активираних Т лимфоцита (**Di Nicola et al., 2002; Krampera et al., 2003; Le Blanc et al., 2003**), а уједно и да секретују широк спектар молекула који имају кључну улогу у имунском одговору укључујући интерлеукине (IL) -6, -8, -10, TGF- β (од енгл. *Transforming Growth Factor Beta 2*), индолеамин-2-3-диоксигеназу (IDO) или простагландина E2 (PGE2) што је такође указало на могућу искористљивост ових својстава ММЋ у сврху терапијске модулације имунског одговора (**English 2013; de Witte et al., 2015; Schepers & Fibbe 2016**). У оквиру модулације стечене имуности показано је да ММЋ, поред инхибиције пролиферације Т лимфоцита, регулишу и њихово сазревање, секрецију цитокина, цитотоксичност, индукују развој регулаторних Т лимфоцита (T_{reg}) (**Glennie et al., 2005; Selmani et al., 2008**), као и да регулишу преживљавање и сазревање Б лимфоцита и последично њихове ефекторске функције (**Corcione et al., 2006; Chen et al., 2006**). Следствена истраживања показала су да ММЋ костне сржи могу побољшавати преживљавање како незрелих, тако и активираних неутрофила (**Raffaghello et al., 2008**), а са друге стране инхибирају главне функције ДЋ укључујући експресију антигенпрезентујућих и костимулаторних молекула, те да модулирају диференцијацију, сазревање и активацију ових ћелија (**Djouad et al., 2007; English et al., 2008; Zhang et al., 2009**). Међутим, слично променљивости статуса имунопривилегованости, такође је показано да испољавање имуномодулаторних ефеката не представља конститутивно својство ових ћелија (**Ma & Chan 2016**). Заправо, на основу бројних експерименталних података данас се истиче дуална

природа имунског статуса ММЂ чији се ефекти испољавају у зависности од датих услова у окружењу (Li et al., 2012; de Girolamo et al., 2013; Haddad & Saldanha-Araujo 2014). Наиме, како је успостављање функционог одговора ММЂ одређено интегрисањем сигнала спољашње средине, у одређивању имунског статуса ММЂ, односно испољавању имуномодулаторних функција кључну улогу има целокупна ниша која постаје знатно усложњена током развоја запаљенског процеса. Инфламаторни сигнали, укључујући ћелијске и солубилне компоненте, индукују стварање специфичног статуса ММЂ које подразумева промену различитих молекулскобиолошких својстава попут експресије површинских антигена, као и секреције солубилних молекула чиме се обликује функциони одговор ММЂ. Стимулисана ММЂ могу инхибирати активност моноцита и Т лимфоцита, али и подстицати активност Т и Б рег лимфоцита, макрофага и НК ћелија (Krampera et al., 2011, Ménard & Tarte 2013; English 2013; Zhao et al., 2016; Gao et al., 2016; Hosseinikia et al., 2017; Lee & Song 2018) (Слика 7).



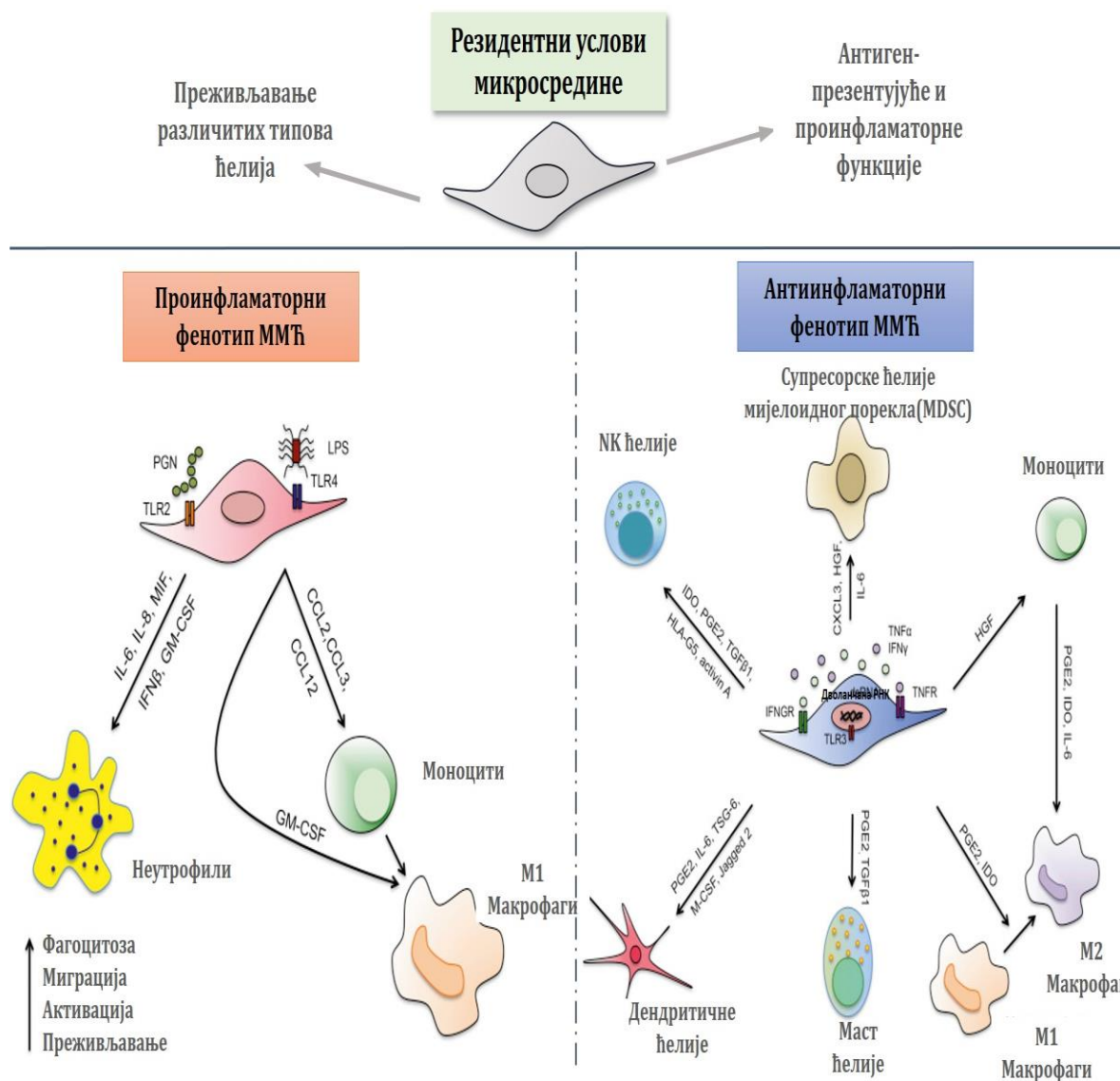
Слика 7. Утицај инфламаторне микросредине на имуномодулаторну активност ММЂ. Прекинуте стрелице означавају инхибицију, док стрелице означавају стимулацију. Преузето и измењено према. Lee & Song 2018.

Како би се објаснила зависност испољавања имуномодулаторних активности ММЋ од услова микроокружења претпостављен је вишестепени процес активације ММЋ. На тај начин, успостављање ћелијског фенотипа ММЋ са одређеним имуномодулаторним својствима, би представљао механизам усмеравања функционог одговора ММЋ (**Waterman et al., 2010; Krampera 2011; Bernardo & Fibbe 2013**) (Слика 8). У мирујућим, резидентним условима микроокружења ММЋ подржавају преживљавање различитих типова ћелија, а такође могу испољавати антиген-презентујућа и проинфламаторна својства (**Krampera 2011**) (Слика 8). Ангажовањем TLR4 рецептора под утицајем LPS (од енгл. *Lipopolysaccharides*) (**Waterman et al., 2010**) или TLR2 рецептора под утицајем пептидогликана (**Tomchuck et al., 2008**) успоставља се проинфламаторни фенотип ММЋ. Тада ММЋ задобијају способност да мигрирају на место инфламације и индукују имунски одговор, при чему су ови процеси праћени секрецијом различитих фактора који доприносе привлачењу и активацији имунских ћелија (**Waterman et al., 2010; Le Blanc & Davies 2015**). Са друге стране, ангажовањем TLR3 од стране дволанчане РНК или под дејством проинфламаторних цитокина (IFN- γ , TNF- α или IL1- α/β) ММЋ се могу усмерити ка успостављању антиинфламаторног фенотипа који се испољава кроз повећану продукцију имunosупресивних фактора као и инхибицију активности имунских ћелија (Слика 8) (**Waterman et al., 2010; Li et al., 2012; Bernardo & Fibbe 2013**). Стога би, функционо сазревање ММЋ подразумевало активацију ММЋ путем различитих инфламаторних фактора, а затим и превазилажења одређеног прага између супресивних и стимулаторних сигнала (**Krampera 2011**) (Слика 8).

Овакав концепт поларизације ММЋ представља модел којим би се могле објаснити наизглед контрадикторне улоге ММЋ у инфламацији. Физиолошки смисао успостављања различитих фенотипова ММЋ огледао би се у постојању могућности да се кроз равнотежу сигнала промовише одбрамбени систем домаћина уз истовремено креирање сигналне петље којом се спречава оштећење, а уједно стимулише обнова ткива (**Bernardo & Fibbe 2013; Le Blanc & Davies 2015**).

Без обзира на неразјашњену природу имунског статуса ММЋ, имуномодулаторна својства ових ћелија заузела су важно место у стратегијама

регенеративне медицине, али и клиничких студија. Ипак, у циљу побољшања стандардизације дефинисања имуномодулаторног капацитета *ex vivo* умножених ММЂ, потребно је успоставити ригорозније тестове који би се спроводили у условима најсличнијим *in vivo* условима (Krampera et al., 2013; Galipeau et al., 2016).



Слика 8. Поларизација и усмеравање имуномодулаторног одговора ММЂ факторима микросредине. IFN- од енгл. *Interferon*; TNF-од енгл. *Tumor Necrosis Factor*; MIF од енгл. *Macrophage migration inhibitory factor*; GM-CSF од енгл. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*; CCL2, CCL3, CCL12, CXCL3-хемокини; TSG-6 од енгл. *Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*; HGF од енгл. *Hepatocyte Growth Factor*. Преузето и измењено према Krampera 2011; Le Blanc & Davies 2015.

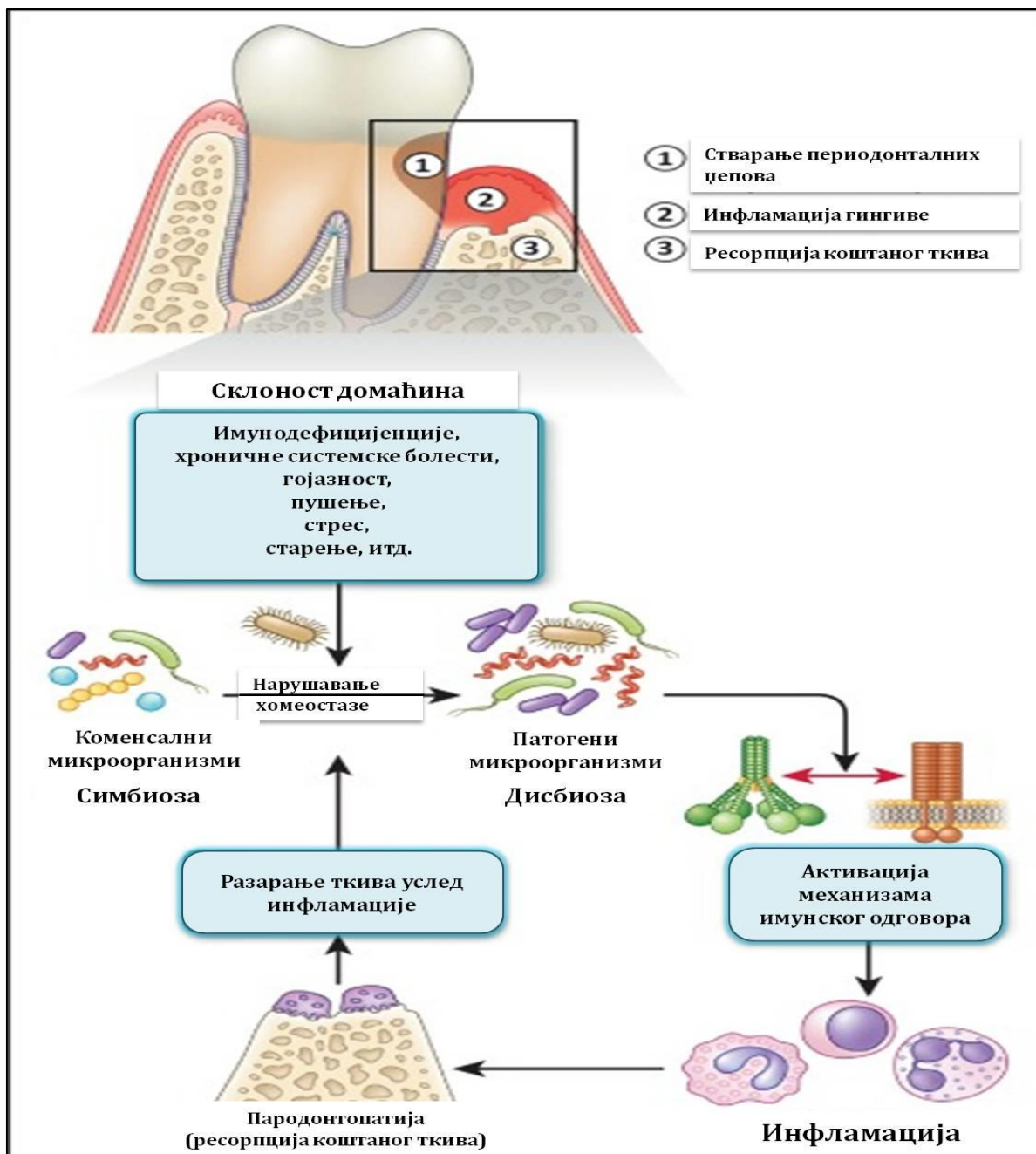
Имајући у виду сложеност имуномодуlatorног потенцијала ММЋ и још увек слабо окарактерисане услове под којима се дата својства испољавају регулација функционалних својстава ММЋ под утицајем инфламаторних сигнала представља изузетно актуелно поље истраживања. Посебна пажња усмерена је на ПД-ММЋ, као ММЋ ткива које се налази у региону усне дупље и које је као саставни део почетног дела система за варење изложено широком спектру антигена спољашње средине (**Li et al., 2014**). Истовремено, ткиво периодонцијума представља и својеврсну имунску баријеру чија улога се огледа у спречавању продора антигена дубље у коштану ткиво, што све заједно упућује на специфична регенеративна и имуномодуlatorна својства овог ткива (**Di Benedetto et al., 2013; Cekici et al., 2014; Ma & Chan 2016; Liu et al., 2017**).

1.3. МИКРОСРЕДИНА УСНЕ ДУПЉЕ

У усној дупљи налази се приближно око шест милијарди бактерија, међу којима се може разликовати више од 700 врста, али и других типова микроорганизама укључујући гљивице, протозое и вирусе (Aas et al., 2005, How et al., 2016). Ови микроорганизми, формирајући сложене биофилмове чине орални микробиом (Aas et al., 2005; Dewhirst et al., 2010), а у зависности од површине коју насељавају у оквиру усне дупље се може разликовати микробиом мукозе, зуба и пљувачке (He et al., 2015). Упркос комплексном саставу оралног микробиома, усна дупља се одликује стабилним саставом, док услед нарушавања равнотеже и умножавања потенцијално патогених микроорганизама може доћи до развоја различитих обољења усне дупље. Из тог разлога, од посебне важности је статус биофилма формираног на површини зуба, који је означен као дентални биофилм (плак), с обзиром да услед нарушавања његове стабилности долази до развоја широко распрострањених обољења зуба попут каријеса и периапикалне инфекције, али и обољења потпорног ткива зуба попут упале гингиве и пародонтопатије (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013; He et al., 2015).

У људској популацији обољење потпорног ткива зуба је веома заступљено с обзиром да према подацима Светске здравствене организације погађа 10-15% одрасле популације широм света (Petersen & Ogawa, 2012). Код ових пацијената, у субгингивалном региону денталног плака, долази до постепене промене састава плака при чему уместо Грам-позитивних, факултативних, ферментативних бактерија претежно из родова *Actinomyces* и *Streptococci* почињу постепено да преовладавају анаеробне, хемоорганотрофне, Грам негативне бактерије родова из раздела Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes и *Synergistetes*, као и протеолитички организми (Feng & Weinberg 2006; Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013; Hajishengallis 2015). Поред промене састава микробиома, велику улогу у развоју овог обољења и степену деструктивности има предиспозиција домаћина, односно његов имунски статус (Feng & Weinberg 2006; Hajishengallis et al., 2012). Тако је показано је да се пародонтопатија чешће развија код пацијената са супримираним имунитетом, односно системским обољењима попут дијабетеса, ХИВ, леукемије, Дауновог синдрома (Komatsu 2014; Mehta 2015), али и да је повезаност

двосмерна, односно услед пародонтопатије може бити повећан ризик за развој кардиоваскуларних обољења, дијабетеса, реуматоидног артритиса, респираторних обољења, као и деменције (How et al., 2016; Tomás et al., 2017) (Слика 9).



Слика 9. Схематски приказ развоја инфламације потпорног ткива зуба. Предиспозиција домаћина и спољашњи чиниоци узрокују нарушавање равнотеже састава денталног плака и следственоу активацију имунског одговора. Преузето и измењено према Hajishengallis 2014.

Главни етиолошки узрочник обољења потпорног ткива зуба представљају Грам негативне бактерије где спадају *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella*, *Fusobacterium* и *Porphyromonas gingivalis* при чему се по патогености нарочито истиче *P. gingivalis* (Paster et al., 2006; How et al., 2016; Hajishengallis et al., 2012). Наиме, са развојем денталног плака, активне компоненте ових, преобладајућих субгингивалних бактерија (Hajishengallis & Lamont 2013), пре свега липополисахариди, декстрини, органске киселине дифундују у епител гингиве иницирајући имунски одговор домаћина, што за последицу има упалу десни (гингивитис) (Panagakos & Scannapieco 2011). Упала десни је реверзибилна и може захватити локално ткиво све док услед промена услова, односно акумулације плака и статуса домаћина не дође до прогресије упалног процеса. У том стадијуму, инфламација се шири и захвата дубље потпорно ткиво доводећи до деструкције меког ткива периодонцијума и потом алвеоларне кости, док се истовремено стварају џепови што представља карактеристично својство узнапредовалог облика пародонтопатије која у крајњем стадијуму може довести до губитка зуба (Cekici et al., 2014; Huang & Gibson 2014; How et al., 2016; Bosshardt 2018). Са друге стране, инфламација поторног ткива зуба, слична пародонтопатији, може бити изазвана и постављањем денталних имплантата и значајно утицати на резултат протетских третмана (Charalampakis et al., 2012; Smeets et al., 2014).

Имајући у виду да солубилни фактори учествују у иницијацији и развоју инфламације потпорног ткива зуба, од посебног значаја представља разумевање њихових ткивно-специфичних биолошких функција, пре свега LPS као снажног активатора имунског одговора. Запаљенска реакција, индукована патогеном, праћена је повећањем продукције различитих проинфламаторних цитокина попут IL-1 β , фактора некрозе тумора TNF- α , IL-6, IL-17 од стране имунских ћелија, који мењају функционост денталних ткива (Di Benedetto et al., 2013; Huang & Gibson 2014; Tomás et al., 2017). Са друге стране, савремена истраживања указују да код пацијената са хроничном пародонтопатијом, поред наведених цитокина, долази до повећане продукције једарног цитокина из IL-1 фамилије, IL-33 (Sağlam et al., 2016), „алармина“ који се ослобађа у условима ћелијског оштећења и стреса, док је показана и корелација између повећаног нивоа IL-33 и ресорпције

коштаног ткива алвеоларне кости (**Malcolm et al., 2015; Lapérine et al., 2016**), међутим улога овог цитокина у ткиву периодонцијума, а нарочито код ПД-ММЋ још увек није расветљана.

1.3.1. БИОЛОШКЕ ФУНКЦИЈЕ LPS

Кључну улогу у одржању структуре и интегритета, односно преживљавању Грам негативних бактерија имају липополисахариди, те стога представљају значајан патогени фактор многих пародонтопатогених бактерија (**Silhavy et al., 2010; Zhang et al., 2013; How et al., 2016**). Ови молекули карактеристични су само за спољну мембрану Грам негативних бактерија и представљају снажне активаторе урођене и стечене имуности сисара (**Tan & Kagan 2014**). Структурна организација липополисахарида подразумева присуство полисахарида (О-антиген), непонављајућег језгра олигосахарида и хидрофобног домена означеног као липид А или ендотоксин (**Ogawa 1993; Ogawa & Yagi 2010**). Биолошки активан регион LPS представља липид А кога препознају TLR 2 и 4 рецептори присутни на ћелијама домаћина (**Darveau et al., 2004**). Као последица њихове интеракције у циљним ћелијама иницира се сигнална каскада која доводи до активације, између осталог, сигналних путева митогеном активираних протеин киназа (МАРК, од енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinases*), као и транскрипционих фактора укључујући NF-κB (од енгл. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) и AP-1 (активациони протеин-1) (**Hayashi et al., 2010; Hans & Hans 2011**). Поред добро познате улоге ових рецептора у одбрамбеном систему (**Hayashi et al., 2003; Werling & Jungi 2003**) истраживања показују да TLR рецептори и следствена сигнализација имају активну улогу и у одржању хомеостазе потпорног ткива зуба посредством како имунских тако и неимунских ћелија (**Benakanakere & Kinane 2012; Song et al., 2017**).

У циљу елиминације патогена и очувања интегритета домаћина, као део урођеног имунског одговора, TLR присутни на епителним ћелијама гингиве препознају LPS што покреће сигналну каскаду у овим ћелијама чији резултат представља продукција различитих хемокина и цитокина (**Sandros et al., 2000**). Под утицајем ових медијатора, а пре свега IL-8, ћелије имунског система бивају

привучене на место инфламације како би се ефекторским механизмима фагоцита и неутрофила покренуо процес уклањања микроба. У следственим фазама активирају се и механизми стеченог имунског одговора који укључују активацију антиген специфичних Т - и Б - лимфоцита (**Di Benedetto et al., 2013; Racz et al., 2014; Hajshengallis 2015**).

Поред активације имунских ћелија, LPS активира и TLR присутне на стромалним ћелијама укључујући и ММЋ (**Waterman et al., 2010; Najar et al., 2017**). Наиме, након нарушавања интегритета ткива услед развоја инфламације и проласка кроз епителну баријеру микроорганизми ступају у контакт са фибробластима гингиве и периодонцијума, као најзаступљенијим ћелијама меког везивног ткива периодонцијума (**Wang & Ohura 2002; Di Benedetto et al., 2013; Mysak et al., 2014**) чија је главна улога продукција протеинских компонената ванћелијског матрикса попут колагена, еластина, гликопротеина, гликозаминогликана одржавајући интегритет ткива (**Hefti 1993**). У одговору на присуство микроорганизма ове ћелије такође почињу да продукују проинфламаторне цитокине попут TNF-, IL-6, IL-8, MIP (од енгл. *Macrophage Inflammatory Protein*)-1 α , (SDF)-1 (од енгл. *Stromal cell-Derived Factor 1*), RANKL (од енгл. *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*), који поред важне улоге у инфламацији учествују и у регулацији метаболизма коштаног ткива (**Wang & Ohura 2002; Di Benedetto et al., 2013; Mysak et al., 2014**). Тако је показано да LPS може проузроковати значајно смањење вијабилности фибробласта гингиве (**Basso et al., 2015**), али и да код фибробласта периодонцијума под утицајем LPS и продукованих цитокина долази до повећања експресије матриксних металопроотеиназа (MMP, од енгл. *Matrix metalloproteinases*) (**Chang et al., 2002**). Додатно, присуство бактеријских протеаза индукује инактивацију ткивних инхибитора ових ензима (TIMP, од енгл. *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*) чиме се додатно нарушава равнотежа односа MMP/TIMP, односно подстиче деградација ткива (**Feng & Weinberg 2006; Pöllänen et al., 2012**). Услед даље разградње ткива и ширења инфламације, патогени могу допрети и до коштаног ткива и условљавати ресорпцију коштаног ткива како кроз смањење броја остеобласта, тако и кроз стимулацију остеокластогенезе (**Zhang et al., 2014; Racz et al., 2014**).

Како дуготрајна бактеријска инфекција може проузроковати значајна оштећења ткива периодонцијума, од посебног значаја представља познавање утицаја LPS на укупни регенеративни капацитет денталних ткива кроз деловање на прогениторске ћелије попут ПД-ММЋ, имајући у виду потенцијални терапеутски ефекат ових ћелија у лечењу пародонтопатије (**Racz et al., 2014**). У том контексту, истраживања су показала да LPS (*P. gingivalis*) утиче на вијабилност, пролиферацију и диференцијацију ПД-ММЋ (**Trubiani et al., 2012; Kato et al., 2014; Albiero et al., 2105**). Ипак, недовољна конзистентност добијених резултата упућује на неопходност додатног расветљавања утицаја LPS на ПД-ММЋ.

1.3.2. БИОЛОГИЈА IL-33

Открићу IL-33 независно су допринела истраживања три истраживачке групе различитих области молекулске биологије. Првобитно, у циљу описивања молекулских механизма који карактеришу процес континуираног вазоспазма церебралних артерија на моделу пса, идентификован је ген *DVS27* непознате функције чија експресија је у највећој мери била стимулисана у ендотелским ћелијама ових артерија (**Onda et al., 1999**). Потом, *Baekkevold* и сарадници 2003. године описују први нуклеарни фактор превасходно присутан у ћелијама високог ендотела, означивши овај протеин као нуклеарни фактор ендотелских ћелија високих венула (NF-HEV, од енгл. *Nuclear Factor from High Endothelial Venules*). Том приликом, показано је да је NF-HEV на нивоу иРНК и протеина присутан у високој концентрацији у ћелијама високог ендотела и то специфично у тонзилама, Пејеровим плочама и лимфним чворовима код људи. Следствено, ови резултати упутили су на закључак да би NF-HEV могао представљати један од кључних фактора у контроли фенотипа специјализованог ендотела HEV (од енгл. *High Endothelial Venules*) (**Baekkevold et al., 2003**). Међутим, након опсежнијих биоинформатичких анализа, у циљу идентификације специфичног лиганда за ST2 рецептор IL-1 цитокинске фамилије, IL-33 је 2005. године сврстан у ову цитокинску фамилију на основу присуства карактеристичне структуре (енгл., *β -trefoil-fold*) коју формира 12 β ланаца у оквиру C- терминалног домена, што

представља карактеристично својство цитокина IL-1 фамилије. У истој студији, анализом секвенци цитокина IL-1 фамилије, утврђено је да се ген за хумани IL-33 налази у оквиру хромозома 9, на позицији p24.1, при чему организација IL-33 укључује седам кодирајућих егзона на основу којих се продукује протеинска секвенца од 270 аминокиселина, што одговара протеинима чија маса износи 30 KDa (**Schmitz et al., 2005**).

Поред карактеристичног домена цитокина IL-1 фамилије (аминокиселине 112-270), у оквиру целокупне пептидне секвенце IL-33, могу се разликовати централни (аминокиселине 66-111) (**Schmitz et al., 2005**) и једарни домен (аминокиселине 1-65), док се IL-33 синтетише у виду пропептида који на N- терминалном крају (једарни домен) поседује специфичну хроматин-везујућу секвенцу (аминокиселине 40-58) која омогућава једарну локализацију овог цитокина (**Liu et al., 2013; Roussel et al., 2008; Lefrançais & Cayrol 2012**) (**Слика 10**) (**Слика 10**).

За разлику од цитокина са индуцибилном експресијом, у физиолошким условима IL-33 је конститутивно присутан, пре свега у једру нехематопоеетских ћелија (**Schmitz et al., 2005**), при чему се као главни извори овог цитокина могу издвојити ендотелске и епителске ћелије. Висок ниво експресије једарног IL-33 показан је у фибробластним, ретикуларним ћелијама лимфоидног ткива, адипоцитима, глаткомишићним ћелијама, као и у одређеним типовима епителских ћелија, укључујући кератиноците и епител бронхија и гастроинтестиналног тракта. Осим у здравом ткиву, показано је да се IL-33 конститутивно експримира и у малигном ткиву *in vivo*. Такође, IL-33 је присутан у ћелијама хематопоеетског порекла, али у ограниченим популацијама професионалних антиген презентујућих ћелија попут макрофага и ДТ (**Moussion et al., 2008**).

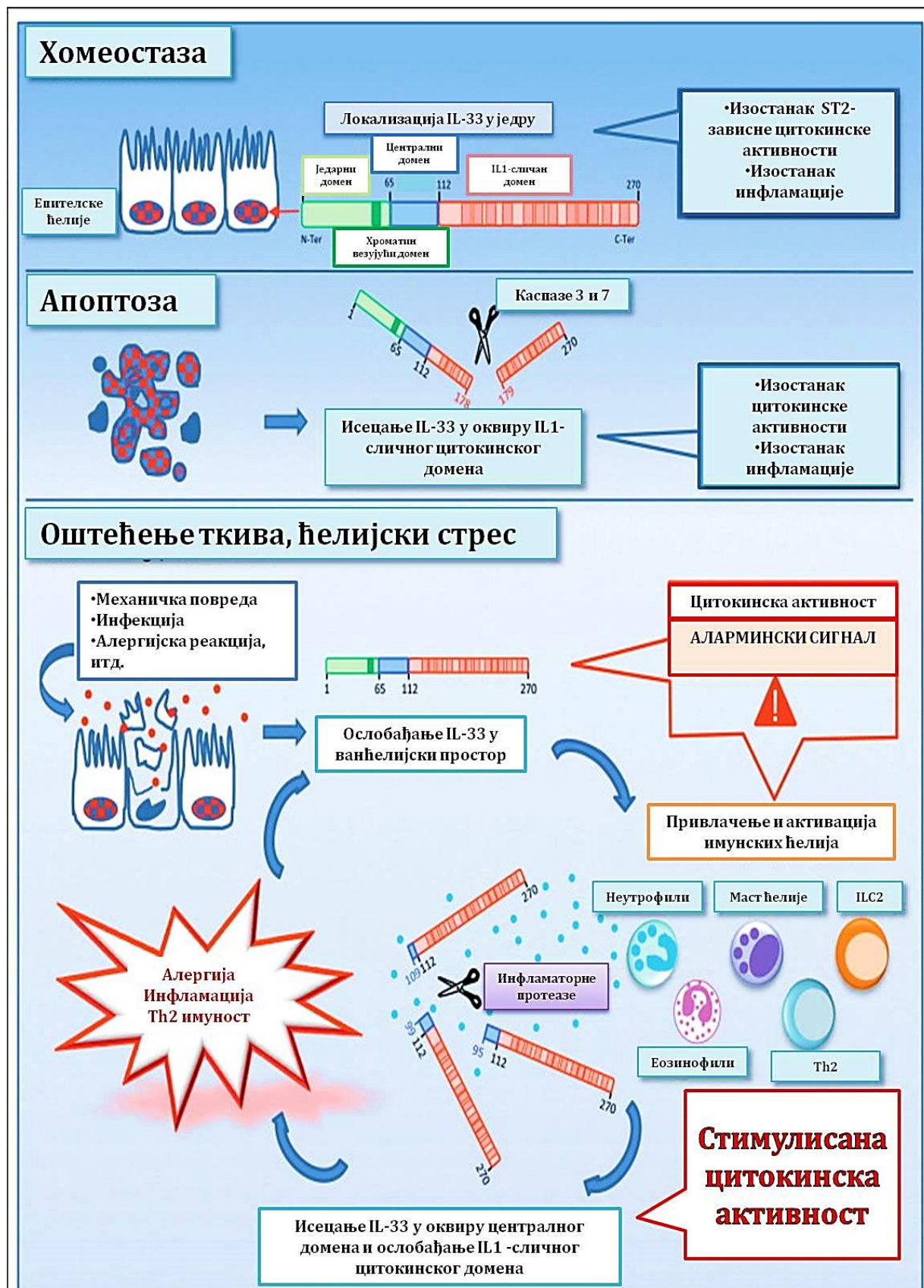
Захваљујући присуству хроматин-везујућег домена у оквиру N- терминалне секвенце примарна локација ендогеног, необрађеног IL-33 представља једру (**Слика 10**). На основу тога јасно се намеће закључак да у овом молекулском облику IL-33 поседује и одређене унутарћелијске функције које се пре свега могу огледати у регулацији генске експресије. Ипак, специфични гени чију експресију регулише једарни IL-33 још увек нису идентификовани, иако досадашњи подаци

указују да IL-33 снажно посредује у блокирању транскрипције (**Carriere et al., 2007**). Осим инхибиције транскрипције коју остварује директно, IL-33 такође може функционисати као транскрипциони репресор на индиректан начин, кроз интеракцију са другим транскрипционим факторима (**Ali et al., 2011**). У прилог значаја једарне локализације IL-33 у хомеостази имунског система упућују и резултати скорашњих истраживања која су показала да нарушавање позиције IL-33 на ћелијском нивоу доводи до драстичних последица *in vivo*, те да постоји висок степен регулације локализације овог молекула. Наиме, користећи технике *knock in* генетског инжењеринга **Bessa** и сарадници индуковали су мутацију са циљем експресије протеина који поседује IL-1 цитокински домен, али није локализован у једру. Резултат ових модификација код експерименталних животиња била је висока концентрација IL-33 у серуму, као и развој системске инфламације коју карактеришу спленомегалија и инфилтрација мијелоидних ћелија у више органа са леталним исходом иако су се животиње рађале са нормалним фенотипом (**Bessa et al., 2014**).

У ванћелијској средини IL-33 се може наћи тек након оштећења ћелије или некротичне ћелијске смрти када подлеже деградацији услед активности различитих инфламаторних протеаза (**Слика 10**). Наиме, ови ензими специфично пресецају IL-33 у оквиру централног домена чиме се уклања једарна N-терминална секвенца и последично ствара зрела форма IL-33 која садржи активни, IL-1 цитокински домен. Тако обрађен и ослобођен IL-33 везујући се за свој рецептор може активирати околне ћелије, а његови ефекти до сада су најбоље проучени на ћелијама имунског система превасходно у контексту урођене имуности и Th2 имунског одговора (**Garlanda et al., 2013; Kaczmarek et al., 2013; Cayrol & Girard, 2014**). Ипак, упркос све већем броју података о биолошкој улози IL-33, до сада су недовољно проучени механизми који регулишу активност солубилне форме овог цитокина. Како је познато, могућност исецања IL-33 у оквиру кратке секвенце централног домена имају ванћелијске протеазе где спадају катепсин G и еластаза које продукују неутрофили, као и серинске протезе маст ћелија, због чега су ове реакције карактеристичне на местима инфламаторне реакције (**Слика 10**).

Поред тога, показан је и различит степен биоактивности обрађених форми IL-33, док њихов допринос у условима *in vivo* није још увек познат (**Lefrançois et al., 2012; Lefrançois & Cayrol 2012; Lefrançois et al., 2014**), те је разумевање активности IL-33 додатано отежано. Супротно томе, уколико ћелија подлегне програмираној ћелијској смрти, каспазе (3 и 7) активирани током овог процеса пресецају IL-33 у оквиру IL-1 цитокинског домена што доводи до инактивације овог цитокина и последичног избегавања активације имунског одговора у одсуству стварне опасности (**Liu et al., 2013; Cayrol & Girard 2009; 2014; Garlanda et al., 2013**) (Слика 10). Стога, имајући у виду начин експресије, као и специфичан начин регулације синтезе и секреције, IL-33 је данас окарактерисан као ендогени сигнал опасности, односно алармин, при чему инактивација IL-33 током апоптозе може представљати контролни механизам којим се спречава настанак оштећења у околном ткиву под утицајем проинфламаторних ефеката IL-33 (**Moussion et al., 2008; Cayrol & Girard 2009; Lüthi et al., 2009; Martin et al., 2012**).

Међутим, како би се на системском нивоу разумела активност и улога IL-33 још увек постоји потреба дефинисања додатних механизма путем којих се IL-33 ослобађа у ванћелијску средину, с обзиром да резултати указују на постојање сложених механизма који учествују у регулацији ослобађања IL-33, као и на велики број сигналиних путева којима различити типови ћелија могу и индуцибилно секретовати IL-33. Стога је детаљније разумевање процеса обраде и секреције IL-33 неопходно како би се дефинисале биолошке улоге IL-33, као и допринос овог цитокина различитим инфламаторним, инфективним и аутоимунским обољењима (**Zhao & Hu 2010**).

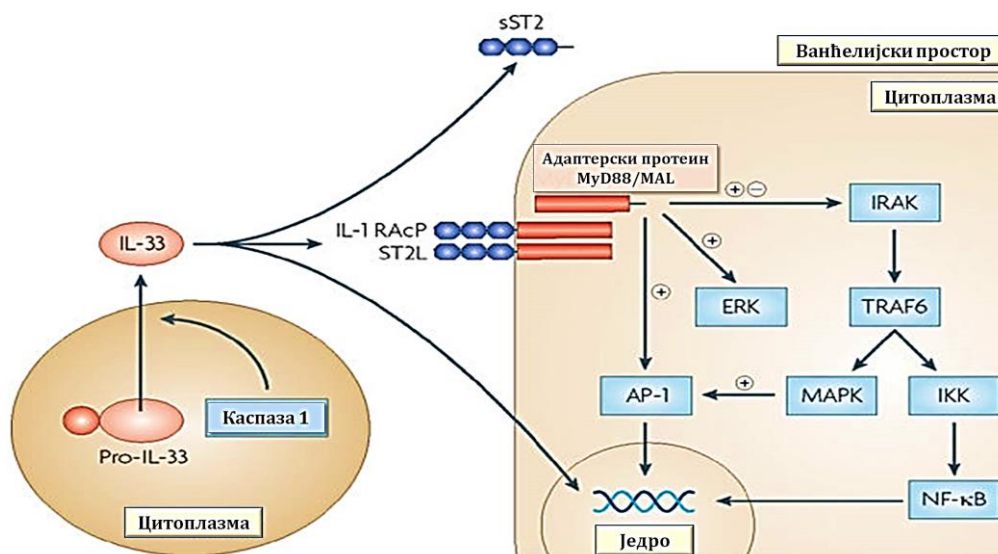


Слика 10. Схематски приказ активности једарног IL-33. Преузето и измењено према Cayrol & Girard, 2014.

Иако још увек нису у потпуности разјашњени механизми којима IL-33 доспева у ванћелијску средину, до сада је показано да на циљним ћелијама секретовани IL-33 испољава ефекте посредством мембранског ST2 рецептора (ST2L). Овај рецептор се још означава и као T1, IL 1RL1 или DER4 и припада суперфамилији TLR, односно IL-1 фамилији рецептора. Међутим, с обзиром да је до сада описано више изоформи овог рецептора (**Kakkar & Lee 2008**), сигнализација коју покреће IL-33 као и следствени биолошки ефекти веома су комплексни. Алтернативном транскрипцијом хуманог ST2 гена могу настати три изоформе ST2 рецептора (ST2L, sST2 и ST2V) различитих структура (**Kakkar & Lee 2008**). Наиме, ST2L се састоји из карактеристичног цитоплазматског TIR домена, трансмембранског домена и три имуноглобулинска домена која се налазе у ванћелијској средини. Одсуство трећег имуноглобулинског домена и алтернативно искрајање C- терминалног краја ST2 секвенце резултује настанком ST2V рецепторске изоформе, док sST2 поседује само ванћелијски домен ST2L при чему се на C- терминалном крају налази јединствена секвенца од 9 аминокиселина (**Kakkar & Lee 2008**). Поред разлика у структури, изоформе ST2 рецептора разликују се у начину експресије и ткивној дистрибуцији. Најбоље проучена изоформа ST2L експримира се конститутивно како на хематопоетским, тако и на нехематопоетским ћелијама (**Miller & Liew 2011**), док је најизраженије присуство показано на површини ћелија Th2 субпопулације лимфоцита. Са друге стране, експресија sST2 је у највећој мери индуцибилна тако што се sST2 експримира под утицајем проинфламаторних фактора, док се ST2V изоформа претежно експримира у органима гастроинтестиналног система укључујући желудац, црева, али и слезину, док је одсутна у јетри и срцу (**Kakkar & Lee 2008; Miller & Liew 2011**).

Након идентификације IL-33 као јединственог агонисте ST2 рецептора (**Schmitz et al., 2005**) описана су и специфична својства сигнализације коју IL-33 покреће преко ST2L рецептора. Наиме, како ST2 припада IL-1 рецепторској фамилији, након стварања комплекса кога чине IL-33 и његов мембрански рецептор, посредством TIR домена, регрутује се распрострањени акцесорни протеин IL-1R (IL-1RAcP) што појачава афинитет везе између IL-33 и рецептора и уједно је и неопходан за активност IL33 (**Palmer et al., 2008**) (Слика 11). Даља

сигнализација спроводи се управо преко TIR домена IL-1RAcP и укључује регрутовање адаптерског протеина MyD88 који потом регрутује друга два адаптерска протеина IRAK1 и IRAK4 (IRAK, од енгл. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*) Тако повезивање као последицу има активације TRAF6 протеина (од енгл. *TNF Receptor-Associated Factor 6*) што потом доводи до активирања киназа MAPK сигналног пута (ERK1,2, p38 MAPK, JNK), али AP-1 и NF- κ B сигналних путева након чега следи транскрипција одговарајућих гена (Miller & Liew 2011; Molofsky et al., 2015). Са друге стране, како се sST2 у ванћелијској средини везује за слободни IL-33 ефекат ове изоформе представља смањење концентрације IL-33 доступног за ST2L што последично доводи до блокирања активности IL-33, те се сматра да ова форма ST2 рецептора има функцију „мамца” (енгл., *decoy receptor*) (Kakkar & Lee 2008; Molofsky et al., 2015) (Слика 11).



Слика 11. Ослобађање IL-33 и покретање сигналних путева преко мембранског ST2L рецептора. Преузето и измењено према Kakkar & Lee, 2008.

Са аспекта биолошких функција, IL-33 је до сада најчешће окарактерисан као епителни цитокин који подстиче развој Th2 имунског одговора (Palmer et al., 2008; Molofsky et al., 2015). Солубилни IL-33 посредује у обољењима у чијој основи је поремећен Th2 одговор попут запаљења дисајних путева, својствен алергијским реакцијама (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Kurowska-Stolarska et al., 2009; Liu et al., 2009; Matsuba-Kitamura et al., 2010) или астми индукованој

антигеном (Sjoberg et al., 2017). Поред тога, истраживања упућују на есенцијалну биолошку улогу једарне локализације IL-33, али и на значај регулације продукције IL-33, односно његовог ослобађања и регулације нивоа овог цитокина у циркулацији (Bessa et al., 2014; Talabot-Ayer et al., 2015). Насупрот патолошком повећању експресије IL-33 у циркулацији, смањење нивоа IL-33 уочено је код кардиоваскуларних обољења уз повећану експресију sST2 рецептора (Miller 2011; Pascual-Figal et al., 2016). Имајући у виду да је данас познато да се ST2L експримира на великом броју различитих типова ћелија биолошка улога IL-33 проширена је и на друге сегменте имунског одговора укључујући одговор на вирусе, микроорганизме али и туморе, као и зарастању рана и фибрози (Cayrol & Girard 2014; Molofsky et al., 2015; Wasmer & Krebs 2016). На ћелијском нивоу подаци указују да IL-33 поред Th2 ћелија снажно стимулише активност ILC2 ћелија (ILC2, од енгл. *Innate Lymphoid Cells group 2*), Т рег ћелија, Th1 ћелија и NK ћелија (Liew et al., 2016), а такође је укључен и у патологију посредовану Th1/Th17 одговором као што су реуматолошка обољења попут реуматоидног артритиса (Xu et al., 2008; Palmer et al., 2009) и инфламаторних обољења коже (Miller 2011). Са друге стране, кључна, примарно протективна, улога IL-33 утврђења је у одржавању хомеостазе гастроинтестиналног тракта (Huang et al., 2007; Wagenaar et al., 2009; Jones et al., 2010; Duan et al., 2012; Schiering et al., 2014). Слично томе, протективна улога IL-33 показана је и на моделу акутне вирусне инфекције јетре (Liang et al., 2013) и атеросклерозе (Miller et al., 2008). С обзиром на плејотропне ефекте IL-33 који се испољавају у регулацији различитих физиолошких и патолошких стања (Liew et al., 2016) IL-33 се данас посматра као цитокин дуалне природе. Својом активношћу IL-33 може да подстиче, али и смањује инфламацију у зависности од ткивног окружења. Уједно IL-33 учествује и у регулацији ткивне хомеостазе и орган-специфичној репарацији ткива (Lopetuso et al., 2012; Molofsky et al., 2015).

У оквиру ткива усне дупље присуство IL-33 је недавно утврђено. У контексту инфламације показано је да бактерија *P. gingivalis* снажно стимулише експресију иРНК за *IL-33* ген у епителним ћелијама гингиве (Tada et al., 2015). Слично томе, код пацијената са упалом десни је детектовано повећање концентрације IL-33 у гингивалној течности (Sağlam et al., 2017), као и код

пацијената са хроничном пародонтопатијом у епителу гингиве захваћеном инфламацијом. Додатно, показана је и повезаност повећане концентracије IL-33 са пародонтопатијом и ресорпцијом алвеоларне кости (**Malcolm et al., 2015, Lapérine et al., 2016**) што указује на вишеструке улоге IL-33 у оралном ткиву. Иако биолошке активности IL-33 у пародонтопатији нису у потпуности разјашњене, сматра се да IL-33 потенцијално у овом обољењу може посредовати као алармин, хемоатрактант и цитокин са системским дејством. Наиме, на месту инфламације ослобођени IL-33 стимулише дегранулацију мастоцита, као и активност других инфламаторних ћелија попут макрофага, еозинофила и базофила. С обзиром да је, као последица бактеријске инфекције, ниво проинфламаторних цитокина веома висок ослобађени инфламаторни медијатори и IL-33, такође индукују активацију остеобласта што доводи до продукције RANKL и смањења нивоа остеопротегрина, односно последичне активације остеокалста. Додатно, моноцити привучени на место инфламације у овом окружењу се такође диференцирају у остеокласте (**da Luz et al., 2014**), те би се главни ефекат IL-33 током пародонтопатије могао посматрати као проинфламаторни. Међутим, упркос овим закључцима, улога IL-33 у оралном ткиву још увек није дефинисана, а с обзиром на широк спектар показаних протективних ефеката IL-33, посебно се намеће питање потенцијалне улоге IL-33 у регенерацији и обнови овог ткива.

1.3.3. МИКРОСРЕДИНА УСНЕ ДУПЉЕ И РЕГУЛАЦИЈА РЕГЕНЕРАТИВНИХ И ИМУНОМОДУЛАТОРНИХ СВОЈСТВА МЕЗЕНХИМСКИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ПЕРИОДОНЦИЈУМА

Инфламаторна обољења потпорног ткива зуба представљају главни узрок губитка зуба код одраслих особа услед нарушавања интегритета периодонцијума, алвеоларне кости, али и корена зуба (**Chen et al., 2012**). Будући да су ПД-ММЋ главне ћелије које учествују у регенерацији ткива периодонцијума и уједно најбољи кандидати за регенерацију потпорног ткива зуба познавање биолошких својстава ПД-ММЋ у условима инфламације представља важан аспект при разматрању њихове примене у регенеративној медицини (**Liu et al., 2014; Sekici et al., 2014; Liu et al., 2017**). Наиме, инфламаторна микросредина значајно утиче

на биолошке карактеристике ПД-ММЋ (**Mao et al., 2016; Liu et al., 2017**), али резултати нису још увек конзистентни. Испитивања својстава ПД-ММЋ изолованих из ткива захваћеног инфламацијом показала су да ове ПД-ММЋ могу имати већу способност пролиферације, али смањену способност диференцијације (**Liu et al., 2017; Tang et al., 2016**).

Насупрот овим подацима, резултати других аутора показују да ПД-ММЋ пацијената оболелих од пародонтопатије поседују мању вијабилност у поређењу са ПД-ММЋ изолованим из здравих донора (**Soheilifar et al., 2016**). Уз то, и имуномодулаторни потенцијал ПД-ММЋ изолованих из ткива захваћеног инфламацијом може бити значајно умањен у поређењу са ПД-ММЋ изолованим из здравих донора (**Liu et al., 2012**). Насупрот овим резултатима, у студији **Li et al., 2014** детектован је сличан имуносупресивни потенцијал ПД-ММЋ изолованих из ткива особа са хроничном пародонтопатијом и ткива здравих донора ПД-ММЋ. Ипак, без обзира на контрадикторне резултате, ова истраживања несумњиво указују на измењен регенеративни и имуномодулаторни потенцијал ПД-ММЋ услед инфламаторног микроокружења.

Како је регулација минерализације важна за ткиво периодонцијума, досадашња истраживања диференцијацијоног потенцијала ПД-ММЋ у инфламаторним условима пре свега су била усмерена на разјашњавање регулације процеса остеогенезе. Инхибиција остеогене диференцијације ПД-ММЋ показана је у условима *in vitro* под утицајем IL-17 (**Okić-Đorđević et al., 2016**), IL-7 (**Jian et al., 2016**), TNF- α (**Tan et al., 2016**), док је ефекат IL-1 β зависан од примењене концентрације (**Mao et al., 2016**). Слично IL-1 β , двојаки ефекти на остеогену диференцијацију ПД-ММЋ запажени су и под утицајем LPS. Смањење остеогеног потенцијала ПД-ММЋ утврђено је у присуству LPS (**Li et al., 2014; Kato et al., 2014**), док LPS стимулише остеогену диференцијацију CD105⁺ субпопулације ћелија периодонцијума (**Albiero et al., 2015**). Са друге стране, следствена истраживања исте групе показала су да иако LPS (*P. gingivalis*) не доводи до промена фенотипа и остеогеног потенцијала ПД-ММЋ, подстиче експресију проинфламаторних цитокина IL-1 β и TNF- α (**Albiero et al., 2017**), односно мења имунски статус ових ћелија.

Испитивања имуномодулаторних својстава ММЋ денталних ткива укључујући и ММЋ изолованих из периодонцијума указују да ове ММЋ поседују изражен имуномодулаторни потенцијал, што је последица учесталог излагања инфламаторним агенсима присутним у усној дупљи (**Wada et al., 2009; Ding et al., 2010; Yamaza et al., 2010; Yamaza et al., 2011**). *In vitro* систем ко-култивације показао је да ПД-ММЋ, као и ММЋ костне сржи, имају способност инхибиције пролиферације алогених и ксеногених МНЋ периферне крви, односно испољавају имуносупресивно дејство (**Kim et al., 2010**). Са друге стране, ПД-ММЋ могу подстицати пролиферацију и преживљавање неутрофила путем секреције IL-6 (**Wang et al., 2017**). Стога, слично ММЋ костне сржи, имуносупресивни потенцијал ПД-ММЋ се не може посматрати као униформан. Осим тога, и у инфламаторним условима имуносупресивни потенцијал ПД-ММЋ је подложен променама. Наиме, показано је да ПД-ММЋ изоловане из здравог ткива испољавају супресивне ефекте на пролиферацију активираних МНЋ периферне крви путем TGF- β , HGF и IDO, док се продукција ових фактора додатно повећава у присуству IFN- γ (**Wada et al., 2009**). Поред IFN- γ показано је да IL-12 може да индукује експресију фактора укључених у имуномодулацију и то на индиректан начин, подстичући секрецију IFN- γ који потом индукује експресију HLA-G и IDO (**Issaranggum Na Ayuthaya et al., 2016**). Такође, утврђено је да LPS индукује генску и протеинску експресију IDO-1 код ПД-ММЋ (**Moon et al., 2013**), као и да стимулише продукцију проинфламаторних цитокина попут IL-1 β , IL-6 и IL-8 (**Kato et al., 2014; Andrukhov et al., 2016**).

Ови резултати указују да и путем секреције важних регулаторних молекула ПД-ММЋ могу доприносити напредовању инфламаторног процеса, те да је модулација њиховог имуномодулаторног потенцијала веома важна у разматрању ових ћелија за терапијске потребе.

2.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

У центру пажње савремених истраживања адултних МЋ данас се пре свега налазе ткива која се могу прикупити минимално инвазивним методама, а истовремено омогућавају велики принос ММЋ. Ове особине посебно су изражене код ММЋ које се могу изоловати из потпорног ткива зуба. Поред тога, студије указују да ПД-ММЋ могу бити погодне за примену у различитим аспектима ћелијске терапије и ткивног инжењеринга. Ипак, својства ПД-ММЋ до сада нису расветљена, а како би се безбедно примењивале у регенеративној медицини потребно је свеобухватно сагледавање њиховог понашања у различитим биолошким условима која одговарају *in vivo* окружењу у одговарајућим модел системима (Zhang et al., 2014; Bansal & Jain 2015; Chen et al., 2016; Iriarte et al., 2017; Chalisserry et al., 2017).

Регенеративна својства ММЋ заснивају се на способности самообнове, као и на њиховом диференцијационом потенцијалу. Осим тога, захваљујући интеракцији са компонентама имунског система и израженом имуномодулаторном деловању, ММЋ и посредно учествују у одржању хомеостазе, као и обнови оштећеног ткива. Бројни фактори утичу на функцијске особине ММЋ, при чему посебну пажњу привлаче фактори присутни у инфламаторној микросредини. Међутим, имајући у виду комплексност имунског одговара ефекти инфламације на ММЋ нису у потпуности разјашњени. Стога је познавање механизма регулације ћелијских функција ММЋ од пресудне важности при разматрању употребе ових ћелија у ћелијској терапији. (Cook & Genever 2013; Machado et al., 2013; Bruna et al., 2016; Gao et al., 2016, Kadle et al., 2018).

Орофацијална ткива, укључујући и ткиво периодонцијума, свакодневно су изложена различитим антигенима спољашње средине што указује на јединствене одлике ових ММЋ. Са аспекта регенеративне медицине посебно је важно познавање понашања ПД-ММЋ у инфламаторној микросредини, будући да до разарања ткива периодонцијума најчешће долази услед пародонтопатије, веома распрострањеног инфламаторног обољења потпорног ткива зуба (Song et al., 2015; Liu et al., 2017). Инфламаторна обољења пародонцијума, уколико се

адекватно не лече, могу довести до губитка зуба које је због оштећења периодонцијума тешко надокнадити и најсавременијим протетским третманима. Поред тога, инфламација поторног ткива представља и честу реакцију након постављања денталних имплантата и може изазвати значајна оштећења ткива и утицати на исход третмана (**Charalampakis et al., 2012; Smeets et al., 2014**). Један од главних узрочника инфламаторних обољења потпорног ткива зуба представља дисбаланс бактерија денталног биофилма. Код пацијената са пародонтопатијом Грам негативне бактерије постају доминантни микроорганизми микробиома зуба, а LPS, једна од главних активних компоненти Грам негативних бактерија, значајан је стимулатор имунског одговора домаћина (**Hajishengallis 2015; How et al., 2016**) Истовремено, LPS утиче и на стромалне ћелије овог ткива укључујући и ПД-ММЋ. Међутим, иако су ови ефекти јако важни за одржање хомеостазе ткива утицај LPS на ПД-ММЋ још увек је нејасан. Са развојем инфламације, LPS може индуковати оштећења и некрозу ћелија и ткива, као и друге патолошка стања која могу бити повезана са ослобађањем различитих фактора у овом региону. Наиме, многобројни фактори присутни на месту потпорног ткива зуба захваћеног инфламацијом могу испољавати проинфламаторне функције и доприносити напредовању запаљенске реакције, али и антиинфламаторне функције модулишући ток и развој инфламаторног одговора (**Cekici et al., 2014; Tomás et al., 2017**). Један од цитокина који се данас описује као цитокин са дуалном улогом је IL-33. Експресија овог цитокина утврђена је у оралном ткиву код пацијената са пародонтопатијом, али његова улога у овом обољењу, као ни његов утицај на ПД-ММЋ нису у потпуности расветљени (**Molofsky et al., 2015; Sağlam et al., 2016**).

У складу са предоченим налазима, како би се разјаснио утицај LPS и IL-33, као фактора присутних у инфламаторној микросредини, на регенеративне и имуномодулаторне функције ПД-ММЋ постављени су следећи

Циљеви истраживања:

1. Испитивање утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом.

2. Испитивање утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са имуномодулаторним потенцијалом.
3. Испитивање утицаја IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом.

Како би се испунили постављени циљеви извођење експеримената је вршено у следећим сегментима:

1. Утврђивање утицаја и механизма деловања LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом:

- анализом вијабилности – одређивање метаболичке активности, пролиферације и ћелијског циклуса;
- анализом имунофенотипа ПД-ММЋ – одређивање експресије мезенхимских и маркера плурипотентности, као и одсуство експресије хематопоеетских маркера;
- праћењем промене диференцијационог потенцијала – одређивање остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације ПД-ММЋ уз одређивање генске експресије диференцијационих маркера (Runx2, ALP, OCN, PPAR- γ , SOX-9);
- анализом миграције – одређивање покретљивости ПД-ММЋ;
- стицање миофибробластног фенотипа – одређивање контрактилности и експресије протеина карактеристичних за миофибробласте код ПД-ММЋ (фибронектин, F-актин, TGF- β , α -SMA, NG-2);
- анализом активације (MAPKs) сигналах путева и учешћа активираних сигналних путева у функцијским променама ПД-ММЋ индукованим присуством LPS.

2. Утврђивање утицаја и механизма деловања LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са имуномодулаторним потенцијалом:

- одређивањем трансендотелске миграције (ТЕМ) МНЋ и ПМЋ.
- одређивањем пролиферативног капацитета МНЋ.
- одређивањем присуства специфичних површинских маркера ћелија лимфоидне и мијелоидне лозе у популацији МНЋ.

- одређивањем респираторног праска ПМЋ.
- одређивањем способности формирања колонија одређених хематопоеетских прогенитора од стране МНЋ периферне крви под утицајем ПД-ММЋ.
- одређивањем експресије маркера специфичних за имуномодулаторне функције ПД-ММЋ.
- анализом активације (MAPKs) сигнала путева и учешћа активираних сигналних путева у функцијским променама ПД-ММЋ индукованим присуством LPS.

3. Утврђивање утицаја и механизма деловања IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом

- анализом вијабилности – одређивање метаболичке активности и пролиферације;
- анализом имунофенотипа ПД-ММЋ – одређивање експресије мезенхимских и маркера плурипотентности, као и одсуство експресије хематопоеетских маркера;
- праћењем промена диференцијационог потенцијала третираних и претретираних ПД-ММЋ – одређивање остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације уз одређивање генске експресије маркера остеогене диференцијације (Runx2, ALP);
- анализом пролиферативне активности ПД-ММЋ током остеогене диференцијације – одређивањем бројности, клоногеног потенцијала и ћелијског старења;
- анализом активације транскрипционих фактора (NF- κ B, β -катенин) и учешћа активираних сигналних путева у функцијским променама индукованим присуством IL-33 код ПД-ММЋ.

3.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1. ХУМАНИ МАТЕРИЈАЛ

3.1.1. МЕЗЕНХИМСКЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

За потребе истраживања спроведених у склопу овог рада изоловане су и коришћене примарне ММЋ пореклом из ткива периодонцијума одраслих особа. Ткива су прикупљана на Одељењу оралне хирургије Стоматолошког факултета Универзитета у Београду од здравих пацијената старости од 18 до 25 година који су из терапеутских или ортодонтских разлога били подвргнути процедури уклањања умњака. Узорковање ткива и следствена истраживања претходно су одобрена уз сагласност Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду и писани пристанак пацијената.

Изолација ПД-ММЋ заснивала се на способности ових ћелија да адхерирају за пластичну површину флашка за култивацију ћелија, односно методу експланта ткива коју су описали Seo и сарадници (2004). Након раздвајања од површине корена зуба, ткиво периодонцијума је уситњавано у асептичним условима стерилном иглом, а комадићи ткива постављани у флашк површине 25 cm² и култивисани у стандардним условима за култивацију ћелија што подразумева 37°C у влажној атмосфери (100%) са 5% CO₂, при чему је као медијум за раст ћелијских култура коришћен DMEM са L-глутамином (од енгл. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, САД), 10% феталног говеђег серума, (FBS, од енгл. *Fetal Bovine Serum*, Capricorn-Scientific, Немачка), HEPES пуфера (Gibco, Thermo Fisher Scientific, САД), 100 U/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина (Gibco, Thermo Fisher Scientific, САД). Сви неопходни раствори при култивацији ћелија су стерилисани пре употребе филтрацијом кроз филтер величине поре 0.2 µm као део стандардне процедуре. Прве адхерентне ћелије уочавале су се након 7 дана и оне су означаване као нулта пасажа (П0). Њихова култивација настављена је до степена субконфлуентности (80-90% покривености површине) када су ћелије испиране са фосфатним, изотоничним пуфером без јона Ca²⁺ и Mg²⁺ (PBS, од енгл. *Phosphate-Buffered Saline*, Capricorn-Scientific, Немачка).

Потом су ћелије одлепљиване инкубирањем у 0.25% раствору трипсина са EDTA (од енгл. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, САД) у трајању од 5 минута на 37°C. Како би се обуставило дејство трипсина додаван је медијум за ћелијске културе са серумом и ћелије центрифугиране 10 минута на 1400 обртаја по минути (опм), након чега је ћелијски талог ресуспендован у медијуму. Укупан број вијабилних ћелија одређиван је бројањем под микроскопом помоћу хемоцитометра (*Neubauerova* комора) након разблаживања ћелијске суспензије 0.4% раствором Трипан плавог (Gibco, Thermo Fisher Scientific, САД). У циљу експанзије ћелија, на основу броја ћелија, ПД-ММЋ су засејаване у флак (1 x 10⁴ ћелија/cm²) при чему су следствене пасаже даље редно нумерисане, док је за извођење експеримената одговарајући број ћелија постављан у стерилне плоче за ћелијску културу. Током култивације медијум је замењиван два пута недељно како би се обезбедиле хранљиве материје и одстраниле неадхерентне ћелије и нечистоће. Изоловане ПД-ММЋ окарактерисане су према критеријумима Међународног друштва за ћелијску терапију (**Dominici et al., 2006**), на основу показане адхезије, присуства специфичног имунофенотипа и способности диференцијације ка три лозе ћелија мезодермалног ткива што је претходно описано (**Miletić et al., 2014**). У свим експериментима коришћене су ћелије пасажа П(2-6) при чему је сваки експеримент понављан најмање три пута.

3.1.2. ЋЕЛИЈЕ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ

У циљу испитивања имуномодулаторних својстава ПД-ММЋ, у одређеним експериментима ПД-ММЋ су ко-култивисане са имунским ћелијама, како мононуклеарним ћелијама (МНЋ), тако и полиморфонуклеарним ћелијама (ПМЋ). Имунске ћелије претходно су изоловане из периферне крви здравих несродних добровољних давалаца на основу густинског градијента сепарационог медијума густине 1.077 g/ml (од енгл. *Lymphocyte Separation Medium*, Capricorn-Scientific, Немачка). Наиме, пуна крв давалаца разблаживана је у PBS раствору у односу 1:1. Тако разблажена, крв је потом наношена на наведени сепарациони медијум и центрифугирана 30 минута на 1400 опм без кочнице на собној температури. Укупне МНЋ издвајане су из интерфазног слоја и испиране од сепарационог

медијума центрифугирањем у RPMI-1640 медијуму (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, САД). За прикупљање ПМЋ, доња фаза у којој се поред ових ћелија налазе и еритроцити инкубирана је 5 минута у изотоничном раствору NH_4Cl (pH 7,2-7,4) који се састојао из 155 mM NH_4Cl , 0.1 mM Na_2EDTA и 10 mM NaHCO_3 . Како би се одстранили лизирани еритроцити ћелијски талог испиран је два пута центрифугирањем у RPMI-1640 медијуму. Након изолације ћелије су ресуспендоване, а њихова концентрација је одређивана бројањем у *Türk* раствору (Superlab, Београд, Србија), док је вијабилитет одређиван бројањем у раствору Трипан плавог. За култивацију имунских ћелија коришћен је RPMI-1640 медијум обогаћен са 10% FBS, 2 mM L-глутамином, 1 mM натријум пируватом, 100 U/ml пеницилина и 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ стрептомицина што је представљало стандардне услове, при чему су изоловане МНЋ засејаване у плоче за културу ћелија са 6 бунара и култивисане током 24h у стандардним условима како би се издвојиле адхерентне ћелије у популацији, односно омогућило да се за извођење експеримената у којима су МНЋ ко-култивисане са ПД-ММЋ користи само неадхерентна фракција ћелија.

3.1.3. ЋЕЛИЈСКЕ ЛИНИЈЕ

Поред примарних култура ћелија у појединим експериментима, коришћена је хумана ендотелска ћелијска линија EA.hy 926 (ATCC/CRL-2922). Ендотелске ћелије су такође култивисане и пасажиране у стандардним условима, при чему је као хранљиви медијум коришћен DMEM са L-глутамином и 10% FBS, HEPES пуфером, 100 U/ml пеницилина и 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ стрептомицина.

3.2. КОРИШЋЕНИ РЕАГЕНСИ

Како би се спровела истраживања обухваћена овим радом употребљени су реагенси који укључују различите биолошки активне факторе, специфичне инхибиторе и антитела, а чији подаци су дати у **Табелама 1, 2 и 3.**

Табела 1. Подаци о коришћеним факторима и инхибиторима

Назив	Произвођач	Дејство
Хумани рекомбинантни ИЛ-33	R&D Systems, САД	Цитокин
LPS (<i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich, САД	Ендотоксин
PNU	Tocris Bioscience, САД	Инхибитор β -катенина
PD98059	Tocris Bioscience, САД	Инхибитор MEK1,2/ERK1,2
PDTC	Tocris Bioscience, САД	Инхибитор NF- κ B
Митомицин Це	Applichem, Немачка	Цитостатик
Фитохемаглутинин (РНА- <i>Phytohemagglutinin</i>)	Life Technologies, САД	Митоген
Форболмириристатна киселина (РМА - <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)	Abcam, САД	Стимулатор протеин киназе Це (ПКС - <i>Protein Kinase C</i>)
Карбоксифлуоресцеин сукцинимидил естар (CFSE)	Affymetrix, Ebioscience, УК	Флуоресцентна боја за ћелије
Пропидијум јодид (PI)	Beckman Coulter, САД	Флуоресцентна боја за нуклеинске киселине
Фалоидин-тетраметилродамин b изотиоцијанат	Sigma-Aldrich, САД	Флуоресцентна боја за F-актин
4',6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI)	Sigma-Aldrich, САД	Флуоресцентна боја за нуклеинске киселине

Табела 2. Подаци о коришћеним антителима. PE- (*phycoerithrin*) фикоеритрин; FITC- флуоресцеин изотиоцијанат. Примена: проточна цитометрија (ПЦ), имунофлуоресцентно обележавање (ИФ), *Western blot* (WB).

Примарна антитела	Порекло	Произвођач	Примена
Анти-хумано CD45-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD105-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD90-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD34-/R-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано HLA-DR-коњуговано FITC	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD44-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD73-коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ
Анти-хумано CD29-коњуговано PE	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
Анти-хумано CD33-коњуговано PE	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
Анти-хумано CD14-коњуговано PE	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
Анти-хумано CD4/CD25-коњуговано FITC/PE	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
Анти-хумано Ki67	зец	Abcam, САД	ПЦ, ИФ
Анти-хумани α -SMA	миш	Santa Cruz Biotechnology, САД	ИФ
Анти-хумани TGF- β	миш	Thermo Fisher Scientific, САД	ИФ
Анти-хумани фибронектин	зец	Santa Cruz Biotechnology, САД	ИФ
Анти-хумани COX-2	зец	Santa Cruz Biotechnology, САД	WB, ИФ
Анти-хумани IL-6	зец	Novus Biologicals, Littleton, САД	WB, ИФ

Табела 2 (Наставак). Подаци о коришћеним антителима. PE- (*phycoerithrin*) фикоеритрин; FITC- флуоресцеин изотиоцијанат. Примена: проточна цитометрија (ПЦ), имунофлуоресцентно обележавање (ИФ), *Western blot* (WB).

Примарна антитела	Порекло	Произвођач	Примена
Анти-хумани NF- κ B	миш	Santa Cruz Biotechnology, САД	WB, ИФ
Анти-хумани β -катенин	миш	Santa Cruz Biotechnology, САД	WB, ИФ
Анти-хумани pERK1,2	зец	R&D systems, САД	WB
Анти-хумани ERK1,2	зец	Santa Cruz Biotechnology, САД	WB
Анти-хумани pр38	зец	R&D systems, САД	WB
Анти-хумани р38	зец	R&D systems, САД	WB
Анти-хумани pJNK	зец	R&D systems, САД	WB
Анти-хумани JNK	зец	R&D systems, САД	WB
Анти-хумани NANOG	миш	Cell Signaling Technology, САД	ИФ
Анти-хумани SOX-2	миш	Cell Signaling Technology, САД	ИФ
Анти-хумани OCT-4	зец	Cell Signaling Technology, САД	ИФ
Анти-хумани α -тубулин	миш	Pierce, САД	WB
Анти-хумани GAPDH	миш	Santa Cruz Biotechnology, САД	WB

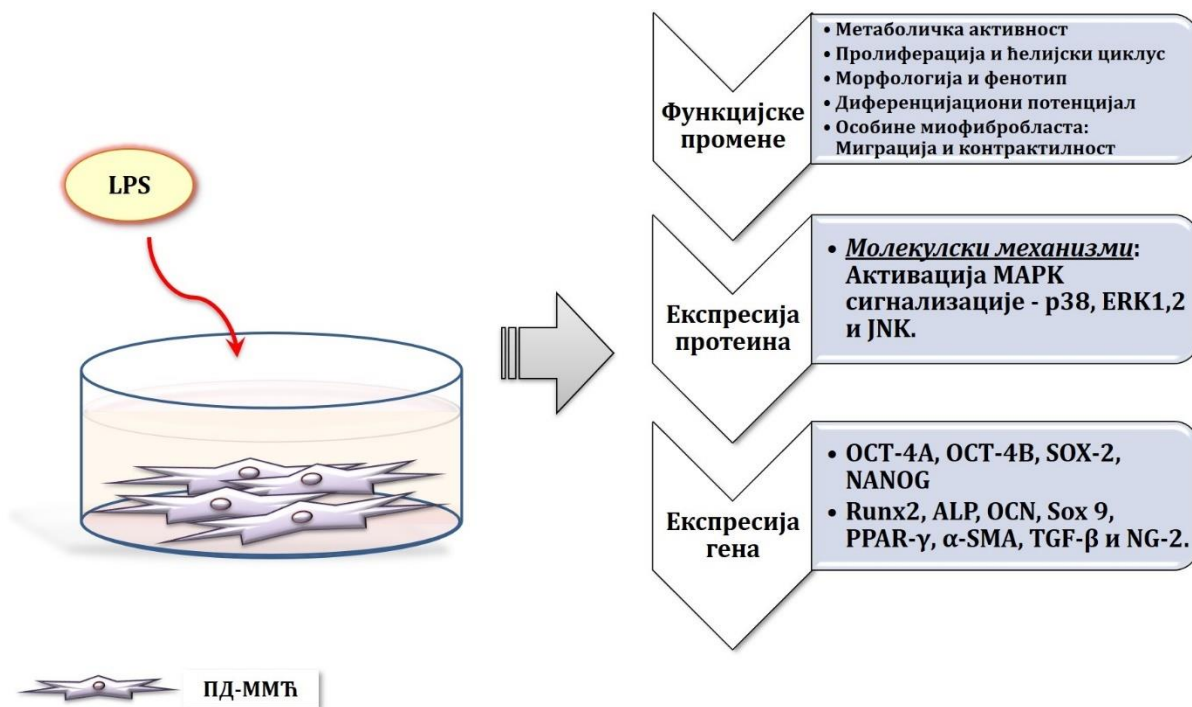
Табела 3. Подаци о коришћеним секундарним антителима и изотипским контролама. HRP- пероксидаза рена, *Horse Raddish Peroxidase*; TRITC-тетраметилродамин-5-(6)-изотиоцијанат; FITC-флуоресцеин изотиоцијанат.

Секундарна антитела	Порекло	Произвођач	Примена
анти-зечије-коњуговано HRP	коза	R&D Systems, САД	WB
анти-мишије-коњуговано HRP	коза	Sigma-Aldrich, САД	WB
анти-зечије-коњуговано TRITC	коза	Sigma-Aldrich, САД	ИФ
анти-зечије-коњуговано FITC	коза	Sigma-Aldrich, САД	ИФ, ПЦ
анти-мишије-коњуговано FITC	коза	BD Biosciences	ПЦ
Изотипске контроле	Порекло	Произвођач	Примена
IgG1- коњуговано PE	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
IgG1- коњуговано FITC	миш	Invitrogen, САД	ПЦ
IgG2A- коњуговано PE	миш	R&D Systems, САД	ПЦ

3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН

3.3.1. Испитивање утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом

У циљу испитивања утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом анализирана су функцијска својства ПД-ММЋ. Применом МТТ теста одређивана је метаболичка активност ПД-ММЋ након третмана са растућим концентрацијама LPS (0, 10, 100 и 1000 ng/ml) током различитих временских интервала (24, 48, 72 и 120h). Пролиферација ПД-ММЋ третираних са LPS (0, 100 и 1000 ng/ml) по истеку 24, 48 и 72h детектована је на основу бојења Трипан плавом бојом, док је ћелијски циклус одређиван проточном цитометријом помоћу бојења ДНК пропидијум јодидом након 48 и 72h третмана са LPS (0, 100 и 1000 ng/ml). Морфолошка и имунофенотипска својства анализирана су након 3 и 7 дана третмана са LPS (1000 ng/ml), при чему је имунофенотип одређиван проточном цитометријом. У циљу анализирања утицаја LPS на диференцијациони потенцијал, ПД-ММЋ су за време индуковане диференцијације ка остеогеној, хондрогеној и адипогеној лози култивисане у присуству LPS (1000 ng/ml). Поред тога, анализирана је миграција, као и контрактилност ових ћелија. Способност миграције ПД-ММЋ испитиван је *Scratch* тестом, док је контрактилност одређивана код ПД-ММЋ засејаваних у колагенски гел по истеку 72h третмана са LPS (1000 ng/ml). Генска експресија молекула укључених у регулацију ћелијских функција повезаних са регенеративним карактеристикама анализирана је након третирања ПД-ММЋ са LPS (1000 ng/ml) током 24h, методом RT-PCR. Анализирана је експресија гена: *OCT-4A*, *OCT-4B*, *SOX-2*, *NANOG*, *Runx2*, *ALP*, *OCN*, *Sox-9*, *PPAR-γ*, *α-SMA*, *TGF-β* и *NG-2*. Одређени део истраживања имао је за циљ утврђивање и молекулских механизма укључених у дејство LPS на ПД-ММЋ. У те сврхе анализа активације MAPK сигнализације, укључујући p38, ERK1,2 и JNK сигналних путева код ПД-ММЋ третираних са LPS (1000 ng/ml) вршена је *Western blot* методом. За испитивање механизма који посредују у ефектима које код ПД-ММЋ индукује LPS укључујући диференцијациони потенцијал и контрактилност у појединим експериментима примењиван је фармаколошки инхибитор ERK1,2 сигналног пута (PD98059).

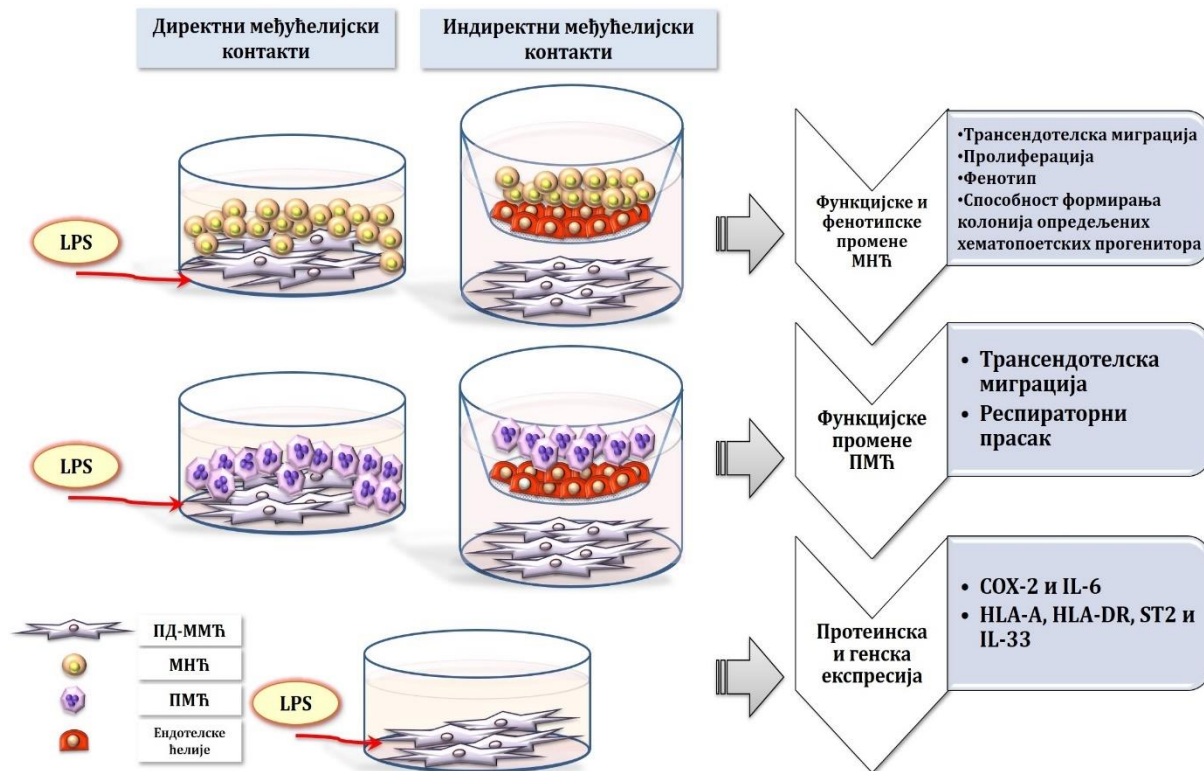


Слика 12. Схематски приказ експерименталног приступа за испитивање утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом.

3.3.2. Испитивање утицаја LPS на имуномодулаторна својства и функције ПД-ММЋ

Како би се испитао утицај LPS на имуномодулаторна својства и функције ПД-ММЋ, анализирани су трансендотелска миграција МНЋ, пролиферативни одговор МНЋ стимулираних митогеном, фенотип МНЋ, као и способност МНЋ да формирају колоније ћелија мијелоидне лозе. Поред тога, праћени су трансендотелска миграција ПМЋ, као и респираторни прасак ових ћелија. За потребе ових експеримената ПД-ММЋ су претретирани са LPS (1000 ng/ml) током 72h, а потом ко-култивисани са изолованим ћелијама периферне крви. Трансендотелска миграција МНЋ (након 48h) и ПМЋ (након 2h) одређивана је применом *transwell* система, на основу праћења проласка ћелија из горњег у доњи део система кроз баријеру формирану од стране ендотелских ћелија. Пролиферација МНЋ детектована је проточном цитометријом након директне ко-култивације ПД-ММЋ и МНЋ стимулираних фитохемаглутинином (РНА, *phytohemagglutinin*). Ниво пролиферације МНЋ мерен је проточном цитометријом

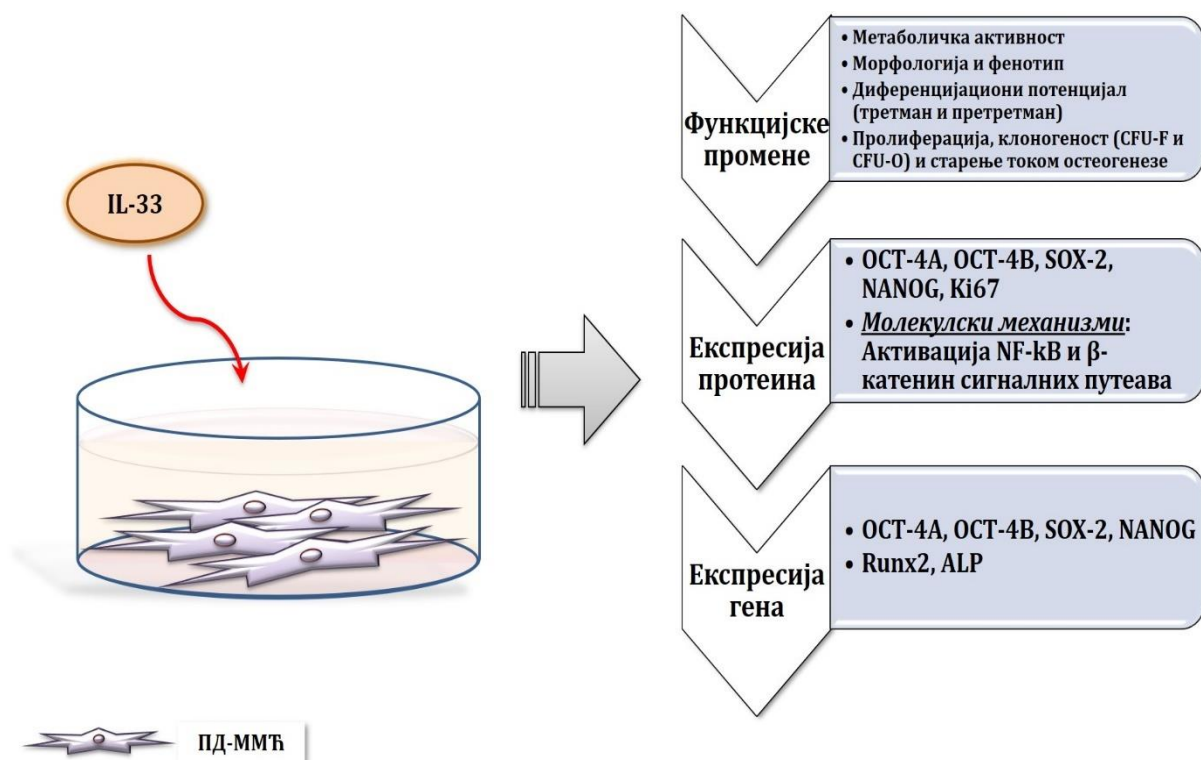
на основу смањења интензитета флуоресценце CFSE- обележених ћелија. Проточном цитометријом одређиван је и фенотип МНЋ, односно заступљеност ћелија које експримирају CD29, CD4, CD4,CD25, CD34, CD45, CD33 и CD14 антигене. Респираторни прасак ПМЋ одређиван је применом теста редукције NBT соли до које долази услед активности ПМЋ. Клоногеност МНЋ праћена је на основу способности формирања колонија одређених хематопоетских прогенитора присутних у популацији МНЋ (CFC тест). Додатно, анализирана је протеинска и генска експресија молекула значајних за имунски статус ПД-ММЋ. На протеинском нивоу, применом *Western blot* метода, анализирана је експресија COX-2 и IL-6 молекула код ПД-ММЋ након 72h третмана са LPS (1000 ng/ml). Генска експресија ових молекула, као и HLA-A, HLA-DR, ST2 и IL-33 молекула анализирана је RT-PCR методом након 24h третмана ПД-ММЋ са LPS (1000 ng/ml) као молекула значајних за имунски статус. У оквиру испитивања механизма који посредују у ефектима које код ПД-ММЋ индукује LPS у појединим експериментима примењиван је фармаколошки инхибитор ERK1,2 сигналног пута (PD98059).



Слика 13. Схематски приказ експерименталног приступа за испитивање утицаја LPS на имуномодулаторна својства и функције ПД-ММЋ

3.3.3. Испитивање утицаја IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом

Утицај IL-33 на ПД-ММЋ анализиран је испитивањем метаболичке активности, морфологије и имунофенотипа, диференцијационог потенцијала и пролиферативне активности ПД-ММЋ. Метаболичка активност ПД-ММЋ третираних растућим концентрацијама IL-33 (10, 20, 50 и 100 ng/ml) утврђивана је МТТ тестом по истеку различитих временских интервала (24, 48, 72 и 120h). Морфолошка и имунофенотипска својства ПД-ММЋ анализирана су након 3 дана третмана са IL-33 (100 ng/ml), при чему је имунофенотип одређиван проточном цитометријом. У сврху утврђивања утицаја IL-33 на диференцијациони потенцијал, ПД-ММЋ су током индуковане диференцијације ка остеогеној, хондрогеној или адипогеној лози култивисане у присуству IL-33 (100 ng/ml). Уз то, анализиран је и диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ након 7 дана третмана са IL-33 (100 ng/ml). Способност пролиферације ПД-ММЋ током остеогене диференцијације анализирана је бројањем ћелија, као и евалуацијом клоногености (CFU-F и CFU-O, од енгл. *Colony Forming Unit-Fibroblast* и *Colony Forming Unit-Osteoblast*) и старења (активност ензима β -галактозидазе). Имунофлуоресцентним обележавањем анализирана је протеинска експресија и локализација маркера плурипотентности укључујући OCT-4, SOX-2 и NANOG, као и маркера ћелијске пролиферације Ki67 након 7 дана третмана са IL-33. У склопу утврђивања молекулских механизма укључених у дејство IL-33 на ПД-ММЋ *Western blot* методом и имунофлуоресцентним обележавањем анализирана је експресија регулаторних протеина NF- κ B и β -катенин, код ПД-ММЋ третираних са IL-33 (100 ng/ml). Експресија гена укључених у регулацију ћелијских функција повезаних са регенеративним карактеристикама: OCT-4A, OCT-4B, SOX-2, NANOG, Runx2 и ALP анализирана је након 24h третмана ПД-ММЋ са IL-33 (100 ng/ml) RT-PCR методом. За испитивање механизма који посредују у ефектима које код ПД-ММЋ индукује IL-33, у појединим експериментима примењивани су фармаколошки инхибитори NF- κ B (PDTC) и β -катенина (PNU).



Слика 14. Схематски приказ експерименталног приступа за испитивање утицаја IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом.

3.4. ПРИМЕЊЕНИ МЕТОДИ

3.4.1. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКИХ ФУНКЦИЈА

3.4.1.1. Испитивање вијабилности ПД-ММЋ

У циљу анализирања утицаја инфламаторних фактора LPS и IL-33 на раст ПД-ММЋ у овом раду испитивани су различити показатељи вијабилности ћелија применом одговарајућих тестова за испитивање метаболичке активности, пролиферације и ћелијског циклуса. Додатно, анализиран је клоногени потенцијал ПД-ММЋ на основу CFU-F теста, као и старење ових ћелија детекцијом експресије ензима β -галактозидазе.

3.4.1.1.1. Одређивање метаболичке активности ПД-ММЋ применом МТТ теста

Као први корак у испитивању раста ПД-ММЋ примењиван је МТТ тест који се заснива на реакцији редукције тетразолијумске соли жуте боје, МТТ (3-(4,5-диметил-тиазол-2ил)-2,5 дифенил-тетразолијум бромид) до формазана, активношћу ензима митохондријалне сукцинат дехидрогеназе, односно ензима метаболички активних, вијабилних ћелија.

За извођење МТТ теста, ПД-ММЋ засејаване су у стандардне плоче за културу ћелија са 96 бунара (1×10^4 ћелија/бунару) и култивисане током 24h како би адхерирале. Након истека одговарајућих третмана, у бунаре је додаван МТТ (Sigma-Aldrich) концентрације 5 mg/ml. После три сата инкубације на 37°C медијум је одстрањен, а настали кристали формазана растварани су додавањем 100 μ l раствора изопропанола (VWR Chemicals, Француска). Оптичка густина мерена је на аутоматском читачу за микротитарске плоче на 540 nm таласне дужине (Labsystems Multiskan PLUS, Финска).

3.4.1.1.2. Одређивање броја ПД-ММЋ применом виталне боје Трипан плаво

На основу праћења промене броја ћелија у односу на почетни, засејани број ћелија, примењивана је витална боја Трипан плаво, те је кроз однос живих и мртвих ћелија утврђивана вијабилност ћелија. За потребе експеримената, ПД-ММЋ засејаване су плоче за културу ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару). По истеку третмана ћелије су одлепљиване помоћу 0,25% трипсина са EDTA, центрифугиране 10 минута на 1400 опм и ресуспендоване у свежем медијуму са FBS. Број вијабилних ћелија у тако добијеној ћелијској суспензији одређиван је бројањем необојених ћелија у раствору 0.4% раствору Трипан плавог.

3.4.1.1.3. Анализа ћелијског циклуса ПД-ММЋ

Као део испитивања вијабилности, ДНК ових ћелија бојена је пропидијум јодидом (PI, од енгл. *Propidium Iodide*, Beckman Coulter, Мајами, САД), неспецифичном виталном флуоресцентном бојом која се везује за нуклеинске киселине.

ПД-ММЋ су засејаване у плоче за културу ћелија са 6 бунара у концентрацији 1×10^5 ћелија/бунару у стандардном медијуму и култивисане до субконфлуентности. Након тога, медијум је замењиван различитим третманом, по чијем истеку су ћелије испиране раствором PBS, одлепљиване помоћу раствора 0,25% трипсина са 1mM EDTA и центрифугиране током 10 минута на 1400 опм. За даљу анализу по 2×10^5 ћелија сваке групе је ресуспендовано у 1 ml раствора PBS и фиксирано са 2 ml апсолутног етанола (Зорка Шабац, Србија) током 15 минута на леду. Потом су ћелије два пута испиране у раствору PBS и затим ресуспендоване у 0,5 ml раствора 0,1% Triton X-100 у раствору PBS (Applichem, Немачка) коме је додат PI у финалној концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$ и рибонуклеаза (*RNase*, Thermo Fisher Scientific, САД) финалне концентрације 0.1 mg/ml како би се спречило везивање PI за РНК. Након 40 минута инкубације на 37°C, вишак боје је одстрањен испирањем ћелија у раствору PBS, да би се на крају ћелије ресуспендовале у PBS раствору и анализирале на проточном цитометру CytoFlow CL (Partec, Münster, Немачка).

3.4.1.1.4. Клоногени потенцијал ПД-ММЋ

Како би се испитао потенцијал стварања колонија ПД-ММЋ примењиван је тест формирања колонија фибробласта, CFU-F тест. У ту сврху ПД-ММЋ засејаване су у стерилне плоче са 24 бунара у концентрацији 100 ћелија/бунару и култивисане у стандардним условима у присуству или одсуству IL-33 (100 ng/ml) у стандардном култивационом медијуму или остеогеном медијуму. Развој колонија анализиран је након 2 недеље од тренутка засејавања. У том тренутку медијум је одстрањен, ћелије испране раствором PBS, фиксирани 5 минута хладним метанолом (Зорка, Шабац, Србија) и обојене 0.1% раствором *Crystal violet* боје (Carlo Erba Reactifs, Француска). Након испирања дестилованом водом колоније су избројане при чему је групација од 50 и више ћелија узимана у обзир као колонија. Ефикасност формирања фибробластних колонија одређивана је на основу процента развијених колонија у односу на укупни број засејаних ћелија у сваком бунару.

Поред тога, у одређеним експериментима, применом CFU-O теста анализирана је способност формирања колонија ћелија са остеогеним потенцијалом. Овај тест се заснивао на утврђивању броја колонија у којима су присутне ћелије које експримирају ензим алкалне фосфатазе (ALP, од енгл. *Alkaline phosphatase*), односно ензим који представља рани маркер остеогене диференцијације. За извођење експеримента ПД-ММЋ засејаване су у стерилне плоче са 24 бунара (100 ћелија/бунару) и култивисане у стандардним условима током 7 дана (**Dimitrieva et al., 2012**), када је у ћелијске културе додат остеогени медијум са или без IL-33 (100 ng/ml). Након 7 дана култивације, ћелије су фиксирани. Како би се анализирано присуство ћелија које експримирају ензим ALP, примењиван је протокол за хистохемијску детекцију овог ензима који је детаљно описан у поглављу 3.3.1.3.1. ALP позитивним колонијама сматране су колоније са присуством бар једне плаво обојене ћелије, док је CFU-O потенцијал утврђен на основу процентуалног односа броја ALP позитивних колонија и укупног броја колонија (CFU-O/CFU-F*100).

3.4.1.1.5. Анализа старења ПД-ММЋ

Испитавање процеса старења, вршено је на основу праћења експресије ензима β -галактозидазе применом комерцијалног сета реагенаса *Senescence Cells Histochemical Kit* (Sigma-Aldrich, САД) водећи се упутством произвођача. Овај тест заснован је на реакцији у којој долази до хидролизе 5-бромо-4-хлоро-3-индол- β -d-галактопиранозидида (X-gal) од стране β -галактозидазе при чему се стварају галактоза и 5-бромо-4-хлоро-3-хидроксииндол. У следственој реакцији долази до димеризације и оксидације 5-бромо-4-хлоро-3-хидроксииндола што резултује у стварању 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго, једињења плаве боје на основу које се детектује експресија β -галактозидазе. Експресија ензима β -галактозидазе праћена је како на нивоу бојења монослоја ћелија, тако и на нивоу појединачних ћелија.

У сврху анализа експресије β -галактозидазе у монослоју ћелија, ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 96 бунара у концентрацији 2×10^3 ћелија/бунару у стандардном медијуму и култивисане до субконфлуентности када је стандардни медијум замењен остеогеним медијумом са или без IL-33 (100 ng/ml), а даља инкубација настављена наредних 7 дана. За испитивање експресије β -галактозидазе у појединачним ћелијама, ПД-ММЋ су по истеку описаног третмана одлепљиване трипсином, затим бројане и засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (2×10^3 ћелија/бунару), а потом су култивисане у стандардним условима још 6 сати како би адхерирале, након чега су ћелије фиксиране. После фиксирања, узорци су бојени за присуство β -галактозидазе, при чему је развој боје трајао током ноћи на собној температури. Наредног дана, боја је одстрањена, а ћелије испране PBS раствором и посматране под светлосним микроскопом. У циљу квантификације, појединачне ћелија које су показивале обојеност за β -галактозидазу су у сваком бунару избројане, а додатно су препарати како појединачних тако и ћелија у монослоју фотографисани на светлосном микроскопу (Olympus, Јапан).

3.4.1.2. Испитивање способности миграције ПД-ММЋ

У циљу испитивања утицаја LPS на миграторни капацитет ПД-ММЋ примењиван је дводимензиони тест миграције (*Scratch test*). Наиме, у плоче за културу ћелија са 24 бунара засејаване су ПД-ММЋ (3×10^4 ћелија/бунару) и култивисане у стандардним условима до постизања конфлуентности када је врхом стерилног наставка за пипете повлачена линија по средини дна бунара. На тај начин, оделпљивањем ћелија на површини монослоја ћелија формирана је огреботина, а како би се уклониле преостале неадхерентне ћелије, бунари су испирани раствором PBS. Затим су ћелије третиране са LPS (10, 100 и 1000 ng/ml), док је за контролну групу примењиван свеж стандардни медијум са 10% FBS. Одмах по додавању одговарајућих медијума ћелије су сликане под инвертним микроскопом како би се забележила почетна ширина огреботине, односно празног простора (на почетку мерења, нулто време (T_0)). Миграција је обустављана након 72h инкубације када су ћелије фиксиране хладним метанолом. Након бојења 0,3% раствором *Crystal violet* боје, ћелијске културе су поново сликане на светлосном микроскопу, а добијени резултати обрађивани су у програму TScratch (Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich, Швајцарска) како би се одредила процентуална прекривеност огреботине ћелијама, односно показало смањење празног простора настало услед миграције ћелија.

3.4.1.3. Испитивање способности диференцијације ПД-ММЋ

Способност диференцијације ММЋ ка три ћелијске лозе (остегеној, хондрогеној и адипогеној) испитивана је у условима *in vitro* при чему су ПД-ММЋ засејаване у плоче за културу ћелија и култивисане у стандардним условима до постизања субконфлуентности, када је стандардни медијум замењиван медијумом за индукцију сваког типа диференцијације. У сврху детекције адипогенезе ћелије су у одређеним експериментима додатно култивисане и на стакленим љуспицама. Степен диференцијације одређиван је одговарајућом методом за сваки тип диференцијације.

3.4.1.3.1. Остеогена диференцијација ПД-ММЋ

Како би се ПД-ММЋ усмериле ка остеогеној диференцијацији у ћелијске културе додаван је медијум који је поред стандардог медијума са 5% FBS садржао дексаметазон (10 nM, Applichem), 50 μ M аскорбинску киселину (Sigma-Aldrich) и 10 mM β - глицерофосфат (Sigma-Aldrich).

Након 7 дана, рана остеогена диференцијација одређивана је на основу активности ензима алкалне фосфатазе (ALP). Детекција овог ензима вршена је на основу колориметријске анализе, као и на основу хистохемијског бојења. Ћелије су по истеку третмана фиксирани у 3,7% формалину разблаженом у 90% метанолу, након чега су испиране у PBS раствору. Потом је одређивана ензимска активност додавањем безбојног раствора *p*- нитрофенил фосфата (*p*-NPP, од енгл. *para-Nitrophenylphosphate*) (Sigma-Aldrich) финалне концентрације 1 mg/ml. Услед активности ALP долази до хидролизе *p*-NPP и стварања *p*-нитрофенола чија је оптичка густина одређивана на аутоматском читачу за микротитарске плоче и то на 405 nm таласне дужине (Labsystems Multiskan PLUS, Финска). По испирању PBS раствором, ћелије су хистохемијски бојене применом раствора који се састојао из смеше 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BCIP, од енгл. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt*, Sigma-Aldrich) и тетразолијумске соли (NBT, од енгл., *Nitro Blue Tetrazolium Salt*, Sigma-Aldrich). У присуству ALP позитивних ћелија BCIP се хидролизује што доводи до стварања интермедијарног једињења чијом димеризацијом се ослобађају јони водоника, који у даљој реакцији редукују NBT, што за последицу има стварање нерастворног NBT-формаза плаве боје. На овај начин, на основу плаве боје које се развија у свакој ћелији омогућено је визуелно детектовање степена остеогене диференцијације које је додатно квантификовано и применом Image J (НИН, САД) програма.

Као касна крајња фаза остеогенезе, испитивана је способност минерализације, односно способност депоновања јона калцијума у ванћелијски матрикс. Након две недеље, ћелије су фиксирани и потом бојени Ализарин црвеном бојом (Riedel de Haen, Хановер, Немачка) у трајању од 30 минута на собној температури, а која се везује за калцијум присутан у ванћелијском матриксу. Степен минерализације детектован је визуелно, посматрањем под

светлосним микроскопом, док је за квантификацију примењиван Image J (НИН, САД) програм.

3.4.1.3.2. Хондрогена диференцијација ПД-ММЋ

Хондрогена диференцијација ПД-ММЋ индукована је применом медијума који је уз стандардни медијум са 5% FBS садржао и 2 ng/ml TGF- β 1 (TGF- β , R and D Systems, Минеаполис, САД), 10 nM дексаметазон (Aplichem), 50 μ M аскорбинску киселину (Sigma-Aldrich). У овом медијуму ћелије су култивисане у стандардним условима током две недеље када је диференцијација обустављана фиксирањем у 3,7% формалину разблаженом у 90% метанола. Потом је монослој ћелија хистохемијски бојен Сафранин О бојом (Merck, Darmstadt, Немачка) којом се детектују протеоглигани специфични за ванћелијски матрикс ткива хрскавице. Ћелије су посматране под светлосним микроскопом, а степен диференцијације квантификован је применом Image J (НИН, САД) програма.

3.4.1.3.3. Адипогена диференцијација ПД-ММЋ

При индукцији адипогене диференцијације ПД-ММЋ коришћен је медијум који се састојао из стандардног медијума са 5% FBS обогаћеног са 1 μ M дексаметазона, 100 μ g/ml изобутил-метилксантина (IBMX, од енгл. *Isobutylmethylxanthine*, Sigma-Aldrich) и 10 μ g/ml инсулина (Sigma-Aldrich). Након култивације у периоду од 4 недеље у стандардним условима, ћелије су фиксиране у раствору 3,7% формалина и 90% метанола. Детекција унутарћелијских липидних капљица, карактеристичних за адипоците, вршена бојењем *Oil Red O* бојом (Merck, Darmstadt, Немачка) које су потом посматране под светлосним микроскопом. Додатно, липидне капљице детектоване су и применом флуоресцентне *Nile red* боје (Santa Cruz Biotechnology, САД). По истеку третмана, ћелије су фиксиране и бојене раствором *Nile red* боје (0.05 μ g/ml), при чему је инкубација трајала током 30 минута на собној температури. Ћелије су испиране PBS раствором, а тако припремљене ћелије монтиране су на предметна стакла уз помоћ медијума припремљеног за имунофлуоресценцу. *Nile red* је лиофилна боја која се везује за унутарћелијске липидне капљице и њеном применом омогућена је визуализација

адипогене диференцијације под епифлуоресцентним микроскопом (Olympus, Јапан).

3.4.1.3.4. Тест контрактилности ПД-ММЋ

За потребе теста контрактилности припремана је суспензија ПД-ММЋ (5×10^5 ћелија/ml) у раствору колагена који се састојао из 40% колагена изолованог из репа пацова концентрације 3,5 mg/ml, 5 пута концентрованог DMEM раствора, 10% FBS, 10% NaHCO₃ и 2% воде за ињекције. Тако припремана суспензија ћелија засејавана је у плоче за културе ћелија са 48 бунара (200 μ l/бунару) чија је површина дна претходно облагана са 3% BSA/PBS током 1h на 4°C. Ћелијске културе остављане су у инкубатору у стандарним условима култивације током 2h у циљу полимеризације колагена, да би се након тога третирали. Стерилним наставком за пипете је одвајан слој колагена од бочних страна бунара, а степен смањења површине колагена, као показатељ контрактилности, анализиран је након 72h третмана и квантификован применом Image J (NIH, САД) програма. Као негативна контрола коришћен је сам колаген без ћелија, док су ћелије култивисане у колагену у присуству TGF- β (10 ng/ml) представљале позитивну контролу.

3.4.1.4. Испитивање имуномодулаторног капацитета ПД-ММЋ

3.4.1.4.1. Анализа трансендотелске миграције имунских ћелија у transwell систему

Као део имуномодулаторних функција, испитивана је у условима *in vitro* миграција имунских ћелија кроз монослој ендотелских ћелија. У ту сврху примењиван је систем култивације ћелија у два нивоа, означен као *transwell* систем, односно модификовани тест који су претходно описали **Bryant et al., 2012**. Наиме, ПД-ММЋ засејаване су у плоче за култивацију ћелија са 24 бунара (2×10^4 ћелија/бунару) што је представљало доњи део *transwell* система. Са друге стране, ендотелске ћелије (EA.hy 926 ћелијска линија) су засебно засејаване на

мембрану горњег дела *transwell* система у концентрацији 5×10^3 ћелија. Мембрана је претходно облагана слојем фибронектина ($10 \mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) и потом испирана 70% етанолом и раствором 3% BSA у PBS раствору. Величина поре мембране износила је $8 \mu\text{m}$. Након третмана ПД-ММЋ са LPS (1000 ng/ml) и/или PD98059 ($25 \mu\text{M}$) у трајању од 72h и достизања конфлуентности ендотелских ћелија, горњи део *transwell* система је постављен изнад бунара у којима су се налазиле ПД-ММЋ, а заједно са додатим МНЋ (1×10^6 ћелија/бунару) или ПМЋ (1×10^6 ћелија/бунару). *Transwell* системи у коме су култивисане само ПД-ММЋ представљали су контролну групу. Ћелије су ко-култивисане у RPMI-1640 медијуму са 10% FBS. Трансендотелска миграција МНЋ одређивана је након 48h, а пролазак ПМЋ након 2h када су ћелије које су мигрирале у доњи део *transwell* система фотографисане и избројане. За одређивање броја ћелија које су мигрирале употребљиван је стандардни раствор Трипан плавог.

3.4.1.4.2. Анализа пролиферативног капацитета МНЋ

Испитивање пролиферације МНЋ утврђивано је на основу уграђивања флуоресцентне боје означене као карбокси-флуоресцеин диацетат сукцинимидил естар (CFSE, од енгл. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Affymetrix, Ebioscience, УК) методом проточне цитометрије. Овај реагенс се преко сукцинил група ковалентно везује за унутарћелијске молекуле што обезбеђује задржавање ове боје у ћелијама током дужег временског периода, односно праћење пролиферације у реалном времену. Наиме, након сваке деобе обојених ћелија боја унутар ћелије се подједнако дели на ћерке ћелије, те је смањење интензитета флуоресценце које се читава на проточном цитометру директно сразмерно броју деоба, односно пролиферацији испитиваних ћелија (Lyons & Parish., 1994; Parish et al., 2009; Quah et al., 2007). Применом одговарајућег антитела као специфичног маркера одређене популације МНЋ, детектована је пролиферација дате популације у оквиру испитиваних МНЋ.

За потребе експеримента ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културе ћелија са 24 бунара (5×10^4 ћелија/бунару) и претретиране са LPS (1000 ng/ml) и/или PD98059 ($25 \mu\text{M}$) током 72h. Након завршеног третмана, ПД-ММЋ су испиране PBS

раствором и инкубирани током 30 минута митомицином Це финалне концентрације 25 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich) како би се обуставила даља пролиферација ПД-ММЋ, односно обезбедио однос броја ПД-ММЋ и МНЋ. Потом су у ћелијске културе додаване свеже изоловане алогене МНЋ, у односу 1:10 (ПД-ММЋ:МНЋ), које су претходно обојене CFSE бојом.

За извођење бојења, МНЋ су инкубирани у PBS раствору са 5% FBS и CFSE бојом финалне концентрације 5 μM током 15 минута у мраку. Бојење је потом обустављено инкубирањем ћелијске суспензије у 5 пута већој запремини хладног PBS раствора са 5% FBS у трајању од 5 минута и следственим центрифугирањем током 10 минута на 1800 опм у истом раствору. Тако припремљене МНЋ су у концентрацији 5×10^5 ћелија по бунару у 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS додате у ћелијске културе са ПД-ММЋ. Као контролна група коришћене су МНЋ култивисане у одсуству ПД-ММЋ. За стимулацију пролиферације МНЋ у одређеним групама коришћен је фитохемаглутинин (РНА, од енгл. *Phytohemagglutinin*, Life Technologies, САД) у концентрацији од 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Кокултивација овако постављених ћелија је трајала 5 дана након чега су МНЋ прикупљане и два пута испиране центрифугирањем током 10 минута на 1800 опм у PBS раствору са 5% FBS. Анализа степена флуоресценције вршена је помоћу проточног цитометра Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, САД), при чему је просечан број деоба свих ћелија из почетне популације, односно индекс деобе израчунаван на основу протокола који су описали *Parish* и *Warren* 2002. године. Како би се одредио степен неспецифичног интензитета флуоресценције CFSE боје коришћене су небојене МНЋ.

3.4.1.4.3. Анализа респираторног праска ПМЋ

Утицај ПД-ММЋ на респираторни прасак ПМЋ испитиван је применом теста редукције NBT соли до које долази услед присуства O_2 , који се продукује током реакције респираторног праска, односно активношћу ензима NADPH оксидазе који је у великој мери присутан у ПМЋ (**Schopf et al., 1984; Dahlgren et al., 2007**). За овај тест ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 96 бунара (2000 ћелија/бунару), култивисане до субконфлуентности и третиране са

LPS (1000 ng/ml) током 72h. По истеку третмана ПД-ММЋ су испране PBS раствором, како би им се додали свеже изоловани ПМЋ (1×10^5 ћелија/бунару) у RPMI-1640 медијуму, са или без PMA у концентрацији 2 $\mu\text{g/ml}$ као стимулатора активности ПМЋ. Ко-култивација тако постављених ћелија трајала је наредна 3h у стандардним условима када је у ћелијске културе додавано 10 μl по бунару NBT (5 mg/ml). Процес редукције NBT обустављен је додавањем 100 μl раствора 10% SDS закишељеног са 1 N HCl, при чему је растварање добијене боје настављено преко ноћи у стандардним условима за култивацију ћелија на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ и релативном влажношћу 100%. Наредног дана на аутоматском читачу за микротитарске плоче (Labsystem Multiskan PLUS, Финска) читавана је оптичка густина на 540 nm таласне дужине.

3.4.1.4.4. Анализа способности формирања колонија хематопоетских ћелија од стране МНЋ периферне крви

У циљу испитивања способности формирања колонија опредељених хематопоетских прогенитора МНЋ периферне крви након ко-култивације са ПД-ММЋ, примењиван је тест којим се одређују ћелије које формирају колоније (CFC, од енгл. *Colony Forming Cell*). Овај метод подразумева *in vitro* култивацију хематопоетских ћелија у полуврстом медијуму на бази метилцелулозе обогаћене одговарајућим цитокинима. Приликом извођења експеримената коришћен је комерцијално доступан полуврсти медијум (*Methocult HC4434*, Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада). У основи овог медијума налази се метилцелулоза у IMDM медијуму са FBS (IMDM, од енгл. *Iscove's modified Dulbecco's medium*). У састав овог медијума улазе и рекомбинантни цитокини укључујући рекомбинантни хумани (rh) SCF (од енгл. *Stem Cell Factor*) у концентрацији 50 ng/ml, rh IL-3 у концентрацији 10 ng/ml, rh еритропоетин (EPO) у концентрацији 3 U/ml и rh GM-CSF (од енгл. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) у концентрацији од 10 ng/ml, као и албумини говеђег серума, β -меркаптоетанол. Како свака колонија настаје кроз процесе пролиферације и диференцијације, број формираних колонија хематопоетских ћелија указује на број потенцијалних хематопоетских претходника присутних у почетној ћелијској суспензији.

За извођење експеримената ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и култивисане у присуству LPS (1000 ng/ml) и/или PD98059 (25 μ M) у култури ћелија током 72h. По истеку претретмана, ПД-ММЋ су испиране PBS раствором, а у ћелијске културе су додаване МНЋ (1×10^6 ћелија/бунару) како би однос ПД-ММЋ и МНЋ износио (1:10). Тако постављене ћелије ко-култивисане су наредних 5 дана у RPMI-1640 медијуму са 10% FBS. Као контролна група коришћени су МНЋ култивисани у одсуству ПД-ММЋ. Након ко-култивације, МНЋ су прикупљане, испиране у PBS раствору центрифугирањем 10 минута на 1400 опм и потом бројане у раствору Трипан плавог. На основу добијеног броја МНЋ су засејаване у трипликату у полуврсти медијум на бази метилцелулозе, H4434, у концентрацији 1×10^5 ћелија/ml и култивисане у стандардним условима у наредних 14 дана након чега је анализиран укупан број формираних колонија (CFU), укључујући број гранулоцито-макрофагних (CFU-GM, од енгл. *Colony-Forming Unit Granulocyte-Macrophage*), гранулоцитних (CFU-G, од енгл. *Colony-Forming Unit Granulocyte*), макрофагних (CFU-GM, од енгл. *Colony-Forming Unit Granulocyte-Macrophage*) и гранулоцито-еритроцито-моноцито-мегакариоцитних (CFU-GEMM, од енгл. *Colony-Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megacaryocyte*) колонија.

3.4.2. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКИХ ПРОТЕИНА

У оквиру овог рада експресија специфичних протеина анализирана је применом одговарајућих антитела назначених у **Табелама 2** и **3** при чему су примењени методи обележавања протеина у нативном облику помоћу имунофлуоресцентног обележавања ћелија, као и детектовање протеина у ћелијским лизатима *Western blot* методом.

3.4.2.1. Имунофлуоресцентно обележавање ћелија

За потребе анализирања имунофенотипа ПД-ММЋ и МНЋ, као и утврђивања експресије и локализације специфичних протеина присутних у ћелијама примењиване су методи, како директног, тако и индиректног флуоресцентног обележавања при чему је флуоресценца анализирана помоћу проточне цитометрије или епифлуоресцентног микроскопа (Olympus, Јапан).

3.4.2.1.1. Анализа површинских антигена

Како би се методом директне имунофлуоресценце анализирала експресија мембранских протеина, ПД-ММЋ ћелије су засејаване у плоче за култивацију ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и култивисане у стандардним условима до постизања субконфлуентности, када су третиране. Као контролна група коришћене су ћелије култивисане без фактора. Након одговарајућих третмана ћелије су одлепљиване применом 1 mM EDTA како се не би нарушила структура анализираних протеина и потом центрифугиране 10 минута на 1400 опм како би се испрале. У тако добијеној суспензији одређивана је концентрација ћелија стандардним бојењем раствором Трипан плавог, при чему је за даљу анализу одвајано по 2×10^5 ћелија по сваком примењеном антителу. Поред тога, за потребе појединих експеримената проточном цитометријом, анализирана је експресија одређених маркера присутних на површини МНЋ. У циљу спречавања неспецифичног везивања антитела, ћелије у суспензијама су даље инкубиране у PBS раствору са 0,5% говеђег албумина серума (BSA од енгл. *Bovine Serum Albumine*, Sigma-Aldrich) током 10 минута на собној температури. Након

прикупљања, ПД-ММЋ су обележаване примарним моноклонским мишјим анти-хуманим антителима за CD44H, CD90, CD105, CD73, CD29, HLA-DR, док су МНЋ обележаване са примарним моноклонским мишјим анти-хуманим антителима за CD29, CD33, CD34, CD45, CD14 и CD4/CD25 коњугованим са PE или FITC флуоресцентним маркерима (**Табела 2.**) током 30 минута у мраку на 37°C. Вишак антитела је потом одстрањен центрифугирањем током 10 минута на 1400 опм у PBS раствору, а ћелије даље ресуспендоване у 0,5 ml PBS раствора и анализиране на проточном цитометру.

3.4.2.1.2. Анализа унутарћелијских антигена индиректном имунофлуоресценцом

Испитивање експресије маркера пролиферације Ki67 проточном цитометријом. ПД-ММЋ засејаване су у плоче за култивацију ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и култивисане до постизања субконфлуентности када је стандардни медијум замењен остеогеним са или без IL-33 (100 ng/ml), а даља култивација настављена током наредних 7 дана, при чему су као контрола коришћене нетретирани ћелије. По завршетку третмана, ћелије су одлепљиване трипсином, центрифугиране 10 минута на 1400 опм како би се испрале, а након одређивања концентрације ћелија, из суспензије је одвајано по 2×10^5 ћелија за даљу анализу. Припремљене ћелије су затим испиране у PBS раствору, уз центрифугирање 10 минута на 1400 опм и фиксиране у 5% формалдехиду током 15 минута на собној температури. У наставку, узорци су испирани у хладном раствору 0,5% BSA у PBS раствору центрифугирањем 10 минута на 1400 опм и пермеабелизовани током 30 минута на леду у раствору који је поред 0,5% BSA у PBS раствору садржао и 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). После пермеабелизације, ћелије су испиране два пута центрифугирањем 10 минута на 1400 опм, када су ћелије остављане у раствору 0,5% BSA у PBS раствору током 15 минута на собној температури како би се блокирало неспецифично везивање протеина. У следећем кораку узорцима је додавано примарно моноклонско зечије анти-хумано анти-Ki67 антитело (**Табела 2.**) које је инкубирано 2h на собној температури, након чега је остатак невезаних примарних антитела испиран

центрифугирањем 10 минута на 1400 опм у PBS раствору са 0,5% BSA. Затим су узорци инкубирани са секундарним анти-зечијим FITC коњугованим антителом (**Табела 3.**) током наредних сат времена на собној температури. У последњем кораку ћелије су испирани у PBS раствору са 0,5% BSA и ресуспендоване у 0,5 ml PBS раствора и анализирани на проточном цитометру. Поред проточне цитометрије, за анализу експресије и локализације Ki67 коришћен је и епифлуоресцентни микроскоп, а ћелије су припремане као што је описано у наредном делу.

У овим анализама коришћени су апарати за проточну цитометрију Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, САД) и CytoFlow CL (Partec, Münster, Немачка), док су добијени подаци анализирани и представљени помоћу WinMDI 2.9 softvera (J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, САД), а како би се одредио степен неспецифичног везивања антитела као изотипске контроле коришћена су одговарајућа FITC или PE коњугована антитела приказана у **Табели 3.**

Испитивање експресије и локализације протеина епифлуоресцентним микроскопом. За извођење индиректне имунофлуоресценце ПД-ММЋ засејаване су на стаклене љуспице (5×10^3 ћелија по љуспици) и култивисане у стандардним условима неколико сати како би адхерирале за подлогу, након чега је у културе додаван стандардни медијум, а наредног дана су ћелије третиране. После одговарајућег периода третман је обустављен фиксирањем ћелија у 4% параформалдехиду (Superlab, Београд, Србија). Како би се омогућило детектовање унутарћелијских протеина, мембране ћелија су пермеабелизоване раствором 0,1% Triton X-100 у PBS раствору током 5 минута, након чега је инкубацијом од 30 минута у PBS раствору са 1% BSA блокирано неспецифично везивање протеина. Потом су ћелије инкубирани 2h на собној температури са одговарајућим примарним антителима (**Табела 2.**). Вишак невезаних примарних антитела одстрањен је испирањем у PBS раствору, а потом су ћелије инкубирани са одговарајућим секундарним антителима коњугованим TRITC или FITC флуоресцентним бојама (**Табела 3.**) током 1h на собној температури у мраку. У раствор секундарних антитела додавана је боја 4',6-диамидин-2-фенилиндољ (DAPI, Sigma Aldrich) финалне концентрације 0,1 $\mu\text{g/ml}$ како би се детектовала

једра ћелија. У последњем кораку ћелије су испиране са PBS раствором и дестилованом водом, а љуспице постављене на предметна стакла тако да се између слоја ћелија и предметног стакла налази претходно нанет медијум за монтирање узорака припремљеног за имунофлуоресценцу. Експресија испитиваних протеина анализирана је и фотографисана помоћу епифлуоресцентног микроскопа (Olympus, Јапан).

3.4.2.2. Анализа ћелијских протеина применом *Western blot* метода

3.4.2.2.1. Изолација укупних ћелијских протеина

Како би се обезбедила довољна количина протеина за анализу ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културе ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и култивисане у стандардним условима до достигања субконфлуентности када су третиране. По истеку третмана медијум је одстрањен, а ћелијске културе су испиране PBS раствором. У циљу изоловања цитосолних и мембрански-везаних протеина примењен је пуфер означен као RIPA пуфер (од енгл. *RadiolImmunoPrecipitation Assay*) који се састојао из 0.5% Triton X, 1% нејонског детерџента NP-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS (од енгл. *Sodium Dodecyl Sulphate*, Serva Electrophoresis, Немачка), 2 mM EDTA и 50 mM NaF растворених у PBS, при чему су непосредно пре лизирања ПД-ММЋ у RIPA пуфер додавани инхибитори протеаза укључујући: 1 mM Na- ортованадат као инхибитор тирозинских фосфатаза, PMSF (100 mM) инхибитор серинских протеаза, E-ACA (1 M), као и комерцијални коктељ инхибитора протеаза (Thermo Fisher Scientific, САД). Цео поступак изолације протеина извођен је на леду инкубирањем ћелија у 300 μ l свеже припреманог пуфера за лизирање током 30 минута. Сакупљени узорци центрифугирани су 25 минута на 11200 опм на температури од 4°C. Тако добијени супернатанти раздељени на запремине од 60 μ l и чувани на -70°C до анализе, док су талози одстрањивани.

3.4.2.2.2. Одређивање концентрације протеина ћелијских лизата

За потребе одређивања концентрација укупних протеина у изолованим ћелијским лизатима примењиван је комерцијални *BCA* тест (од енгл. *Bicinchoninic Acid*, Serva Electrophoresis), у чијој основи се налази биуретска реакција током које у присуству протеина долази до редукције јона Cu^{2+} у Cu^+ . Потом долази до хелације формираних јона бакра са молекулима бицинхонинске киселине, што за последицу има стварање продукта љубичасте боје, која је директно сразмерна укупној количини протеина, а чији интензитет је утврђиван колориметријски, мерењем апсорбанце на 540 nm таласне дужине. Водећи се упутством произвођача, у микротирарске плоче са 96 бунара равног дна, у сваки бунар додавано је по 100 μl *BCA* радног реагенса, а потом по 5 μl узорака након чега је плоча инкубирана 30 минута у мраку на 37°C , када је развијање боје обустављано и читавана апсорбанца. Концентрација изолованих протеина одређивана је у односу на стандардну криву која је конструисана на основу вредности апсорбанци добијених за серију раствора познате концентрације у распону од 0 до 2 mg/ml, при чему је за припрему тог раствора коришћен *BSA* растворен у *RIPA* пуферу.

3.4.2.2.3. Електрофореза на полиакриламидном гелу (SDS PAGE)

У циљу раздвајања протеина присутних у изолованим ћелијским лизатима, извођена је електрофореза на полиакриламидном гелу у присуству *SDS* детерџента (*SDS PAGE*, од енгл. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) која омогућава раздвајање денатурираних протеина на основу њихове релативне молекулске масе. Стога су, непосредно пре електрофорезе изоловани протеини мешани са Лемли пуфером за припрему узорака (pH 6,8) који се састојао из 0,125 М *Tris-HCl*, 4% *SDS*, 20% глицерола, 0,2 М *DTT* и 0,02% бромфенол плавог у односу 3:4, и прокувани 5 минута у кључалој води како би се извршила денатурација. Припремљени узорци протеина потом су наливани на двофазни систем акриламидног гела дебљине 1,5 mm који се састојао из 4% гела за концентровање и 10% гела за раздвајање. Електрофоретско раздвајање протеина спровођено је у Hoefer miniVE систему за вертикалну електрофорезу

(Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Шведска) у редукујућим условима при константној струји од 150 mA током 2h. По завршеном раздвајању, протеини су са гелова преношени на нитроцелулозну мембрану величине пора 0,45 μm или PVDF мембрану пора величине 0,2 μm (од енгл. *Polyvinylidene difluoride*, Applichem), применом полусувог електротрансфера при струји јачине 100 mA у току 1h и 30 минута. Како би се активирала PVDF мембрана, пре самог трансфера мембране су потапане у метанол. Као контролни узорак коришћен је протеински маркер који подразумева смешу протеина познате молекулске масе (PageRuler plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Трансфер протеина на нитроцелулозну мембрану провераван је бојењем у 0,5% Ponso S раствору током 1 минута, а неспецифично везивање за протеине се огледа у појави црвено обојених протеинских трака.

3.4.2.2.4. Имуноблот

Након трансфера, мембране су испирани неколико пута дестилованом водом и потом инкубиране 1h на собној температури у 4% млеку раствореном у пуферу означеном као TBS-Tween, који се састојао од 0,5% Tween-20 (Sigma-Aldrich) у TBS пуферу (од енгл. *Tris-Buffered Saline*), како би спречило неспецифично везивање протеина за мембрану и истовремено испрале мембране од Ponso S боје. У случају коришћења PVDF мембране блокирање је извођено директно након трансфера у истом пуферу. У следећем кораку мембране су инкубиране са примарним антителима (**Табела 2.**) у 4% млеку раствореном у TBS-Tween пуферу преко ноћи на 4°C. Наредног дана вишак примарног антитела на мембранама испиран је у TBS-Tween пуферу (три пута по 10 минута), а затим су мембране инкубиране са одговарајућим секундарним антителом коњугованим ензимом HRP (од енгл. *Horse Raddish Peroxidase*) у трајању од 2h на собној температури (**Табела 3.**). Вишак секундарног антитела одстрањен је испирањем у TBS-Tween пуферу (три пута по 10 минута), док је при последњем испирању у трајању од 5 минута коришћен TBS. Како би се извршила визуелизација обележених протеина, на овако припремљене мембране наносен је раствор који садржи реагенс за појачану хемилуминисценцију, а у коме се налази супстрат

ензима пероксидазе - луминол (Serva Electrophoresis) и водоник пероксид. Том приликом, активношћу ензима пероксидазе долази до ослобађања електрона који се преносе на ауторадиографски филм (Santa Cruz Biotechnology, САД) на коме се након испирања у развијачу, а потом и фиксиру, омогућава детекција специфичних протеинских трака. Анализа оптичке густине протеинских трака вршена је помоћу програма Total Lab v1.1 software (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Шведска).

У одређеним експериментима анализирани су различити протеини присутни на истој мембрани. У ту сврху су претходно везана примарна и секундарна антитела одређене специфичности уклањана поступком који је подразумевао инкубацију мембрана током 30 минута на 60°C у пуферу који се састојао из 62,5 mM Tris-HCl, 100 mM β - меркаптоетанола и 2% SDS (pH 6.8). Потом, мембране су испиране у TBS-Tween пуферу пет пута по 10 минута, да би се понављањем процедуре имуноблота уз примену одговарајућих специфичних антитела одређивало присуство другог протеина.

3.4.3. АНАЛИЗА ГЕНСКЕ ЕКСПРЕСИЈЕ

У склопу овог рада промена експресије гена праћена је на нивоу анализе информационе РНК (иРНК), при чему је специфична генска експресија утврђивана након изолације укупне иРНК из ћелија, и на основу које је продукована комплементарна ДНК (кДНК), да би се потом у реакцији ланчаног умножавања (PCR, од енгл. *Polymerase Chain Reaction*) применом специфичних прајмера умножавали гени од интереса.

3.4.3.1. Изолација укупне РНК

Поступак изолације укупне РНК извођен је у стерилним условима при чему је стандардни протокол подразумевао употребу специфичне пластике без рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза (од енгл. Dnase/Rnase- free) како би се спречила контаминација и деградација узорака. За извођење експеримента, ПД-

ММЋ засејаване су у плоче за култивацију ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и култивисане у стандардним условима до достизања субконфлуентности када су у стандардном медијуму третиране током 24h. По завршетку третмана ћелије су испиране PBS раствором, а потом је у ћелијске културе додаван хладан, комерцијално доступан, реагенс за изолацију РНК TRIzol (Thermo Fisher Scientific, SAD) (1 ml/ бунару), чија је инкубација трајала 5 минута на собној температури. Како би се обезбедила потпуна лиза ћелије су мешане, након чега је тако добијена смеша пребацивана у тубице од 1,5 ml. Припремљеним узорцима потом је додавано по 0,2 ml хлороформа (VWR Chemicals, Француска), а после снажног мешања у трајању од 15 секунди узорци су инкубирани 10 минута на собној температури. У следећем кораку узорци су центрифугирани током 15 минута на 4°C на 12000 g како би се омогућило раздвајање смеше у три фазе које укључују: доњу, црвену фенол-хлороформ фазу у којој се налазе протеини и липиди; белу, интерфазу која се састоји из ДНК; и горњу водену фазу која садржи РНК. Пажљивим пипетирањем, једнаке запремине водене фазе пребациване су у нове тубице, да би се поступак изолације РНК наставио додавањем 500 μl изопропанола и центрифугирањем (20 минута, 12000 g, 4°C) како би се извршила преципитација РНК. Након центрифугирања, по одливању изопропанола, РНК је растварана у 75% етанолу, а узорци поново центрифугирани у трајању од 8 минута на 4°C при 12000 g. У последњем кораку изолације РНК, течна фаза узорака је пажљиво одстрањивана, како би испарио сав етанол. Тако осушен талог РНК растваран је у 20 μl дестиловане воде третиране са DEPC регенсом који инактивира рибонуклеазе (DEPC, од енгл. *Diethyl pyrocarbonate*) (Thermo Fisher Scientific), чиме се спречава деградација РНК молекула. Након одређивања концентрација РНК помоћу UltroSpec 3300pro спектрофотометра (Amersham Bioscience, Шведска), узорци су чувани на -70°C .

3.4.3.2. Реверзна транскрипција

Како би се анализирала експримираност гена, фракција укупне РНК, иРНК, превођена је у комплементарну ДНК применом комерцијалног кита за реверзну транскрипцију (*RevertAid™ Hminus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Life Science, САД) и употребом олиго dT прајмера, при чему је реакција извођена у термоблоку *Mastercycler personal* апарата (Eppendorf, Немачка). Водећи се упутством произвођача припремана је смеша која се састојала из РНК узорка (2 µg), олиго dT прајмера (1 µl) и дестиловане воде без нуклеаза до укупне запремине од 12,5 µl. Ова смеша је током 5 минута инкубирана на 65°C како би се омогућило везивање олиго dT прајмера за poliA крај иРНК. У следећем циклусу температура реакције снижена је на 25°C током 5 минута, када је узорцима додавана основна смеша која се састојала од: 5 пута концентрованог пуфера за реверзну транскрипцију, *RevertAid* реверзне транскриптазе, смеше дезоксирибонуклеотида (dNTP микс) и инхибитора рибонуклеазе. Припремљени узорци у наставку реакције инкубирани су током 60 минута на температури од 42° С да би се обезбедила оптимална активност реверзне транскриптазе, а затим 10 минута на 70°C како би се реакција обуставила. Овим путем синтетисана је ДНК комплементарна молекулу иРНК (кДНК), док су узорци чувани на 40°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

3.4.3.3. Реакција ланчаног умножавања (PCR)

У циљу добијања довољног броја копија жељених гена извођена је реакција ланчаног умножавања (PCR) коришћењем одговарајућих прајмера за специфичне секвенце кДНК у одговарајућем температурном програму. При реакцији припремана је смеша која се састојала из 1 µl сваког узорка кДНК (200 ng), по 1 µl одговарајућег пара прајмера (Invitrogen) комплементарних кодирајућем (*sens*) и некодирајућем (*antisens*) ланцу ДНК (**Табела 4.**), 10,5 µl воде без нуклеаза (Thermo Fisher Scientific) и 12,5 µl 2 пута концентроване главне смеше која садржи *Taq* ДНК полимеразу, дезоксирибонуклеотиде и пуфер за PCR са MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific). Припремљени узорци су у термоблоку *Mastercycler personal* апарата у

првом кораку (фаза инцијације) излагани температури од 94°C током 5 минута, како би се обезбедила потпуна денатурација молекула ДНК. Потом је програм умножавања подразумевао пролазак кДНК кроз серију циклуса, при чему је број циклуса ланчаних реакција прилагођен типу прајмера који је коришћен, односно гену од интереса. У оквиру сваког циклуса кДНК је раздвајана на 94°C током 45 секунди у фази денатурације, затим је спуштањем температуре на 50°C у следећој фази која траје 30 секунди на температури 50°C (односно температури прилагођеној гену од интереса) обезбеђено везивања прајмера за ланац ДНК, да би се у последњем кораку у фази елонгације на температури од 72°C у трајању од 90 секунди омогућила синтеза ДНК помоћу *Taq* ДНК полимеразе. Специфичне секвенце прајмера и одговарајуће температуре потребне за везивање прајмера приказане су у **Табели 4**. По завршетку свих циклуса, финална фаза елонгације је трајала 10 минута на 72°C. Као контрола нивоа експресије амплификованог гена за сваки узорак коришћена је експресија гена за глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназе (GAPDH, од енгл. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), као конститутивно експримираног *housekeeping* гена.

3.4.3.4. Електрофореза и визуелизација PCR продуката

За потребе визуелизације генске експресије умножени PCR продукти раздвајани су агарозном гел електрофорезом, при чему је агароза (1,5%) (Lonza, Базел, Швајцарска) припремана у Трис-ацетатном-EDTA пуферу (ТАЕ, Serva) и растварана кувањем, када је након хлађења додаван етидијум-бромид (Invitrogen, Carlsbad, Калифорнија, САД) у финалној концентрацији 0,01%. Припремљени раствор наливан је у кадице за електрофорезу и затим хлађен на собној температури ради полимеризације. За електрофорезу PCR продукти мешани су са пуфером за наношење на гел који се састојао од раствора глицерола са EDTA и бромфенол плаве боје (*Loading Dye*, Thermo Fisher Scientific). Као контролни узорак коришћен је ДНК маркер који подразумева смешу ДНК фрагмената познате молекулске масе (*Gene Ruler plus Prestained DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific). Након електрофорезе која је извођена на апарату (Biorad, Калифорнија, САД) у ТАЕ пуферу при напону од 100 V и јачини струје од 400 mA у трајању од 40

минута, PCR продукти су детектовани осветљавањем гела UV светлошћу. Позиција и број базних парова (б.п.) добијеног продукта одређивана је на основу поменутог ДНК маркера, а који у себи садржи боју и фрагменте величине од 100 до 1000 б.п. Интензитет усликаног сигнала денситометријски је анализиран помоћу програма TotalLab v1.11 software (Amersham), док је релативна експресија иРНК за специфичне гене одређивана као однос оптичких густина трака добијених за испитиван ген и конститутивно експримиран ген за GAPDH у истом узорку.

Табела 4. Прајмери коришћени за RT-PCR; F - forward прајмер, R - reverse прајмер, б.п. – базни пар.

Ген	5'-3' секвенца	Величина продукта (б.п.)	Температура везивања прајмера (°C)
GADPH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	52
	R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA		
Runx2	F: ATGCTTCATTGCGCTCACAAC	261	55
	R: CCAAAGAAGTTTTGCTGACATGG		
ALP	F: CCCAAAGGCTTCTTCTTG	356	55
	R: CTGGTAGTTGTTGTGAGC		
OCN	F: TCACACTCCTCGCCCTATTGG	300	57
	R: GGGCAAGGGGAAGAGGAAAGA		
Sox-9	F: GAGGAAGTCGGTGAAGAACG	300	47
	R: ATCGAAGGTCTCGATGTTGG		
PPAR-γ	F: GCTGTTATGGGTGAAACTCTG	351	55
	R: ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC		
α-SMA	F: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT	175	52
	R: CCGTGATCTCCTTCTGCATT		
TGF-β	F: GGGACTATCCACCTGCAAGA	239	50
	R: CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG		
NG-2	F: GCTGAGATCAGAAGGGACCA	197	52
	R: GTACA GGA CCCTGCCTGTGT		
HLA-A	F: GACGACACGCAGTTCGTGC	331	49
	R: CATGTCCGCCGCGGTCCAA		

Табела 4 (Наставак). Прајмери коришћени за RT-PCR; F - forward прајмер, R - reverse прајмер, б.п. – базни пар.

Ген	5'-3' секвенца	Величина продукта (б.п.)	Температура везивања прајмера (°C)
HLA-DR	F: CGAGTTCTCTATCTGAATCCTG	644	52
	R: GTTCTGCTGCATTGCTTTTGC		
COX-2	F:CCTTCCTCCTGTGCCTGATG	203	52
	R:CTGGCCCTCGCTTATGATCT		
IL-6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAG	626	52
	R:AGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
ST2	F: TCCCACTCAGGAAAGAA	476	47
	R: CTCCGATTACTGGAAACA		
IL-33	F: CATCTGGTACTCGCTGCCTGTC	298	52
	R: CAACACCGTCACCTGATTCATT		
OCT-4A	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	270	54
	R: GTGAAGTGAGGGCTCCATA		
OCT-4B	F: TATGGGAGCCCTCACTTCAC	194	54
	R: CAAAAACCTGGCACAACCT		
SOX-2	F: ATGGGTTCGGTGGTCAAGT	126	50
	R: GGCGCCGTGGGAGATACATG		
NANOG	F: CTCCATGAACATGCAACCTG	209	54
	R: CTCGCTGATTAGGCTCCAAC		

3.4.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА

Приказани су репрезентативни резултати из најмање три поновљена независна експеримента. Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна грешка (SE, од енгл. *Standard Error*). За поређење средњих вредности је коришћен *Student*-ов *t* тест применом GraphPad Prism програма. Као статистички значајан резултат сматрана је вероватноћа за $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

4.

РЕЗУЛТАТИ

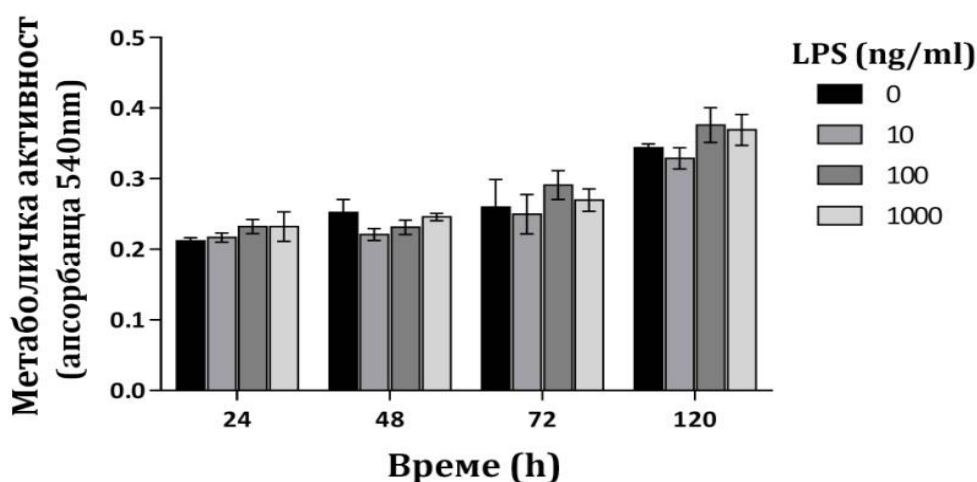
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. УТИЦАЈ LPS НА СВОЈСТВА И ФУНКЦИЈЕ ПД-ММЋ ПОВЕЗАНЕ СА РЕГЕНЕРАТИВНИМ ПОТЕНЦИЈАЛОМ

У склопу испитивања утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом, одређивани су метаболичка активност, пролиферација и ћелијски циклус, имунофенотипска и морфолошка својства, као и диференцијациони потенцијал ових ћелија. Уз то, анализирана је миграција, као и способност стицања својстава миофибробласта. Поред тога, одређени део истраживања имао је за циљ утврђивање и молекулских механизма укључених у дејство LPS на ПД-ММЋ.

4.1.1. УТИЦАЈ LPS НА МЕТАБОЛИЧКУ АКТИВНОСТ ПД-ММЋ

У првом сегменту истраживања испитивана је метаболичка активност ПД-ММЋ под утицајем растућих концентрација LPS током различитих временских интервала применом МТТ теста. На основу резултата наших испитивања показано је да LPS не доводи до промена метаболичке активности ПД-ММЋ, односно не утиче на вијабилност ових ћелија (Слика 15).

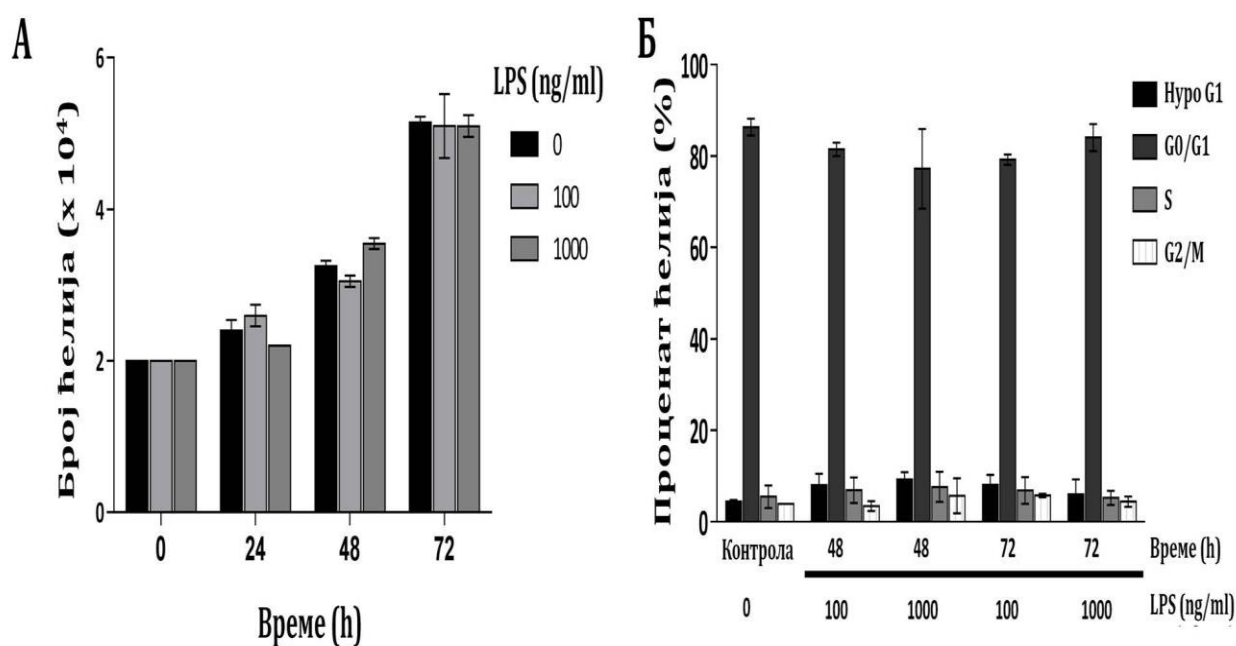


Слика 15. Утицај LPS на метаболичку активност ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (1×10^4 ћелија/бунару) и након 24h третиране са LPS (0, 10, 100 и 1000 ng/ml) током 24, 48, 72 и 120h када је МТТ тестом одређена метаболичка активност ПД-ММЋ. Резултати су приказани као средња вредност оптичких густина \pm SE за најмање три независна експеримента рађена у трипликату.

4.1.2. УТИЦАЈ LPS НА ПРОЛИФЕРАЦИЈУ И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС ПД-ММЋ

Даља анализа вијабилности ПД-ММЋ у присуству LPS, настављена је након одговарајућих третмана одређивањем пролиферације, док је проточном цитометријом, анализиран ћелијски циклус ПД-ММЋ.

Добијени резултати показали су да LPS ни у једној експерименталној групи не модификује пролиферативни капацитет ПД-ММЋ (Слика 16А), а поред тога, након 48 и 72h третмана LPS не утиче на ћелијски циклус ПД-ММЋ, при чему је утврђено да се приближно 80% ћелија налази у G0/G1 фази ћелијског циклуса, док се око 5% ПД-ММЋ налази у S, односно G2/M фази ћелијског циклуса (Слика 16Б).



Слика 16. Утицај LPS на пролиферацију и ћелијски циклус ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 6 бунара (1×10^5 ћелија/бунару) и након 24h третмане са LPS (0, 100 и 1000 ng/ml). (А) Пролиферација ПД-ММЋ одређивана након 24, 48 и 72h третмана на основу бојења ћелија у Трипан плавом раствору. (Б) Ћелијски циклус ПД-ММЋ детектован по истеку 48 и 72h третмана. Проточном цитометријом, на основу бојења ДНК пропидијум јодидом, одређен је проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Резултати су приказани као средња вредност \pm SE за најмање три независна експеримента рађена у трипликату.

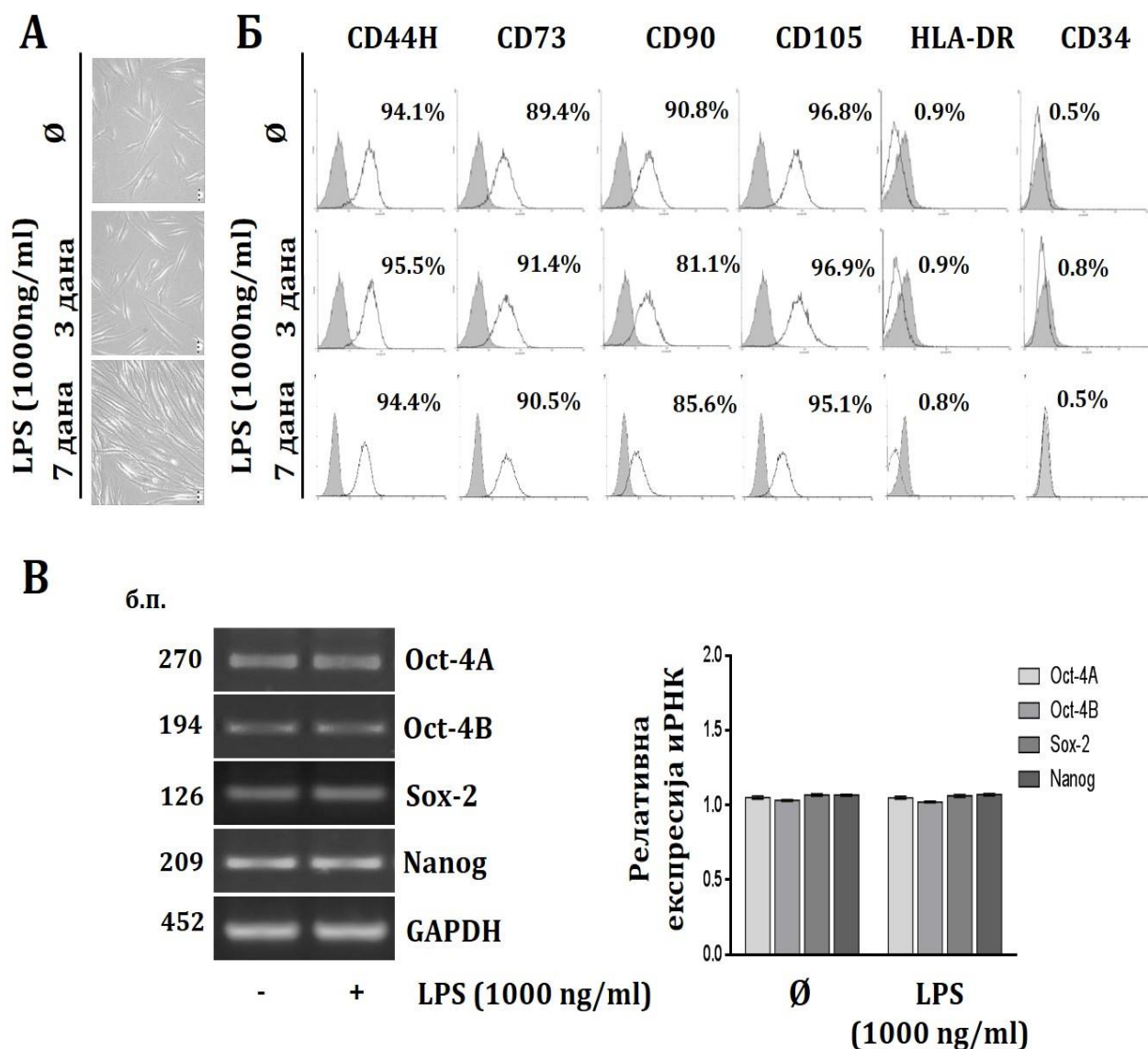
4.1.3. УТИЦАЈ LPS НА МОРФОЛОШКА И ИМУНОФЕНОТИПСКА СВОЈСТВА ПД-ММЋ

У циљу испитивања промене основних ћелијских својстава у присуству LPS, у наставку су анализирани морфолошке и имунофенотипске карактеристике ПД-ММЋ, као и генска експресија маркера плурипотентности (**Слика 17**).

Као што је приказано на **Слици 17А**, ПД-ММЋ третиране са LPS (1000 ng/ml) током краћег (3 дана) и дужег (7 дана) временског интервала задржавају морфологију карактеристичну за ПД-ММЋ, односно ММЋ, а која подразумева вретенаст облик, налик фибробластима.

Присуство сета површинских маркера карактеристичних за ММЋ испитивано је проточном цитометријом, при чему је анализирана експресија CD44H, CD73, CD90 и CD105 као мезенхимских маркера и CD34 и HLA-DR, као хематопоетских маркера. Ефекат LPS (1000 ng/ml) утврђиван је након краће (3 дана) и дуже (7 дана) инкубације, а добијени резултати показују да у свакој експерименталној групи више од 80% третираних ћелија експримира мезенхимске маркере, као и да мање од 1% третираних ћелија експримира маркере карактеристичне за хематопоетске ћелије (**Слика 17Б**) што указује да LPS не модификује имунофенотипске одлике ПД-ММЋ.

Поред тога, на **Слици 17В** приказан је утицај LPS на генску експресију маркера плурипотентности укључујући OCT-4A, OCT-4B, SOX-2 и NANOG. Добијени резултати показују да LPS (1000 ng/ml) не доводи до промена нивоа експресије ових гена код ПД-ММЋ.

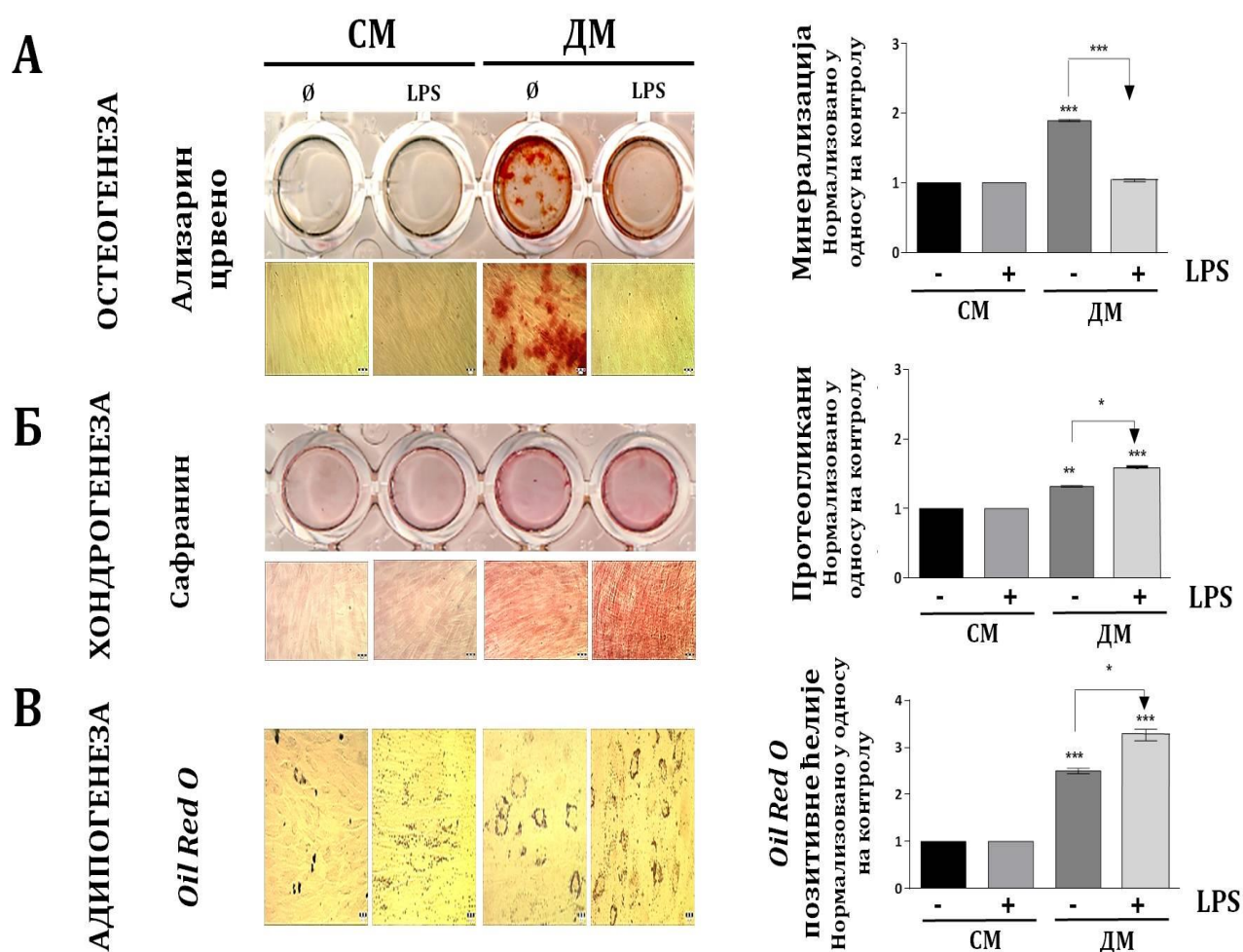


Слика 17. Морфолошка и имунофенотипска својства ПД-ММЋ у присуству LPS. Ћелије су култивисане са или без LPS (1000 ng/ml) у стандардним условима током 3 и 7 дана. За потребе анализирања генске експресије ПД-ММЋ су култивисане у стандарном медијуму током 24h у присуству или одуству LPS (1000 ng/ml). **(А)** Морфологија ПД-ММЋ. Приказане су репрезентативне слике ћелија у култури. Вредност размере износи 50 μ m. **(Б)** Имунофенотипска карактеризација ПД-ММЋ вршена је проточном цитометријом. Репрезентативни хистограми представљају проценат ћелија које експримирају мезенхимске маркере (необојена површина) у односу на одговарајућу изотипску контролу (осенчена површина). **(В)** Генска експресија маркера плурипотентности одређивана је применом RT-PCR. Резултати су представљени као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству LPS), а на графицима су представљени резултати средњих вредности \pm SE три независна експеримента. Приказане су слике репрезентативних гелова, док је величина PCR продуката изражена у броју базних парова (б.п.).

4.1.4. УТИЦАЈ LPS НА ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ ПД-ММЋ

У циљу испитивања диференције, ПД-ММЋ су култивисане у одговарајућим диференцијационим медијумима за остеогену, хондрогену и адипогену диференцијацију. Како би се утврдио утицај LPS на способност индуковане диференцијације ПД-ММЋ култивисане су у присуству LPS (1000 ng/ml).

Резултати приказани на **Слици 18** потврђују способност диференцијације ПД-ММЋ ка три мезодермалне лозе, с обзиром да су примењеним диференцијационим медијумима у условима *in vitro* успешно усмерене ка остеогеној, хондрогеној и адипогеној ћелијској лози, као и да LPS може у значајној мери модификовати диференцијациони потенцијал ових ћелија (**Слика 18**). Наиме, на **Слици 18А** уочава се да LPS статистички значајно инхибира процес минерализације, односно остеогену диференцијацију, у поређењу са нивоом минерализације ПД-ММЋ остварене у одсуству LPS. Са друге стране, **Слика 18Б** показује да LPS статистички значајно стимулише хондрогену диференцијацију повећавајући присуство гликозаминогликана, у односу на ПД-ММЋ култивисане само у хондрогеном медијуму. Уз то, LPS испољава стимулаторни ефекат на адипогенезу с обзиром да се у присуству овог фактора током инкубације ПД-ММЋ у адипогеном медијуму запажа статистички значајно повећање броја ћелија са липидним капљицама карактеристичних за адипоците, у поређењу на бројност липидних капљица ћелија гајених у самом адипогеном медијуму. Поред тога, примећује се и да након култивације у стандардном медијуму у присуству или одсуству LPS не долази до индукције остеогенезе и хондрогенезе. Са друге стране, присуство LPS стимулише стварање липидних капљица код ПД-ММЋ у стандардном медијуму, али се овај резултат није могао квантификовати у нашим условима (**Слика 18В**).

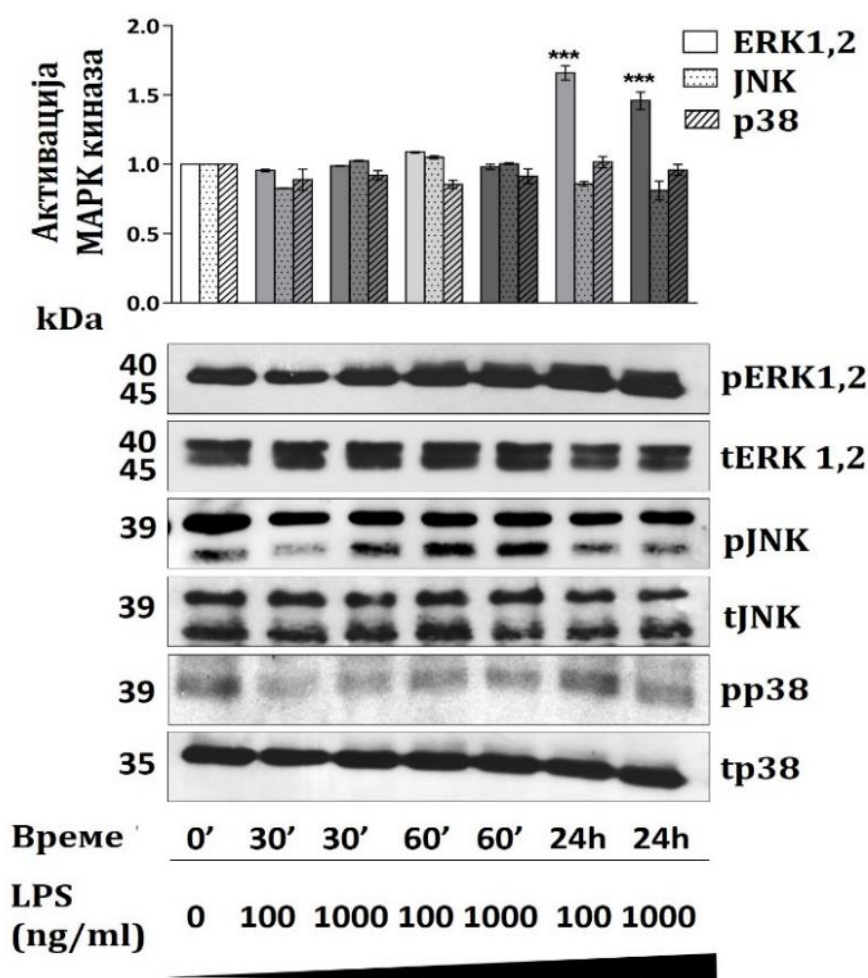


Слика 18. Утицај LPS на потенцијал диференцијације ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (5000 ћелија/бунару) и култивисане до субконфлуентности када је стандардни медијум (CM) замењен медијумом за индукцију сваког типа диференцијације (DM) са или без LPS (1000 ng/ml). (А) Остеогена диференцијација ПД-ММЋ одређивана је на основу минерализације након 14 дана култивације (Ализарин црвено бојење). (Б) Хондрогена диференцијација одређивана је бојењем ПД-ММЋ Сафранином након 2 недеље инкубације у DM. (В) Адипогена диференцијација одређивана је бојењем липидних капљица применом *Oil red O* након 4 недеље култивације ћелија у DM. Приказане су репрезентативне слике ПД-ММЋ у култури. Резултати на графицима представљени су као средња вредност \pm SE три независна експеримента, при чему су вредности нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству LPS). Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.1.5. УТИЦАЈ LPS НА АКТИВАЦИЈУ ERK1,2, JNK И p38 MAPK У ПД-ММЋ

У оквиру испитивања сигналних путева активираних у ПД-ММЋ под утицајем LPS анализирана је активација MAPK сигналних путева.

Како би се утврдила активност MAPK сигналног пута у ПД-ММЋ под утицајем LPS, применом *Western blot* метода у ћелијским лизатима одређивано је присуство укупних и фосфорилисаних, активних форми ERK1,2, JNK и p38 MAPK у ПД-ММЋ. На основу односа експресије фосфорилисаних и укупних форми MAPK, под утицајем LPS у ПД-ММЋ долази до активације ERK1,2 сигнализације, при чему се статистички значајна активација, у поређењу са контролном групом, запажа тек након 24h инкубације са LPS како при концентрацији од 100 ng/ml, тако и при концентрацији од 1000 ng/ml. Са друге стране, у присуству LPS код ПД-ММЋ није показана активација p38 и JNK ни у једној експерименталној групи (**Слика 19**).



Слика 19. Утицај LPS на активацију ERK1,2, JNK и p38 MAPK у ПД-ММЋ. Ћелије су током 30 и 60 минута, као и 24h третиране са LPS (0, 100 и 1000 ng/ml), након чега је у ћелијским лизатима укупних протеина *Western blot* методом одређивана експресија ERK1,2, JNK и p38 MAPK. Резултати су графички представљени као однос фосфорилисаних и укупних форми протеина чије вредности су нормализоване у односу на нетретирану контролу и приказани су као средња вредност \pm SE три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролне ћелије гајене у одсуству LPS према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$. Приказане су слике репрезентативних протеинских трака, док је њихова молекулска маса изражена у kDa.

4.1.6. УЛОГА ERK1,2 У ПРОМЕНИ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ПД-ММЋ ОСТВАРЕНОЈ ДЕЛОВАЊЕМ LPS

Будући да је применом *Western blot* метода претходно показано да под утицајем LPS долази до активације ERK1,2 у ПД-ММЋ (**Слика 19**) следствена истраживања имала су за циљ утврђивање улоге ERK1,2 у LPS-индукованој модулатији диференцијације ПД-ММЋ (**Слика 18**). За потребе ових истраживања ћелије су гајене у диференцијационим медијумима у присуству LPS (1000 ng/ml) и PD98059, специфичног фармаколошког инхибитора MAPK киназе која активира ERK1,2 (MEK/ERK), а степен диференцираности процењиван је након одговарајућег времена инкубације.

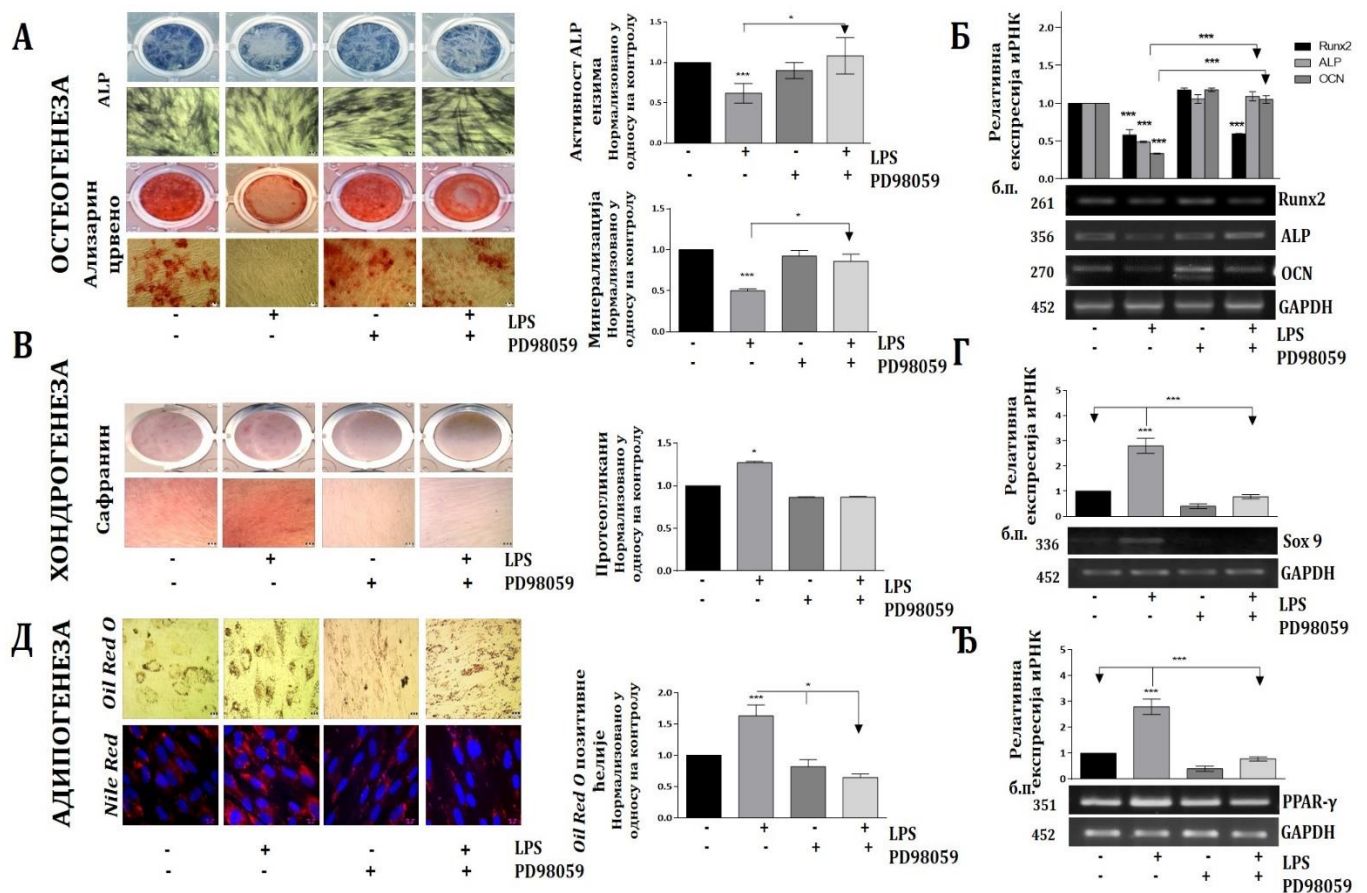
Остеогена диференцијација анализирана је након 7 дана на основу активности алкалне фосфатазе, карактеристичне за рану фазу остеогенезе, а такође и након 14 дана када је применом Ализарин црвене боје праћен ниво минерализације ванћелијског матрикса што је својствено касној фази остеогенезе. Резултати приказани на **Слици 20А** указују да примењени инхибитор, не мењајући ниво остеогене диференцијације у односу на контролну групу, статистички значајно спречава инхибицију остеогенезе коју индукује LPS, како на нивоу ране фазе диференцијације, тако и на нивоу касне фазе остеогене диференцијације. Анализа генске експресије потврђује инхибиторни ефекат LPS на остеогену диференцијацију, при чему се уочава значајно смањење експресије гена специфичних за остеогену диференцијацију укључујући *Runx2*, *ALP* и *Osteocalcin* у односу на експресију ових гена код контролне групе, док примена PD98059 не утиче на експресију ових гена (**Слика 20Б**). PD98059 блокира инхибицију експресије гена за *ALP* и *Osteocalcin* коју индукује LPS, али не спречава смањење експресије *Runx2* и РНК што указује да ERK1,2 не супримира остеогену диференцијацију кроз блокирање експресије транскрипционог факора *Runx2* (**Слика 20Б**).

Са друге стране, када је PD98059 инхибитор примењиван током хондрогене диференцијације, где је претходно утврђен стимулаторни ефекат LPS (**Слика 20Б**), цитохемијско бојење Сафранином показује да сам инхибитор, као и у комбинацији са LPS у мањој мери инхибира хондрогену диференцијацију остварену у присуству хондрогеног медијума (**Слика 20Б**). Ови резултати потврђени су и анализом генске

експресије која је показала да у присуству LPS долази до значајног повећања нивоа иРНК гена специфичног за хондрогену диференцијацију (*Sox-9*) у односу на базалну експримираност у контролној групи, али да присуство PD98059 значајно инхибира експресију *Sox-9*, како базалну тако и експресију стимулисану под утицајем LPS (**Слика 20Г**).

Анализа учешћа ERK1,2 активираних у присуству LPS током адипогене диференцијације показује да примена специфичног инхибитора овог сигналног пута статистички значајно блокира стимулацију адипогене диференцијације коју изазива LPS, док сам инхибитор не доводи до промене нивоа адипогене диференцијације ПД-ММЋ оствареног под утицајем самог адипогеног медијума (**Слика 20Д**). Уз то, генска експресија *PPAR- α* , као маркера адипогене диференцијације, приказана на **Слици 20Ђ** потврђује ефекте испољене на ћелијском нивоу. Наиме, у присуству LPS долази до повећања иРНК за *PPAR- α* , док PD98059 значајно инхибира стимулаторно дејство LPS, при том не мењајући конститутивну експресију *PPAR- α* код ПД-ММЋ (**Слика 20Ђ**).

Приказани резултати указују да модулација диференцијационог потенцијала ПД-ММЋ коју индукује LPS у одређеној мери може бити посредован ERK1,2 сигналним путем.



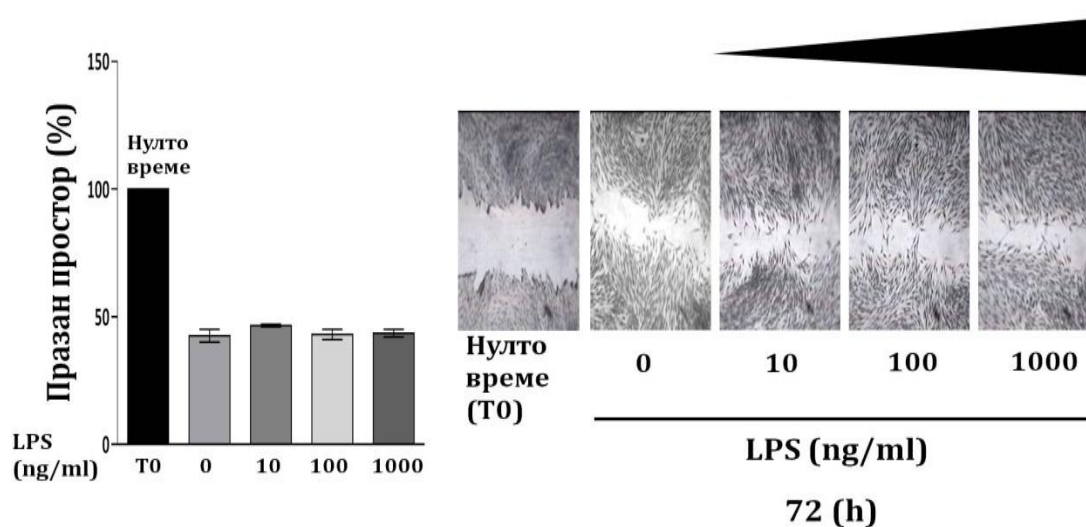
Слика 20. Улога ERK1,2 у модулатији диференцијационог потенцијала ПД-ММЋ остварене деловањем LPS. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (5000 ћелија/бунару) и култивисане до субконфлуентности када је стандардни медијум замењен медијумом за индукцију сваког типа диференцијације (ДМ) са или без LPS (1000 ng/ml) у присуству специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris) у (ДМ). За потребе анализе генске експресије ПД-ММЋ су гајене у стандарном медијуму за култивацију током 24h у одсуству или присуству LPS (1000 ng/ml), са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059. PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. **(А)** Остеогена диференцијација одређивана је на основу активности ALP ензима након 7 дана и на основу минерализације након 14 дана култивације (Ализарин црвено бојење). **(Б)** Генска експресија маркера специфичних за остеогену диференцијацију. **(В)** Хондрогена диференцијација одређивана је бојењем ПД-ММЋ Сафранином након 2 недеље инкубације у ДМ. **(Г)** Генска експресија маркера специфичних за хондрогену диференцијацију. **(Д)** Адипогена диференцијација одређивана је бојењем липидних капљица применом како Oil red O, тако и Nile red боје. **(Ђ)** Генска експресија маркера специфичних за адипогену диференцијацију. Резултати експресије иРНК за специфичне диференцијационе маркере, одређивани применом RT-PCR, представљени су као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Приказане су репрезентативне слике ПД-ММЋ у култури. Резултати на графицима представљени су као средња вредност \pm SE три независна експеримента, при чему су вредности нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству LPS у стандардном медијуму). Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Приказане су слике репрезентативних гелова, док је величина PCR продуката изражена у броју базних парова (б.п.).

4.1.7. УТИЦАЈ LPS И АКТИВИРАНОГ ERK1,2 СИГНАЛНОГ ПУТА У СТИЦАЊУ СВОЈСТАВА МИОФИБРОБЛАСТА ПД-ММЋ

У наредном делу истраживања, анализирана су миграторна својства, контрактилност, као и експресија молекула карактеристичних за миофибробластне ћелије на генском и протеинском нивоу код ПД-ММЋ под утицајем LPS. Додатно, анализирана је улога ERK1,2 сигналног пута као део истраживања који се односио на утврђивање молекулских механизма који се налазе у основи деловања LPS на ПД-ММЋ.

4.1.7.1. Утицај LPS на миграцију ПД-ММЋ

Применом *Scratch* теста испитивана је миграција ПД-ММЋ након 72h култивације у присуству растућих концентрација LPS (0, 10, 100 и 1000 ng/ml), а добијени резултати показали су да иако ПД-ММЋ мигрирају, покривајући приближно 60% почетне површине у поређењу са контролом (површина без ћелија у тренутку T0 или на почетку теста), LPS ни у једној примењеној концентрацији не утиче на ово својство ПД-ММЋ (Слика 21).

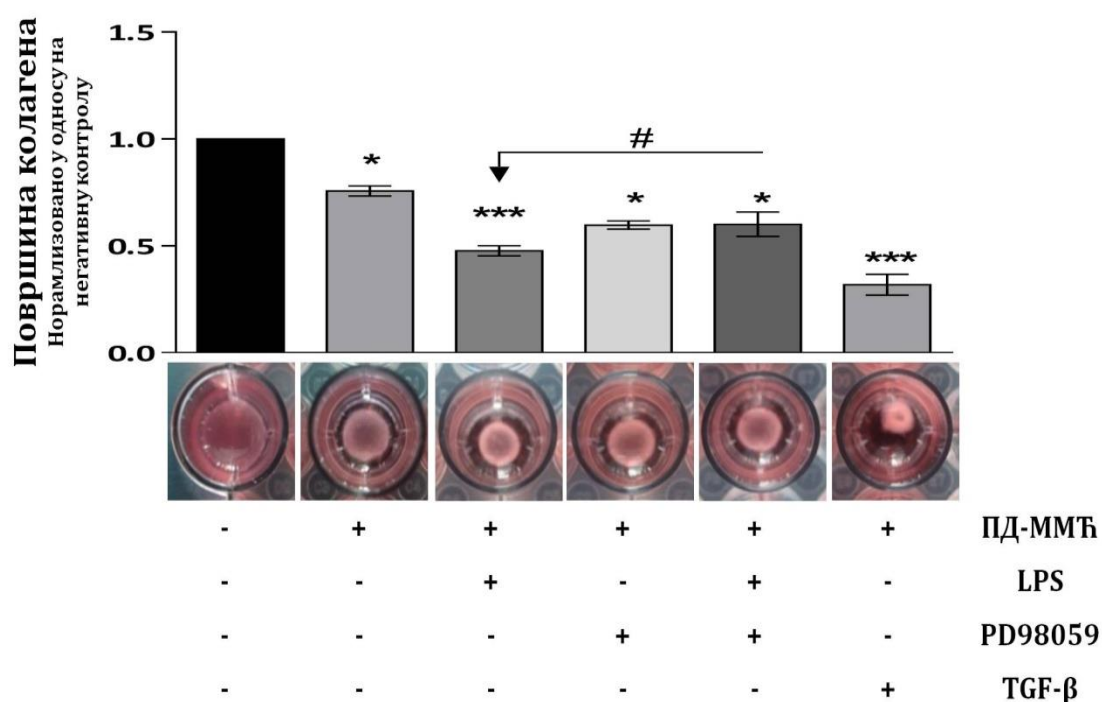


Слика 21. Утицај LPS на миграцију ПД-ММЋ у дводимензионалним *in vitro* условима. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 24 бунара (3×10^4 ћелија/бунару) и култивисане у стандардном медијуму до тренутка достизања конфлуентности када је врхом наставка направљена огреботина у монослоју ћелија (T0), а даља инкубација са LPS (0, 10, 100 и 1000 ng/ml) настављена током наредна 72h. Ниво миграције представљен је као проценат слободне површине у односу на тренутак T0 чија вредност је означена као 100% и приказан као средња вредност \pm SE три независна експеримента. Приказане су репрезентативне слике ћелија. Миграција је документована светлосним микроскопом при увеличању од 400x.

4.1.7.2. Утицај LPS и активираниг ERK1,2 сигналног пута у регулацији контрактилности ПД-ММЋ

Будући да LPS није утицао на миграторни капацитет ПД-ММЋ, даље је испитиван ефекат LPS на контрактилност ПД-ММЋ, као и улога ERK1,2 у овим процесима. Како би се показао ниво контрактилности коришћен је тест у коме су ћелије засејаване у колагену, док су након 72h, по завршетку третмана одговарајућим факторима, детектоване промене у вредности површине колагенског гела, остварене његовим скупљањем. Добијени резултати показују да у поређењу са површином колагена без ћелија, као контролне групе, ПД-ММЋ испољавају базалну способност контрактилности. Уочеава се да LPS (1000 ng/ml) стимулише контрактилност ПД-ММЋ, с обзиром да при овом третману долазо до статистички значајног смањења површине колагена у поређењу са површином колагена без

ћелија. Сличан степен смањења површине колагена и значајност забележени су и у присуству TGF- β (10 ng/ml), који је коришћен као позитивна контрола. Тиме је и потврђен стимулаторни ефекат LPS. Са друге стране, присуство PD98059 (25 μ M) блокира повећање контрактилности које индукује LPS, истовремено не мењајући базални ниво контрактилности ПД-ММЋ (Слика 22). Стога ови резултати указују да LPS-индукована контрактилност ПД-ММЋ може бити посредована ERK 1,2 сигналним путем.



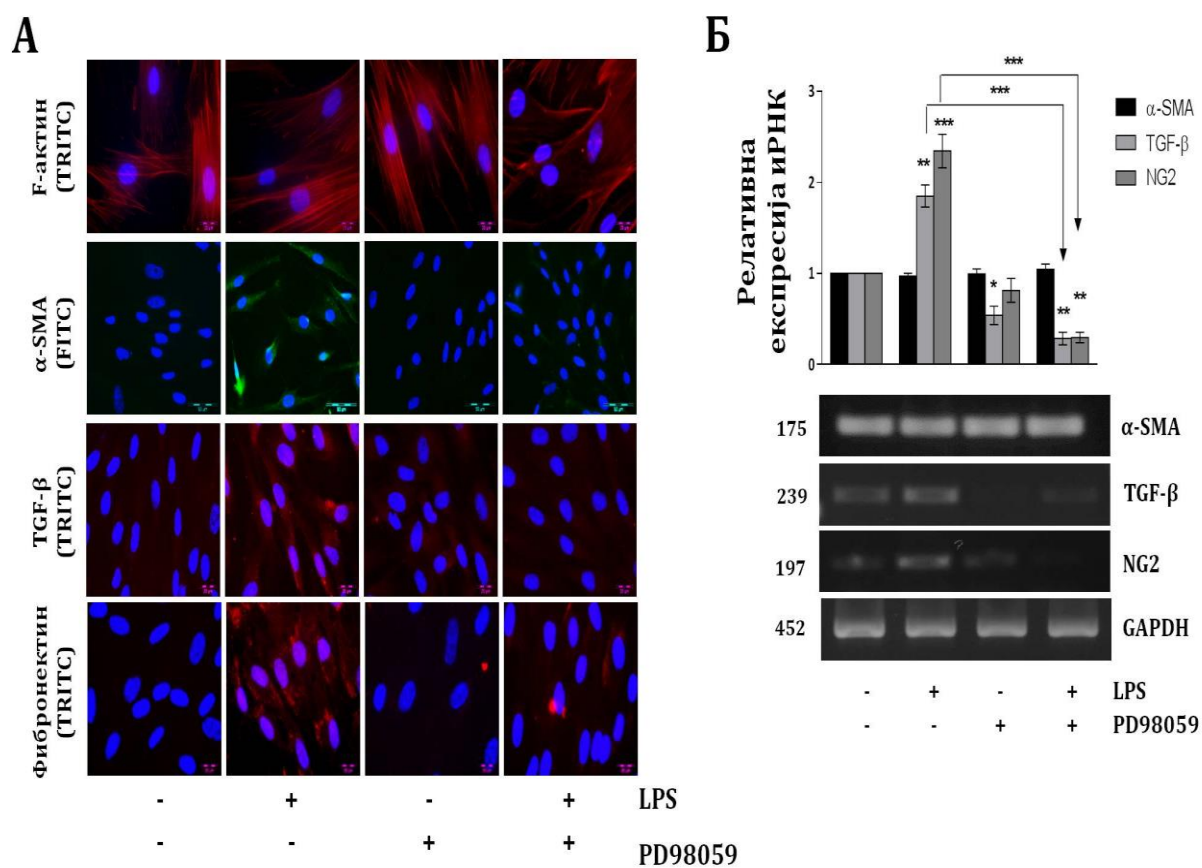
Слика 22. Утицај LPS и активiranог ERK1,2 сигналног пута на контрактилност ПД-ММЋ. Контрактилност ПД-ММЋ одређена је на основу смањивања површине колагена у којем су култивисане ћелије током 72h у одсуству или присуству LPS (1000 ng/ml), са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris). PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. Као позитивна контрола у ћелијске културе додат је TGF- β (10 ng/ml, R&D Systems), док је сам колагенски гел без ћелија представљао негативну контролу. Резултати су представљени у односу на сам колаген чија вредност је означена као 1 и приказани као средња вредност \pm SE три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на негативну контролу (сам колаген) према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; или у односу на ПД-ММЋ третиране са LPS: # $p < 0.05$. Приказане су репрезентативне слике ћелија у култури.

4.1.6.3. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута у регулацији експресије миофибробластних маркера код ПД-ММЋ

Имунофлуоресцентним обележавањем, након 72h третмана са LPS (1000 ng/ml), детектована је протеинска експресија фибронектина, филаментозног (F)-актина, актина глатких мишића (α -SMA) и TGF- β . Као што је приказано на **Слици 23А**, ПД-ММЋ испољавају базалну експресију наведених молекула, док у присуству LPS долази до повећања експресије α -SMA, TGF- β и фибронектина, при чему експресија и организација F-актина остаје неизмењена. Са друге стране, примена PD98059 (25 μ M) доводи до спречавања испољавања ових ефеката LPS на протеинском нивоу.

На генском нивоу анализирана је експресија α -SMA, TGF- β и NG-2 применом RT-PCR. Добијени резултати показали су да на генском нивоу, LPS као и PD98059 не мењају базалну експресију α -SMA. Насупрот томе, у поређењу са контролном групом, експресија TGF- β и NG-2 код ПД-ММЋ статистички значајно је стимулисана у присуству LPS, док PD98059 значајно инхибира базалну и LPS- стимулисану експресију TGF- β и NG-2 (**Слика 23Б**).

Стога, имајући у виду да LPS не модификује миграторни потенцијал ПД-ММЋ, а да са друге стране стимулише контрактилност ПД-ММЋ и експресију миофибробластних маркера, наши резултати указују да LPS може индуковати миофибробластни фенотип код ПД-ММЋ, а додатно ови ефекти могу бити посредовани ERK1,2 сигналним путем.



Слика 23. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута на експресију маркера миофибробласта код ПД-ММЂ. Ћелије су култивисане у стандардном медијуму у одсуству или присуству LPS (1000 ng/ml), са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris). PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. (А) Протеинска експресија маркера миофибробласта одређена имунофлуоресцентним обележавањем након 72h третмана. Ћелије су обележаване примарним антителима за α -SMA, TGF- β и фибронектин и потом инкубиране са одговарајућим FITC- или TRITC- коњугованим (зелено и црвено) антителима, док је F-актин визуелизован фалоидин-тетраметилродамин В-изотиоцијанатом. Једра ћелија обојена су плаво, применом флуоресцентне боје DAPI. Приказане су репрезентативне фотографије ћелија, при чему вредност размере износи 20 μ m. (Б) Експресија миофибробластних маркера одређена применом RT-PCR након 24h третмана. Резултати су представљени су као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству LPS), а на графицима су приказани резултати средњих вредности \pm SE три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Приказане су слике репрезентативних гелова, док је величина PCR продуката изражена у броју базних парова (б.п.).

4.2. УТИЦАЈ LPS НА ИМУНОМОДУЛАТОРНА СВОЈСТВА И ФУНКЦИЈЕ ПД-ММЋ

Испитвање деловања LPS на имуномодуаторни потенцијал ПД-ММЋ, подразумевало је анализу својстава и функција МНЋ и ПМЋ периферне крви. Анализирана је трансендотеска миграција МНЋ и ПМЋ, пролиферативни одговор МНЋ на стимулацију митогеном, фенотип МНЋ, способност МНЋ да формирају колоније ћелија мијелоидне лозе, као и респираторни прасак ПМЋ. Такође, испитивана је и улога ERK1,2 сигналног пута као део анализа које су имале за циљ утврђивање молекуских механизма који се налазе у основи деловања LPS. За потребе ових експеримената

4.2.1. УТИЦАЈ LPS И АКТИВИРАНОГ ERK1,2 СИГНАЛНОГ ПУТА НА СПОСОБНОСТ ПД-ММЋ ДА МОДУЛИШУ ТРАНСЕНДОТЕЛСКУ МИГРАЦИЈУ МНЋ

Привлачење имунских ћелија на место инфламације и пролазак ових ћелија кроз ендотел представљају важне процесе развоја имунског одговора, али и обнове ткива периодонцијума. Стога је у оквиру овог истраживања, као део имуномодулаторних способности ПД-ММЋ, испитивана трансендотелска миграција МНЋ, заједно са експресијом маркера значајних за овај процес, попут CD29 протеина, који учествује у регулацији ћелијске адхезије (**Muller 2011**). У циљу ових анализа успостављен је *in vitro transwell* систем који омогућава праћење проласка ћелија из горњег у доњи део система кроз баријеру формирану од стране ендотелских ћелија.

Након 48h ко-култивације у *transwell* систему одређиван је број МНЋ у доњем делу култивационог система применом Трипан плавог раствора (**Слика 24Б**), а додатно, мигриране ћелије су посматране под светлосним микроскопом и фотографисане (**Слика 24А**). На основу добијених резултата уочава се да присуство самих ПД-ММЋ не утиче на пролазак МНЋ кроз слој ендотелских ћелија у поређењу са контролом која је подразумевала одсуство ПД-ММЋ у доњем делу система. Међутим, услед претретмана ПД-ММЋ са LPS долази до снажне инхибиције миграције МНЋ у односу на контролу, док примена PD98590 статистички значајно

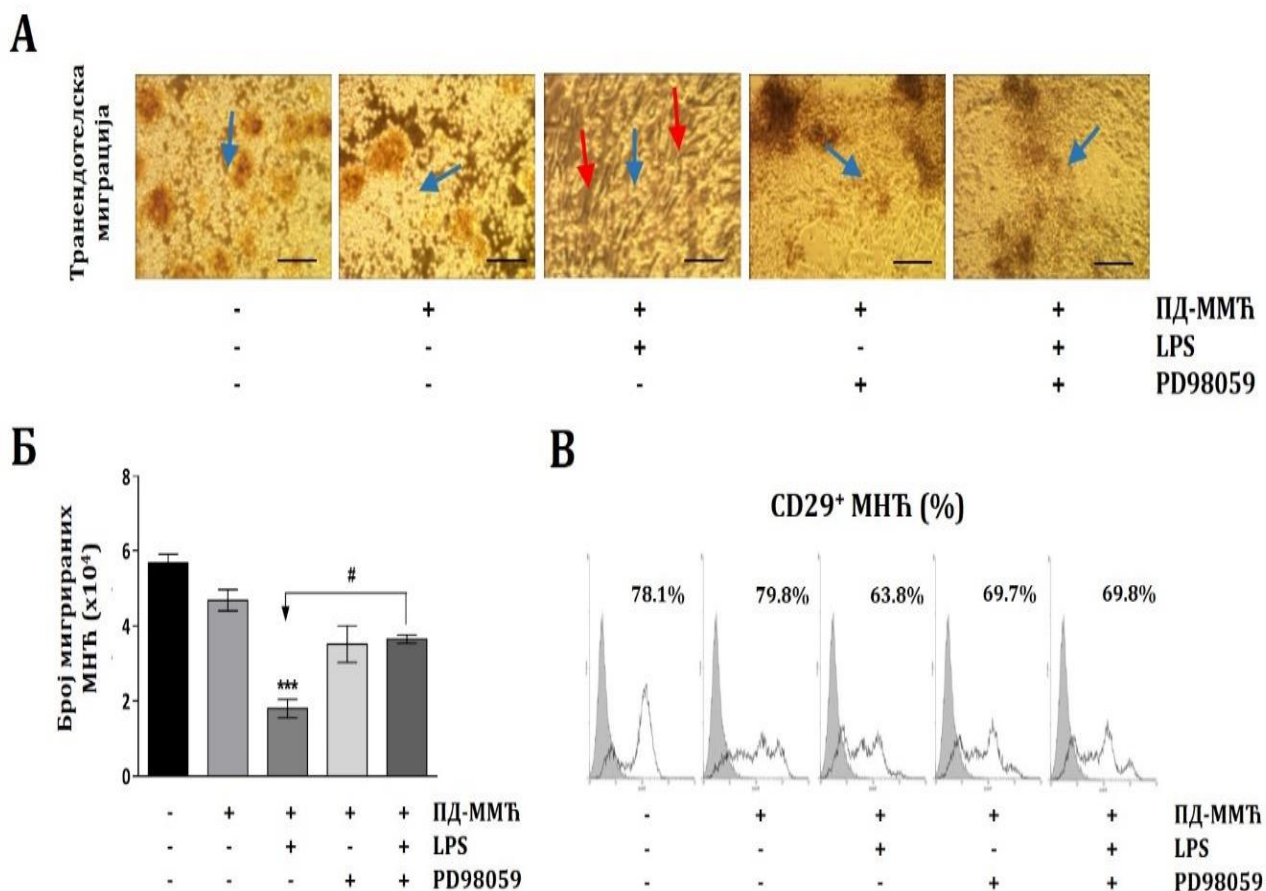
инхибира овај ефекат LPS (Слика 24А и 24Б), указујући на потенцијално учешће ERK1,2 сигналног пута у овим ефектима LPS.

Поред тога, проточном цитометријом анализирана је експресија површинског маркера CD29 код МНЂ. Резултати ове анализе показују да ПД-ММЂ претретиране са LPS могу благо смањити заступљеност CD29⁺ МНЂ у односу на проценат ових ћелија гајених како у одсуству тако и у присуству самих ПД-ММЂ. У овим ефектима LPS не запажа се учешће ERK1,2 сигналног пута с обзиром да PD98059 инхибитор не доводи до промена у присуству CD29⁺ ћелија у оквиру популације МНЂ (Слика 24В).

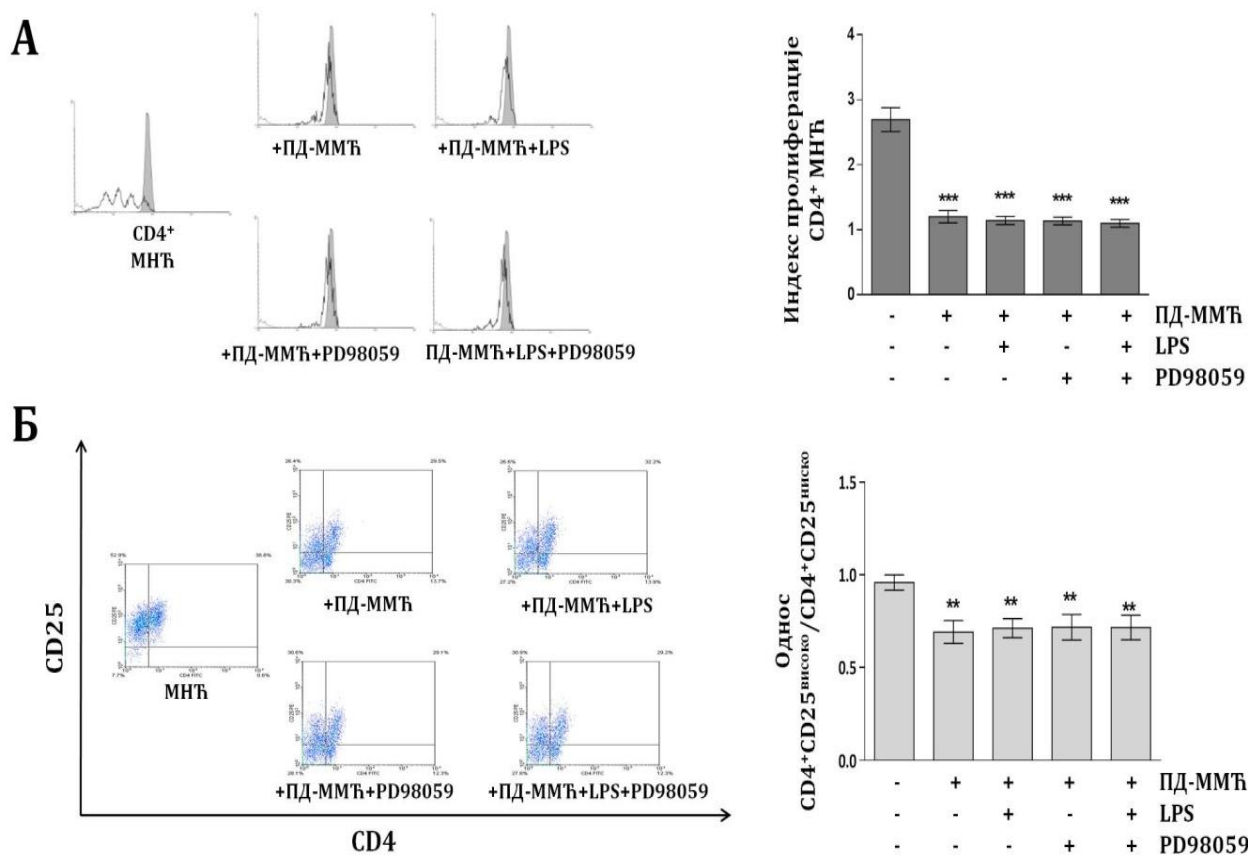
4.2.2. УТИЦАЈ LPS И АКТИВИРАНОГ ERK1,2 СИГНАЛНОГ ПУТА НА СПОСОБНОСТ ПД-ММЂ ДА МОДУЛИШУ ПРОЛИФЕРАЦИЈУ И ЗАСТУПЉЕНОСТ CD4⁺CD25^{ВИСОКО} КОД МНЂ

У наставку испитивања имуномодулаторних својстава ПД-ММЂ, анализирана је пролиферација CD4⁺ субпопулације МНЂ након директне ко-култивације са ПД-ММЂ. Добијени резултати показују да је у присуству ПД-ММЂ значајно инхибирана пролиферација CD4⁺ МНЂ, у поређењу са пролиферацијом CD4⁺ МНЂ култивисаних засебно (контрола), док сличан ефекат испољавају и ПД-ММЂ претретиране са LPS, PD98059, као и ова два фактора заједно (Слика 25А).

Поред тога, анализом заступљености CD4⁺CD25^{ВИСОКО} и CD4⁺CD25^{НИСКО} лимфоцита у популацији CD4⁺CD25⁺ МНЂ стимулираних митогеном, утврђено је да ПД-ММЂ могу значајно да смање однос CD4⁺CD25^{ВИСОКО}/CD4⁺CD25^{НИСКО} лимфоцита, при чему претретман ПД-ММЂ са LPS, PD98059, као и њиховом комбинацијом не доводи до промена у овом ефекту ПД-ММЂ, у односу на проценат CD4⁺CD25^{ВИСОКО}/CD4⁺CD25^{НИСКО} лимфоцита у контроли (Слика 25Б).



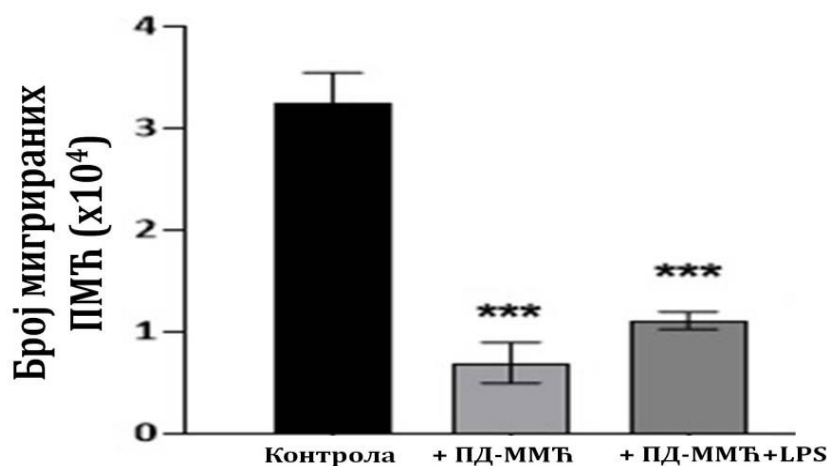
Слика 24. Утицај LPS и активираниог ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЋ да модулишу трансендогелску миграцију МНЋ. ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 24 бунара (5×10^4 ћелија/бунару) и потом третиране са или без LPS (1000 ng/ml) у одсуству или присуству специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris) током 72h у стандардном медијуму. PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. Потом су ове ћелије ко-култивисане са МНЋ као што је претходно описано у поглављу 3.3.1.4.1. (А, Б) Трансендогелска миграција МНЋ. Након претретмана ПД-ММЋ, инсерти са слојем ендотелских ћелија (EA.hy 926 ћелијска линија) и засејаних МНЋ, постављани су на бунаре са културама ПД-ММЋ (односно МНЋ и ПД-ММЋ износио је приближно 10:1). Број мигрираних МНЋ детектован је након 48h (В) Експресија CD29 у популацији МНЋ. Процент CD29⁺ МНЋ одређиван је проточном цитометријом након 48h ко-култивације са претходно претретираним ПД-ММЋ, при чему је однос МНЋ и ПД-ММЋ износио приближно 1:10. Репрезентативне слике МНЋ које су мигрирале (плава стрелица) и адхерентних ПД-ММЋ (црвена стрелица) у доњем делу *transwell* система су приказане. Резултати су приказани као средња вредност броја мигрираних ћелија \pm SEM из најмање три независна експеримента. Статистички значајне разлике у односу на контролу (МНЋ култивисане у одсуству ПД-ММЋ) према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$; или у односу на МНЋ култивисане у присуству ПД-ММЋ претретираних са LPS: # $p < 0.05$;



Слика 25. Утицај LPS и улога ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЋ да модулишу пролиферативни капацитет МНЋ и заступљеност CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} МНЋ. ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 24 бунара (5x10⁴ ћелија/бунару) и потом третиране са или без LPS (1000 ng/ml) у одсуству или присуству специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μM, Tocris) током 72h у стандардном медијуму. PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. Непосредно пре додавања МНЋ, ПД-ММЋ су третиране са митомицином Це (25 μg/ml, Sigma-Aldrich) током 30 минута и потом ко-култивисане са МНЋ. Након стимулације са фитохемаглутинином (РНА, 2.5 μg/ml, Life Technologies), МНЋ додаване су у културе (однос МНЋ и ПД-ММЋ износио је приближно 10:1). Ко-култивација ових ћелија трајала је наредних 5 дана. (А) Репрезентативни хистограми пролиферације CD4⁺ лимфоцита обележених са CFSE. Осенчени шиљак померен удесно представља сигнал нестимулисаних МНЋ, односно контролу, док се смањење интензитета флуоресценце настало услед пролиферације МНЋ огледа у одговарајућем броју необојених шиљака померених улево. Графички приказ репрезентативног индекса пролиферације одређеног на основу интензитета флуоресценце. (Б) Репрезентативни тачкасти дијаграм процената CD4⁺CD25⁺ ћелија. Графички приказ односа процентуалне заступљености CD4⁺CD25^{високо} и CD4⁺CD25^{ниско} популација. Пролиферативни индекс и фенотип ћелија анализирани су проточном цитометријом. Резултати су представљени као средња вредност ± SE за најмање 6 независних експеримента, при чему су контролну групу представљале МНЋ стимулисане са РНА и култивисане самостално. Статистички значајне разлике у односу на контролу према Student-овом t-тесту: **p<0.01; ***p<0.001.

4.2.3. УТИЦАЈ LPS НА СПОСОБНОСТ ПД-ММЋ ДА МОДУЛИШУ ТРАНСЕНДОТЕЛСКУ МИГРАЦИЈУ ПМЋ

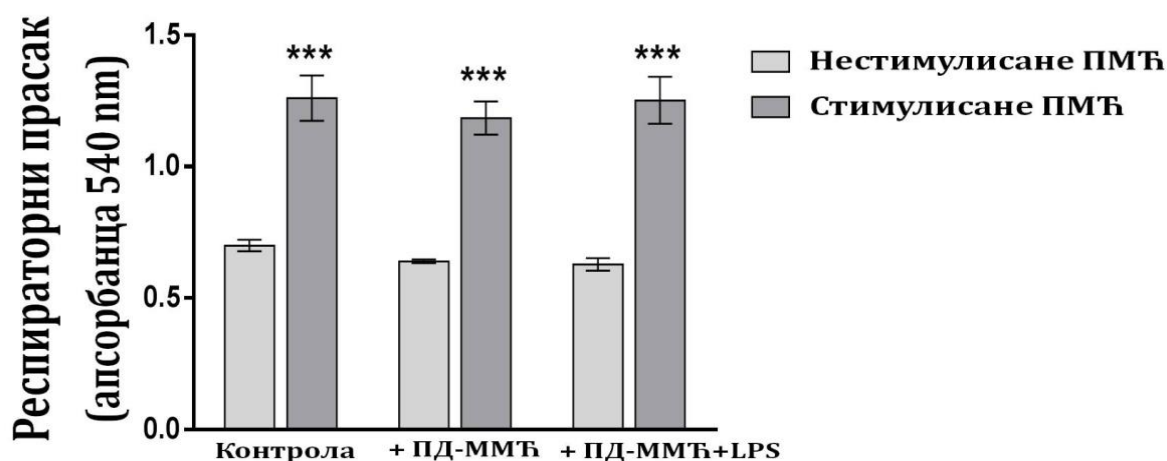
Поред испитивања утицаја на ћелије лимфоидне лозе, у даљим истраживањима анализиран је утицај ПД-ММЋ на ћелије мијелоидне лозе. *In vitro* ТЕМ полиморфонуклеарних ћелија (ПМЋ), праћена применом *transwell* система, показује је да након 2h култивације услед присуства ПД-ММЋ долази до значајног блокирања проласка ПМЋ кроз баријеру формирану од стране ендотелских ћелија, док LPS не утиче на ово својство ПД-ММЋ (Слика 26).



Слика 26. Утицај LPS на способност ПД-ММЋ да модулишу трансендотелску миграцију ПМЋ. ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 24 бунара (5x10⁴ ћелија/бунару) и потом третиране са или без LPS (1000 ng/ml) током 72h у стандардном медијуму. Потом су ове ћелије ко-култивисане са ПМЋ као што је претходно описано у поглављу 3.3.1.4.1. Након претретмана ПД-ММЋ, инсерти са слојем ендотелских ћелија (EA.hy 926 ћелијска линија) и засејаних ПМЋ, постављани су на бунаре са културама ПД-ММЋ (однос ММЋ и ПД-ММЋ износио је приближно 10:1), а број мигрираних ПМЋ детектован је након 2h култивације применом Трипан плавог раствора. Резултати су приказани као средња вредност броја мигрираних ћелија ± SEM из најмање два независна експеримента. Статистички значајне разлике у односу на контролу (ПМЋ култивисане у одсуству ПД-ММЋ) према Student-овом t-тесту: ***p<0.001.

4.2.4. УТИЦАЈ LPS НА СПОСОБНОСТ ПД-ММЋ ДА МОДУЛИШУ РЕСПИРАТОРНИ ПРАСАК ПМЋ

У наставку истраживања утицаја ПД-ММЋ на ћелије мијелоидне лозе анализиран је респираторни прасак ПМЋ након директне ко-култивације ових ћелија. Резултати представљени на **Слици 27**. показују да како саме ПД-ММЋ, тако и ПД-ММЋ претретиране са LPS не модификују респираторни прасак неактивираних (нестимулисаних), као и активираних (стимулисаних) ПМЋ.



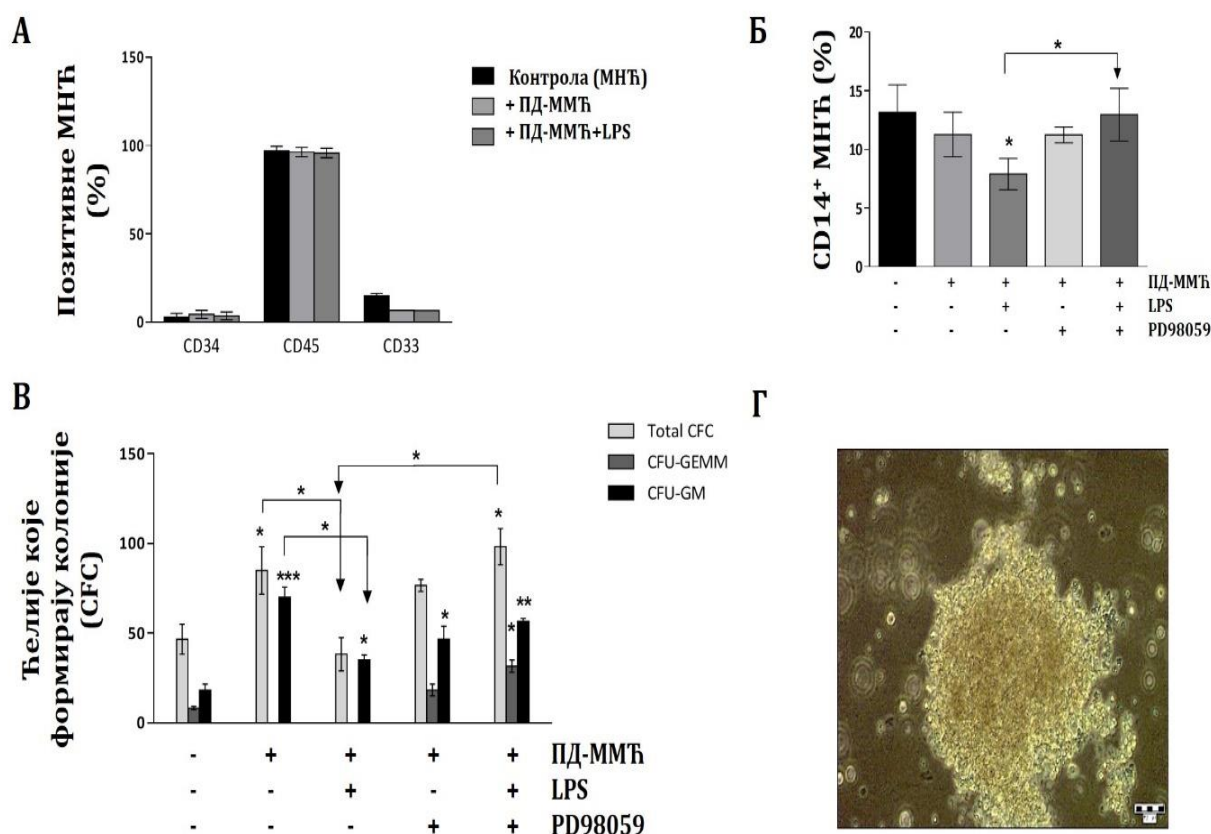
Слика 27. Утицај LPS на способност ПД-ММЋ да модулишу респираторни прасак ПМЋ. ПД-ММЋ засејаване су у плоче за културу ћелија са 96 бунара (2000 ћелија/бунару) и третиране са LPS (1000 ng/ml) током 72h. Потом су у ћелијске културе додате ПМЋ (у однос МНЋ и ПД-ММЋ износио је приближно 10:1) са или без стимулатором активности ПМЋ (РМА у концентрацији 2 $\mu\text{g/ml}$). Ко-култивација тако постављених ћелија трајала је наредна 3h након чега је NBT тестом одређена активност ПМЋ. Резултати су приказани као средње вредности оптичких густина \pm SEM из најмање два независна експеримента. Статистички значајне разлике у односу на контролу (нестимулисане ПМЋ) према Student-овом t- тесту: *** $p < 0.001$.

4.2.5. УТИЦАЈ LPS И УЛОГА ERK1,2 СИГНАЛНОГ ПУТА НА СПОСОБНОСТ ПД-ММЋ ДА МОДУЛИШУ ФЕНОТИП И КЛОНОГЕНОСТ МИЈЕЛОИДНИХ МНЋ

У оквиру испитивања утицаја ПД-ММЋ на ћелије мијелоидне лозе анализирана је способност ПД-ММЋ да модулишу заступљеност мијелоидних ћелија у популацији МНЋ, као и способност формирања колонија одређених хематопоетских прогенитора присутних у популацији МНЋ након ко-култивације са ПД-ММЋ.

На основу експресије маркера CD34, CD45, CD33 и CD14, утврђено је да у поређењу са МНЋ кутивисаним независно, ПД-ММЋ, као и ПД-ММЋ претретиране са LPS, не утичу на заступљеност CD45⁺ и CD34⁺ ћелија у популацији МНЋ, док се запажа блага инхибиција присуства CD33⁺ МНЋ (Слика 28А). Са друге стране, добијени резултати показују да иако ПД-ММЋ саме не доводе до промена у проценту CD14⁺ МНЋ, претретман ових ћелија са LPS значајно доприноси смањењу заступљености CD14⁺ МНЋ. Сходно томе, испитана је и улога ERK1,2 у овом ефекту LPS, а резултат показује да PD98059, као инхибитор ERK1,2, поништава ово дејство LPS (Слика 28Б). Како је показано да ПД-ММЋ, као и ПД-ММЋ претретиране са LPS могу утицати на заступљеност ћелија мијелоидне лозе у популацији МНЋ, у наставку је испитиван утицај ПД-ММЋ на пролиферацију и диференцијацију мијелоидних ћелија, односно способност формирања колонија одређених хематопоетских прогенитора присутних у популацији МНЋ. Наша истраживања показују да након ко-култивације са ПД-ММЋ долази до повећања укупног броја формираних колонија од стране МНЋ у односу на контролну групу МНЋ гајених самостално, али и да претретман ПД-ММЋ са LPS блокира овај ефекат самих ПД-ММЋ. Стога је у овим ефектима LPS испитивана и улога ERK1,2, а резултати су показују да примена PD98059 поништава инхибиторно дејство LPS (Слика 28В). Поред тога, анализирајући лозно специфични састав колонија формираних од стране МНЋ периферне крви, уочава се да су најзаступљеније CFU-GM колоније (Слика 28В и 28Г), те је и промена тренда њихове бројности по експерименталним групама сличан тренду који је испољен на нивоу укупних колонија (Слика 28В). Показано је да претретман ПД-ММЋ са LPS инхибира стимулаторни утицај ових ћелија на формирање CFU-GM од стране МНЋ, а да

PD98059 блокира ово дејство LPS. Овај налаз указује да би инхибиторни утицај LPS на способност ПД-ММЋ у стимулацији формирања CFU-GM могао бити остварен посредством активираниог ERK1,2 у ПД-ММЋ (Слика 28В). Додатно, запажа се и да у групама које су биле ко-култивисане са ПД-ММЋ претретираним са PD98059 долази до повећања броја формираних CFU-GEMM колонија од стране МНЋ периферне крви (Слика 28В).



Слика 28. Утицај LPS и улога ERK1,2 сигналног пута на способност ПД-ММЋ да модулишу фенотип и клоногеност мијелоидних МНЋ. ПД-ММЋ култивисане су у стандардном медијуму у одсуству или присуству LPS (1000 ng/ml), са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris). PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. Након претретмана, у културе су додаване МНЋ (однос МНЋ и ПД-ММЋ износио је приближно 10:1). Следствена инкубација трајала је наредних 5 дана. Пролиферација и фенотип анализираних МНЋ одређиван је проточном цитометријом. (А) Процент МНЋ које експримирају CD34, CD45, CD33 (Б) Процент МНЋ које експримирају CD14. (В) Способност формирања колонија мијелоидних ћелија од стране МНЋ периферне крви анализирана је CFC тестом. Графички резултати приказани су као средње вредности броја колонија \pm SEM из најмање три независна експеримента. Статистички значајне разлике у односу на контролу (МНЋ саме) према Student-овом t-тесту: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (Г) Репрезентативна слика CFU-GM колоније.

4.2.6. УТИЦАЈ LPS И АКТИВИРАНОГ ERK1,2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ЕКСПРЕСИЈИ МОЛЕКУЛА ЗНАЧАЈНИХ ЗА ИМУНОМОДУЛАТОРНО ДЕЛОВАЊЕ ПД-ММЋ

У наставку истраживања испитивана је промена експресије молекула који су од значаја за имуномодулаторно деловање ПД-ММЋ. Генска експресија анализирана је RT-PCR методом, док је протеинска експресија одређивана применом *Western blot* метода.

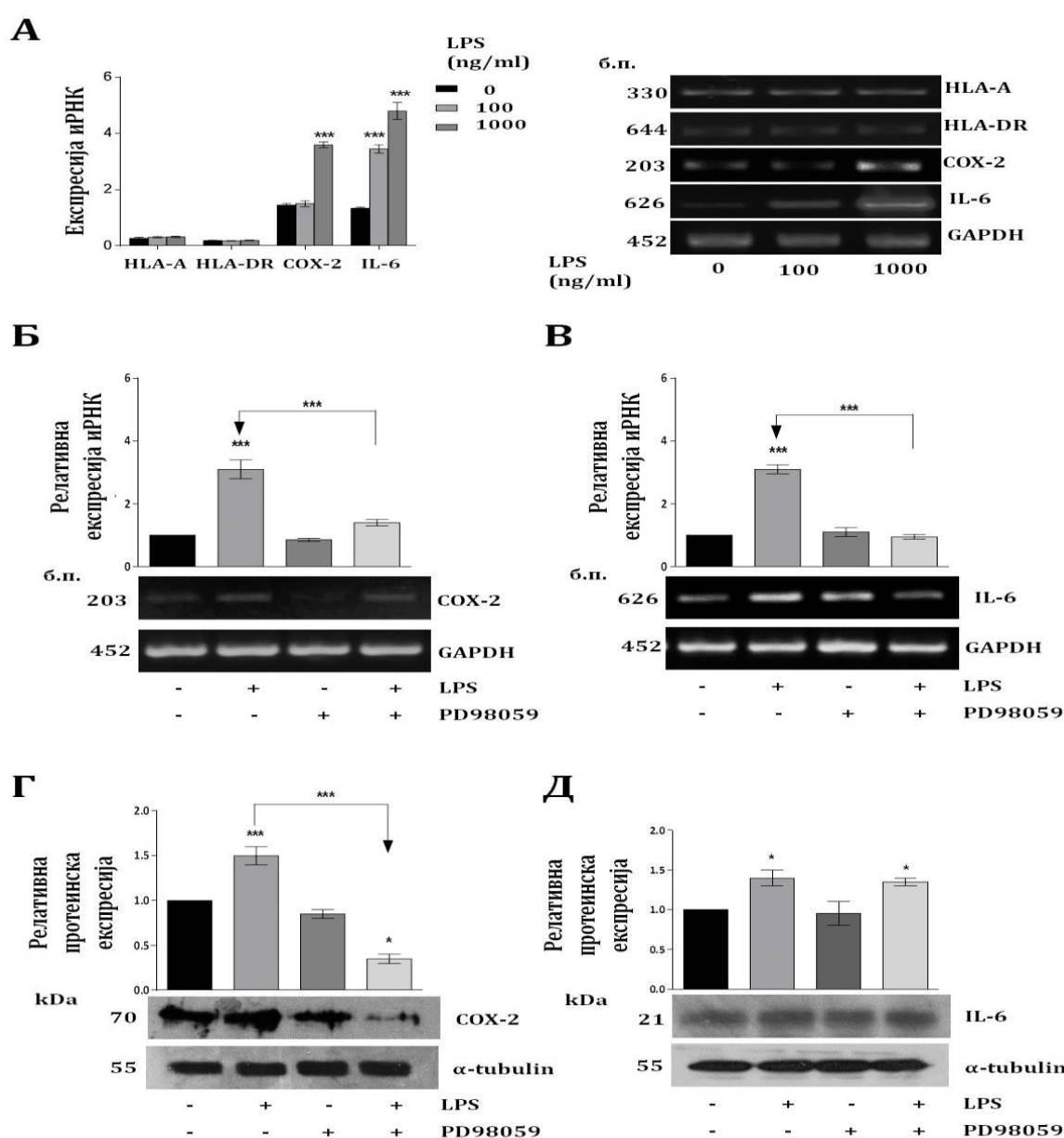
У нашем експерименталном дизајну показано је да LPS, након 24h третмана, не утиче на конститутивну експресију гена главног хистокомпатибилног комплекса (*HLA-A* и *HLA-DR*), док истовремено, у поређењу са контролном групом, стимулише генску експресију COX-2 и IL-6 молекула, при чему је експресија IL-6 гена стимулисана на дозно зависан начин (**Слика 29А**).

С обзиром на добијене резултате, даље је испитивана улога ERK1,2 у испољеним ефектима LPS, а експресија COX-2 и IL-6 анализирана је како на генском, тако и на протеинском нивоу. На **Слици 29Б** и **29Г** уочава се да услед примене PD98059 долази до поништавања стимулаторног ефекта LPS, док сам инхибитор не мења базални ниво експресије COX-2 код ПД-ММЋ, како на генском тако и на протеинском нивоу. Са друге стране, примена PD98059 значајно је инхибирала експресију IL-6 гена индуковану присуством LPS након 24h третмана, док на протеинском нивоу PD98059 није поништио стимулаторни ефекат LPS. Истовремено, базални ниво генске и протеинске експресије IL-6 молекула код ПД-ММЋ под утицајем PD98059 није промењен (**Слика 29В** и **29Д**). Стога ови налази упућују на улогу ERK1,2 сигналног пута у стимулацији експресије COX-2 и IL-6 молекула код ПД-ММЋ под утицајем LPS.

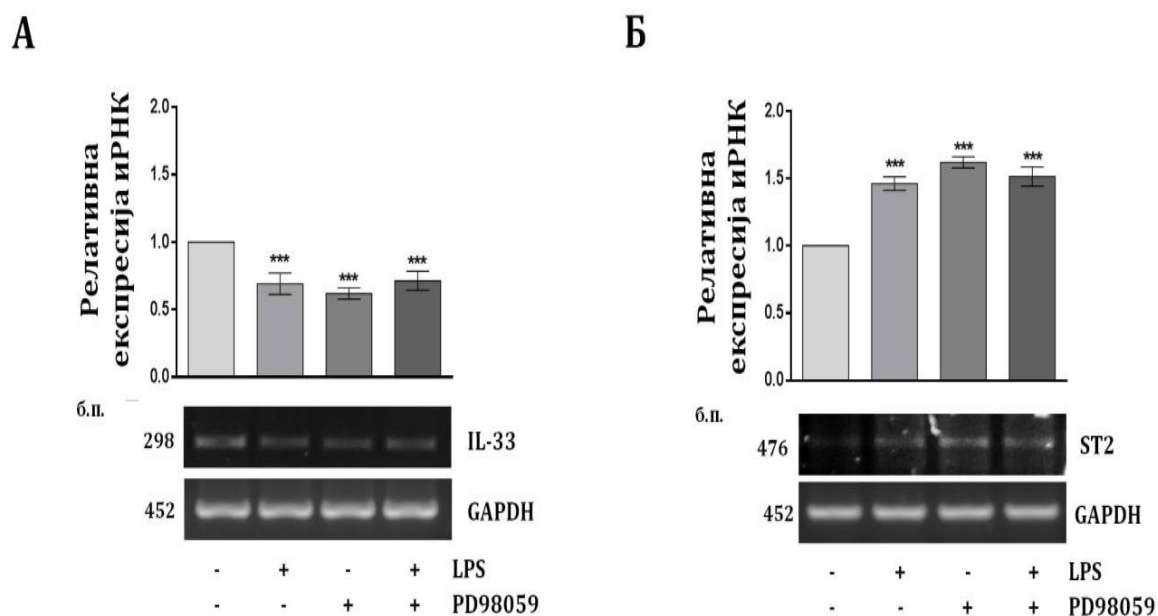
Поред експресије HLA-A, HLA-DR, COX-2 и IL-6 као фактора повезаних са испољавањем имуномодулаторних функција ћелија, у наставку истраживања анализирана је генска експресија ST2 рецептора и IL-33 цитокина, односно утицај LPS на ове имуномодулаторне гене код ПД-ММЋ (**Слика 30**).

На основу резултата добијених применом RT-PCR метода уочава се да ПД-ММЋ конститутивно експримирају како ST2 (**Слика 30А**), тако и IL-33 ген (**Слика 30Б**), док присуство LPS повећава експресију ST2 гена, али смањује експресију гена за IL-33

у поређењу са конститутивним нивоима експресије ових гена испољеним у контролној групи ћелија (**Слика 30А** и **30Б**). Истовремено, примена PD98059 не доводи до промена генске експресије, како ST2, тако и IL-33 молекула коју индукује LPS (**Слика 30А** и **30Б**), што указује да се ове промене у експресији ST2 и IL-33 гена вероватно не остварују активношћу ERK1,2 сигналног пута код ПД-ММЋ.



Слика 29. Утицај ЛРС активираниог ERK1,2 сигналног пута у експресији молекула значајних за имуномодулаторно деловање ПД-ММЋ. Ћелије су култивисане у стандардном медијуму у (А) присуству растућих концентрација ЛРС (0, 100 ng/ml и 1000 ng/ml) (Б, В) са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris). PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са ЛРС. (А, Б, В) Генска експресија имуномодулаторних маркера одређена применом RT-PCR након 24h третмана. Резултати су представљени као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. (Г, Д) Протеинска експресија COX-2 и IL-6 одређена *Western blot* методом након 72h третмана са ЛРС (1000 ng/ml). Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане без ЛРС), а на графицима су приказани резултати средњих вредности три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Приказане су слике репрезентативних генских и протеинских трака, док је њихова величина изражена у броју базних парова (б.п.), односно молекулској маси (kDa).



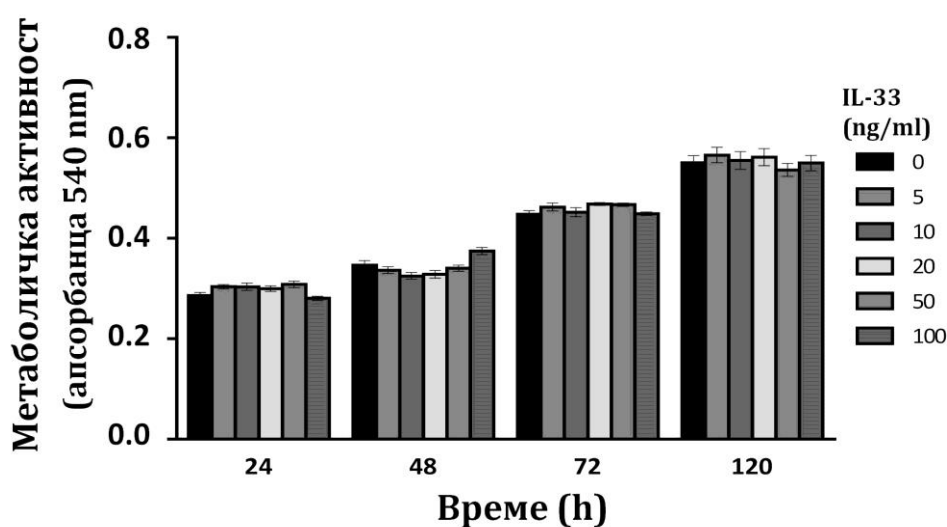
Слика 30. Утицај LPS и улога ERK1,2 сигналног пута на генску експресију ST2 и IL-33 молекула код ПД-ММЋ. (А и Б) Ћелије су култивисане у стандардном медијуму у одсуству или присуству LPS (1000 ng/ml), са или без специфичног MEK/ERK инхибитора, PD98059 (25 μ M, Tocris). PD98059 инхибитор додаван је у ћелијске културе 45 минута пре почетка третмана са LPS. Генска експресија ST2 и IL-33 одређена применом RT-PCR након 24h третмана. Резултати су представљени као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане без LPS), а на графицима су приказани резултати средњих \pm SE вредности три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$. Приказане су слике репрезентативних генских трака, док је њихова величина изражена у броју базних парова (б.п.).

4.3. УТИЦАЈ IL-33 НА СВОЈСТВА И ФУНКЦИЈЕ ПД-ММЋ ПОВЕЗАНЕ СА РЕГЕНЕРАТИВНИМ ПОТЕНЦИЈАЛОМ

Имајући у виду да су наши резултати показали експримираност гена за ST2 рецептор код ПД-ММЋ, чији је лиганд IL-33 цитокин, следећи сегмент истраживања односио се на испитивање утицаја IL-33, као ендогеног сигнала опасности, односно алармина, на регенеративна својства ПД-ММЋ.

4.3.1. УТИЦАЈ IL-33 НА МЕТАБОЛИЧКУ АКТИВНОСТ ПД-ММЋ

Како би се испитао утицај IL-33 на метаболичку активност ПД-ММЋ примењен је МТТ тест, при чему је праћена метаболичка активност ћелија у присуству растућих концентрација IL-33, током различитих временских интервала. На основу резултата МТТ теста може се закључити да третман са IL-33 не доводи до промене метаболичке активности код ПД-ММЋ, односно не утиче на вијабилност ових ћелија (Слика 31).

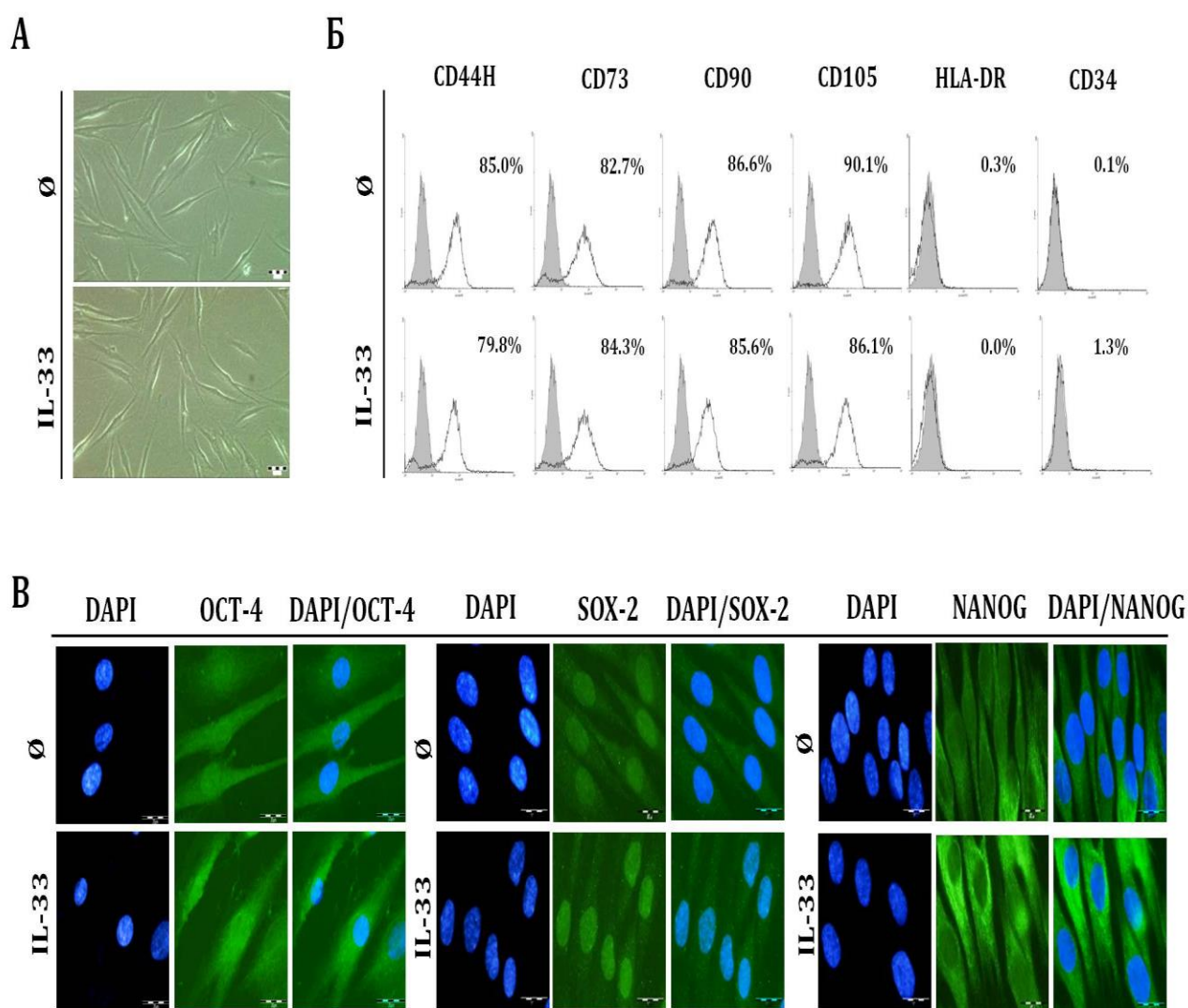


Слика 31. Утицај IL-33 на метаболичку активност ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (1×10^4 ћелија/бунару) и након 24 h третиране са IL-33 (0, 10, 20, 50 и 100 ng/ml) током 24, 48, 72 и 120h када је МТТ тестом одређена метаболичка активност ПД-ММЋ. Резултати су приказани као средња вредност оптичких густина \pm SE из најмање три независна експеримента рађена у трипликату.

4.3.2. УТИЦАЈ IL-33 НА МОРФОЛОШКА И ИМУНОФЕНОТИПСКА СВОЈСТВА ПД-ММЋ

У наставку истраживања анализирани су промене основних ћелијских својстава ПД-ММЋ под утицајем IL-33, укључујући морфологију и имунофенотипске одлике ових ћелија (**Слика 32А, 32Б и 32В**). На основу приказаних резултата уочава се да ПД-ММЋ гајене у присуству IL-33 (100 ng/ml) током 3 дана задржавају морфологију која подсећа на фибробласте (**Слика 32А**).

Применом проточне цитометрије утврђено је да ПД-ММЋ након 3 дана култивације у присуству IL-33 (100 ng/ml) експримирају површинске маркере карактеристичне за ММЋ укључујући CD44, CD73, CD90, CD105 (приближно 80% позитивних ћелија), а да истовремено не експримирају маркере који се налазе на хематопоеетским ћелијама (HLA-DR и CD34) (мање од 2% позитивних ћелија). Ови налази указују да IL-33 не модификује проценат експресије како мезенхимских, тако и хематопоеетских маркера, односно не утиче на имунофенотипска својства ПД-ММЋ (**Слика 32Б**). Поред тога, имунофлуоресцентним обележавањем анализирана је и експресија, као и унутарћелијска локализација маркера плурипотентности попут ОСТ-4, SOX-2 и NANOG након 7 дана третмана са IL-33 (100 ng/ml). Као што је приказано на **Слици 32В**, уочава се да ПД-ММЋ конститутивно експримирају ове маркере у једру и цитоплазми, као и да IL-33 стимулише њихову базалну експресију истовремено не мењајући локализацију унутар ћелија. Наиме, показано је да се ОСТ-4 експримира како у цитоплазми, тако и у једру, а да IL-33 доводи до повећања експресије овог протеина у оба ћелијска одељка. Са друге стране, SOX-2 је претежно локализован у једру, док се NANOG у највећој мери експримира у цитоплазми (**Слика 32В**).



Слика 32. Морфолошка и имунофенотипска својства ПД-ММЋ у присуству IL-33. Ћелије су гајене са или без IL-33 (100 ng/ml) у стандардним условима култивације током 3 или 7 дана. (А) Морфологија ПД-ММЋ. Приказане су репрезентативне фотографије ћелија у култури. Вредност размере износи 50 µm. (Б) Имунофенотипска карактеризација ПД-ММЋ вршена је проточном цитометријом. Репрезентативни хистограми представљају проценат ћелија које експримирају мезенхимске маркере укључујући CD44H, CD73, CD90, CD105, као и хематопоетске маркере попут CD34 и HLA-DR (необојена површина) у односу на одговарајућу изотипску контролу (осенчена површина). (В) Експресија маркера плурипотентности одређена индиректним имунофлуоресцентним обележавањем применом антитела за OCT-4, SOX-2 и NANOG и следственим бојењем са одговарајућим FITC-коњугованим секундарним антителима (зелено), док су једра обележавана флуоресцентном DAPI бојом (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије добијене сликањем на епифлуоресцентном микроскопу. Вредност размере износи 20 µm.

4.3.3. УТИЦАЈ IL-33 НА ДИФЕРЕНЦИЈАЦИОНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ПД-ММЋ

Како би се испитао диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ, након одговарајуће инкубације у диференцијационим медијумима за остеогену, хондрогену и адипогену лозу у присуству IL-33 (100 ng/ml), одређиван је ниво диференцираности на основу метода за детекцију минерализације, гликозаминогликана и липидних капљица индукованих у условима *in vitro*.

Како би се испитало деловање IL-33 у раној фази остеогене диференцијације ПД-ММЋ анализирана је активност ензима ALP. На основу приказаних резултата на **Слици 33А** уочава се да IL-33 (100 ng/ml) након 7 дана третмана у остеогеном медијуму значајно смањује активност ALP ензима у поређењу са ПД-ММЋ гајеним само у остеогеном медијуму, али не утиче на базалну активност овог ензима код ПД-ММЋ.

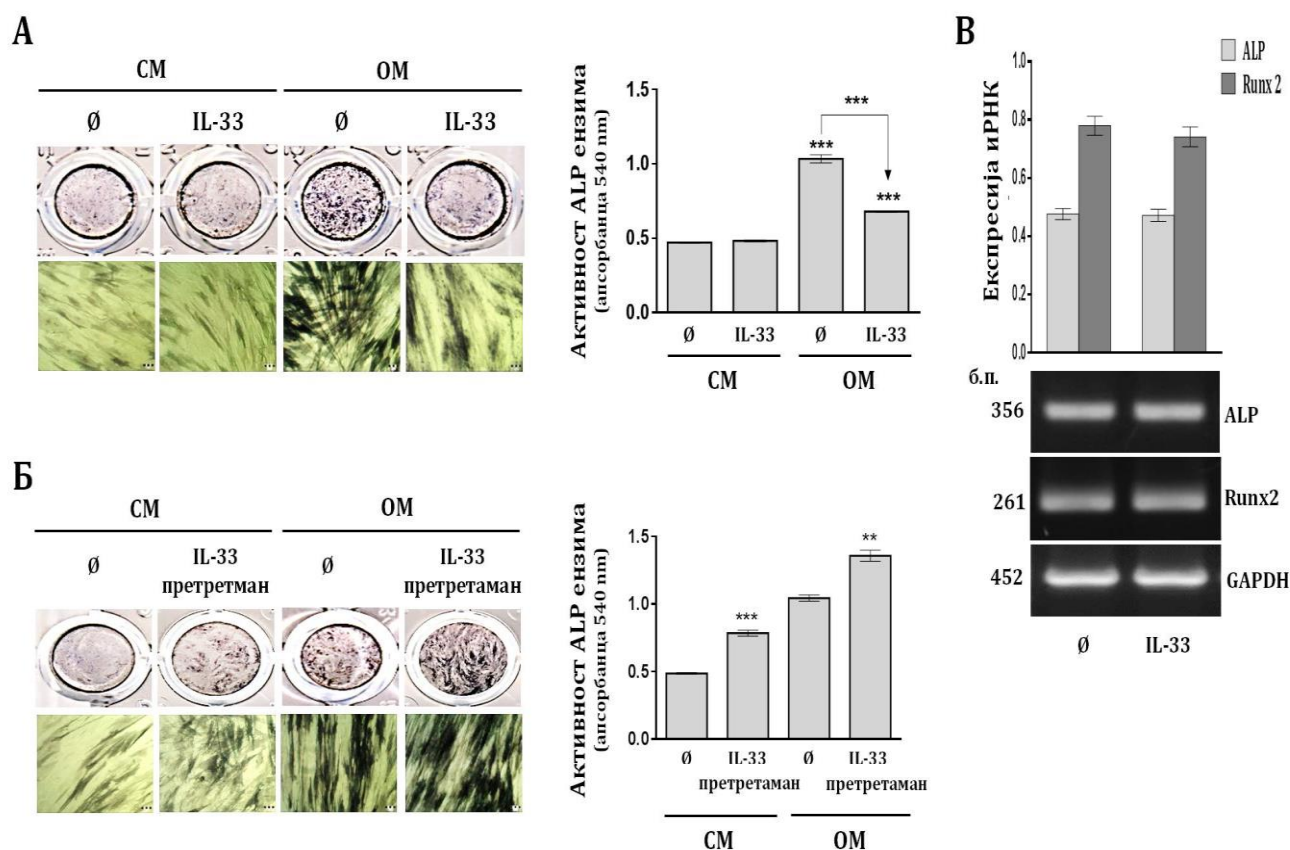
Са друге стране, резултати испитивања утицаја претретмана ПД-ММЋ овим цитокином показују да ПД-ММЋ које су током 7 дана биле третиране са IL-33 (100 ng/ml) у стандардном медијуму, испољавају значајно вишу активност ALP ензима у односу на непретретиране ПД-ММЋ, како у стандардном медијуму тако и у остеогеном медијуму (**Слика 33Б**).

Међутим, анализа генске експресије након 24h третмана са IL-33 (100 ng/ml) није потврдила овај инхибиторни тренд који остварује IL-33. Наиме, у присуству IL-33 нису индуковане промене нивоа иРНК за ALP ензим и *Runx2* у поређењу са конститутивном експресијом ових гена код ПД-ММЋ (**Слика 33В**).

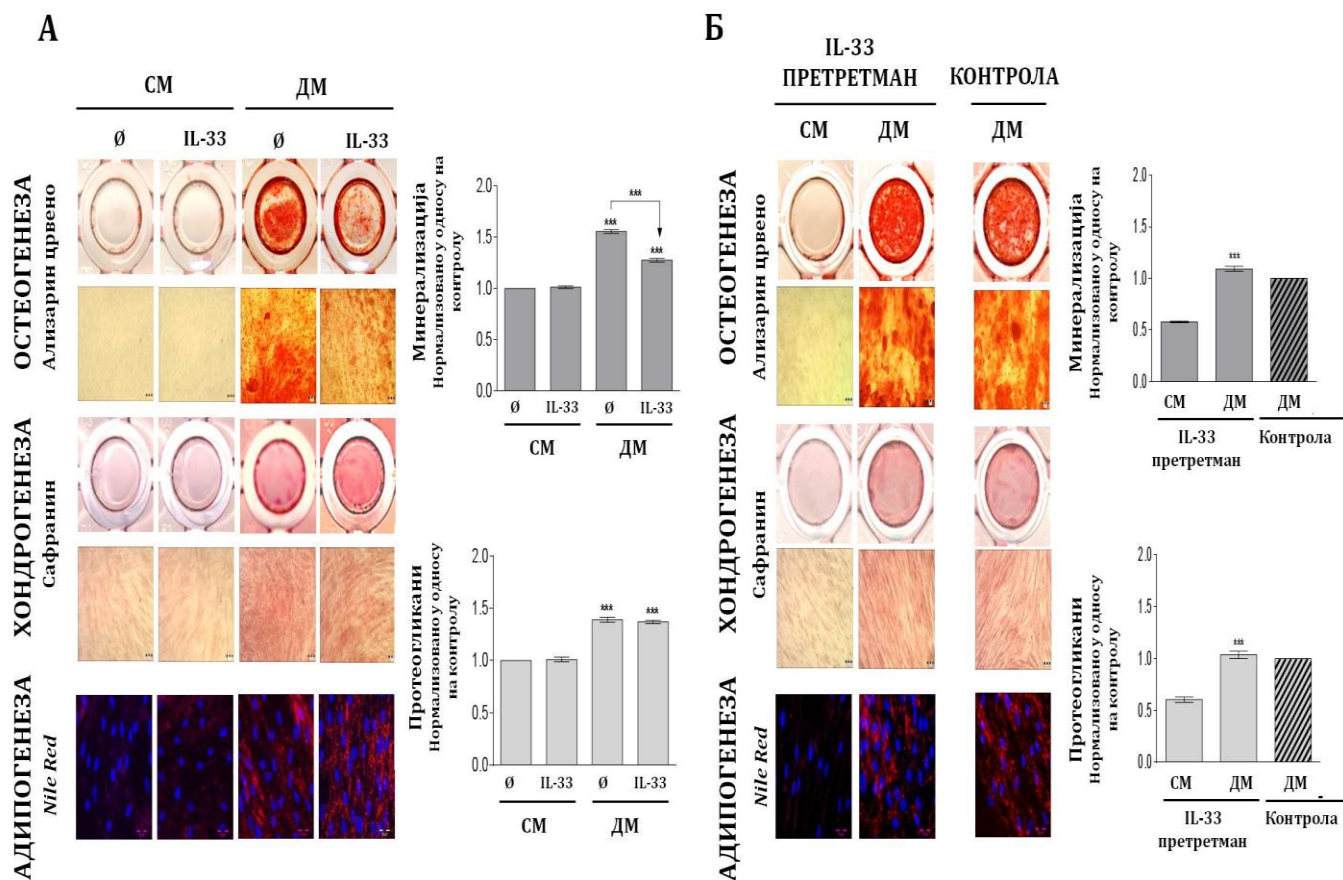
Резултати приказани на **Слици 34А** показују да присуство IL-33 за време диференцијације доводи до статистички значајног смањења нивоа минерализације ванћелијског матрикса у односу на контролну групу ћелија култивисаних само у присуству остеогеног медијума. У стандардном култивационом медијуму у присуству или одсуству IL-33 не долази до минерализације ПД-ММЋ. Ови резултати у складу су са показаном инхибицијом активности ALP ензима (**Слика 33А**), док неизмењена експресија ALP и *Runx2* гена под утицајем IL-33 (**Слика 33Б**) указује на сложено улогу овог цитокина у остеогеној диференцијацији ПД-ММЋ. Са друге стране, IL-33 не утиче на експресију гликозаминогликана, као ни на формирање

липидних капљица како у стандардном медијуму, тако и у диференцијационим медијумима за хондрогену, односно адипогену диференцијацију (**Слика 34А**).

Анализа утицаја претретмана са IL-33 на способност диференцијације ПД-ММЋ показује да након седмодневног третмана са IL-33 ПД-ММЋ испољавају сличан диференцијациони ниво у погледу минерализације, синтезе гликозаминогликана и формирања липидних капљица као и ћелије које нису биле претретигане (**Слика 34Б**). Стога ови налази указују да IL-33 не мења диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ.



Слика 33. Утицај третмана и претретмана са IL-33 на активност ALP ензима код ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (5000 ћелија/бунару) и инкубиране у медијуму за остеогену диференцијацију (ОМ) са или без IL-33 (100 ng/ml). Остеогена диференцијација ПД-ММЋ одређивана је на основу активности ALP ензима након 7 дана култивације. За потребе анализе генске експресије ПД-ММЋ су гајене у стандардном медијуму за култивацију током 24h у одсуству или присуству IL-33 (100 ng/ml). **(А)** Хистохемијска и колориметријска детекција ALP ензима одређивана након диференцијационог третмана. Као контролне групе коришћене су ПД-ММЋ култивисане без IL-33. **(Б)** Хистохемијска и колориметријска детекција ALP ензима одређивана код ПД-ММЋ претретираних током 7 дана са IL-33 (100 ng/ml) у стандардном медијуму. ПД-ММЋ које претходно нису биле претретиране са IL-33 представљале су контроле. Приказане су репрезентативне слике ПД-ММЋ у култури, док су графички резултати представљени као средња вредност \pm SE добијених из три независна експеримента. **(В)** Генска експресија маркера специфичних за остеогену диференцијацију одређивана RT-PCR методом. Резултати су представљени као однос експресије датог gena и експресије GAPDH, као контролног gena. Приказане су слике репрезентативних гелова, док је њихова величина изражена у броју базних парова (б.п.). Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$; или у односу на ПД-ММЋ култивисане у остеогеном медијуму (ОМ): *** $p < 0.001$; или у односу на одговарајућу непретретирану контролу према Student-овом t-тесту: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



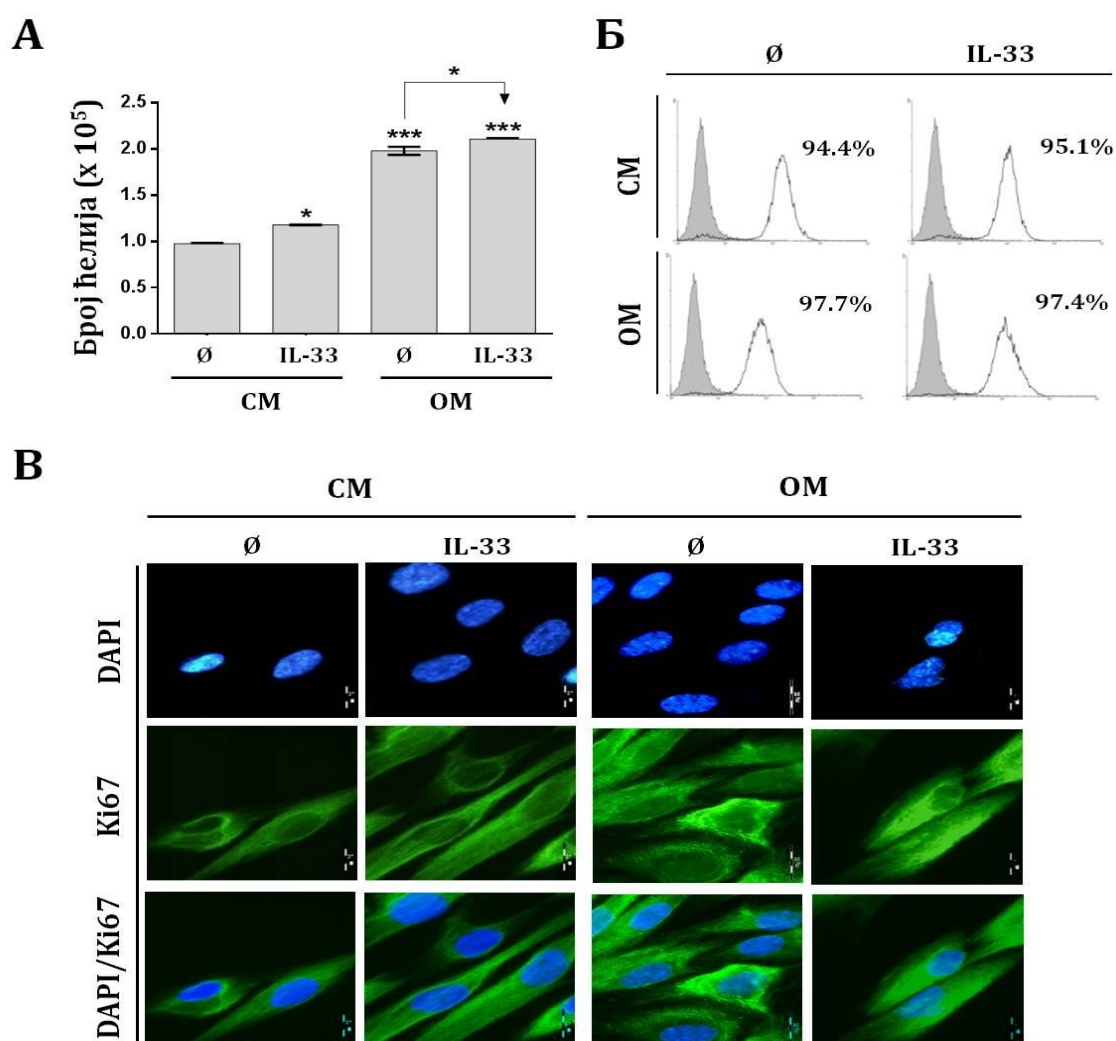
Слика 34. Утицај третмана и претретмана са IL-33 на диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 96 бунара (5000 ћелија/бунару) и инкубиране у медијумима за индукцију сваког типа диференцијације (ДМ) са или без IL-33 (100 ng/ml). Остеогена диференцијација ПД-ММЋ одређивана је на основу минерализације након 14 дана култивације (Ализарин црвено бојење). Хондрогена диференцијација одређивана је бојењем ПД-ММЋ Сафранином након 2 недеље инкубације у ДМ. Адипогена диференцијација одређивана је бојењем липидних капљица применом Nile red након 4 недеље култивације ћелија у ДМ. (А) Остеогена, хондрогена и адипогена диференцијација одређене након диференцијационог третмана ПД-ММЋ. Као контролне групе коришћене су ПД-ММЋ гајене у стандардном медијуму за култивацију ћелија без IL-33. (Б) Остеогена, хондрогена и адипогена диференцијација индуковане код ПД-ММЋ претретираних током 7 дана са IL-33 (100 ng/ml) у стандардном медијуму. ПД-ММЋ гајене у диференцијационом медијуму које претходно нису биле претретиране са IL-33 представљале су контроле. Приказане су репрезентативне слике ПД-ММЋ у култури, док су на графицима остеогене и хондрогене диференцијације приказани резултати средњих вредности \pm SE три независна експеримента. Вредности су нормализоване у односу на контролу коју су представљале (А) ћелије гајене у одсуству IL-33; (Б) ћелије које нису биле претретиране (шрафирани стубић). Статистички значајна разлика у односу на одговарајућу контролу према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$.

4.3.4. УТИЦАЈ ИЛ-33 НА ПРОЛИФЕРАТИВНУ АКТИВНОСТ ПД-ММЋ ТОКОМ ОСТЕОГЕНЕ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈЕ

Имајући у виду добијене резултате који се односе на ефекат ИЛ-33 на остеогенезу на ћелијском нивоу претпоставили смо да ИЛ-33 може утицати на пролиферацију ПД-ММЋ током остеогене диференцијације, те је у следственим експериментима испитивана пролиферативна активност ПД-ММЋ у остеогеном медијуму кроз анализу бројности, клоногеног потенцијала и ћелијског старења.

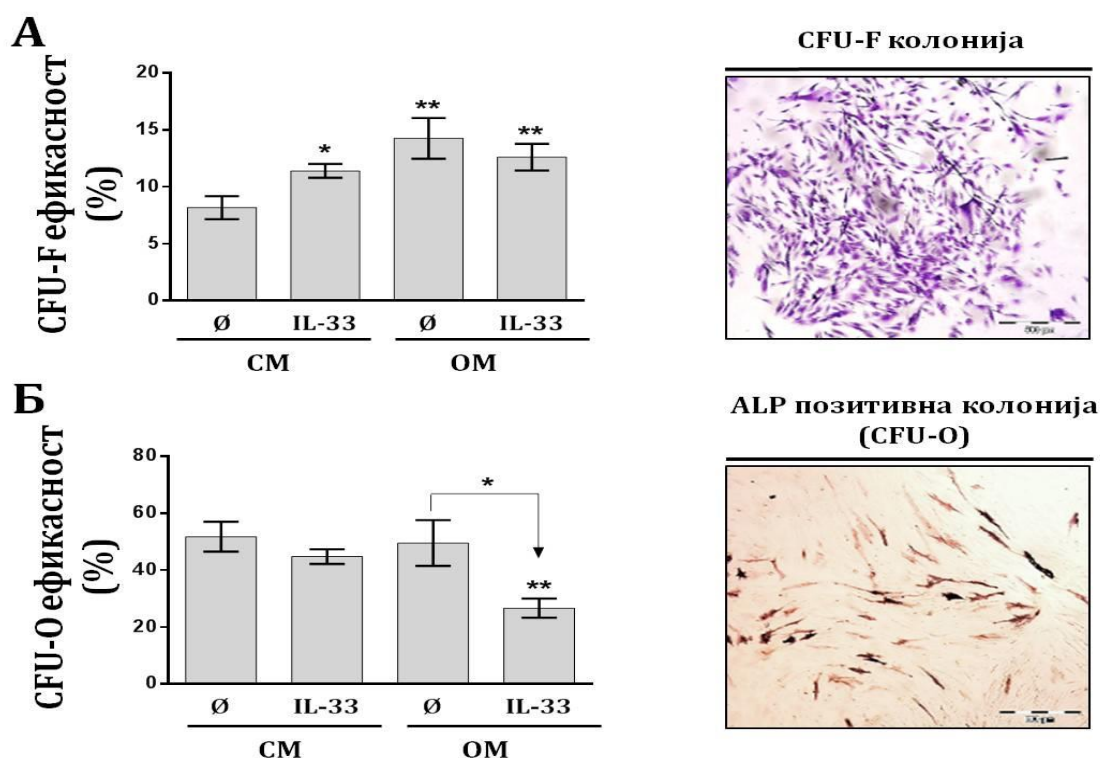
У првом кораку анализирана је пролиферација ПД-ММЋ након 7 дана третмана у остеогеном медијуму, а добијени резултати показују да ИЛ-33 значајно повећава пролиферацију ПД-ММЋ у односу на нетретиране ћелије, како у стандардном медијуму тако и у остеогеном медијуму. Осим тога, запажа се да у односу на стандардни медијум, сам остеогени медијум такође значајно стимулише пролиферацију ПД-ММЋ, при чему је у присуству ИЛ-33 број ПД-ММЋ додатно повећан (**Слика 35А**).

На молекулском нивоу додатно је испитивана протеинска експресија маркера ћелијске пролиферације, Ки67, након 7 дана третмана. Резултати добијени проточном цитометријом показују да преко 94% ћелија свих експерименталних група укључујући ћелије гајене у стандардном или остеогеном медијуму са или без ИЛ-33 (100 ng/ml) експримира овај протеин (**Слика 35Б**), што је и потврђено имуноцитохемијским обележавањем (**Слика 35В**). Ови налази истовремено указују да се веома мали проценат ПД-ММЋ (Ки67 негативних ћелија) налази у G0 фази ћелијског циклуса. Уз то, имуноцитохемијским обележавањем показана је претежно цитоплазматска и перинуклеарна локализација Ки67 код ПД-ММЋ гајених у како стандардном, тако и у остеогеном медијуму, при чему се у присуству ИЛ-33 у остеогеном медијуму уочава и једарна локализација Ки67. На истој слици јасно се запажа да, без обзира на локализацију, остеогени медијум сам доводи до повећања експресије Ки67, док ИЛ-33 испољава стимулаторан ефекат на експресију Ки67 како у стандардном медијуму, тако и у остеогеном медијуму у поређењу са нетретираним ПД-ММЋ (**Слика 35В**).



Слика 35. Утицај IL-33 на пролиферацију и експресију Ki67 током остеогене диференцијације ПД-ММЋ. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија, култивисане до субконфлуентности у стандардним условима, када је ћелијама додат свеж стандардни или остеогени медијум са или без IL-33 (100 ng/ml), а ћелије култивисане 7 дана. **(А)** Пролиферација ПД-ММЋ одређивана је бојењем Трипан плавим раствором. Резултати су графички представљени као средња вредност броја ћелија \pm SE добијених из три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу (ћелије гајене у стандардном медијуму у одсуству IL-33) према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; или у односу на ћелије култивисане у остеогеном медијуму у одсуству IL-33: * $p < 0.05$. **(Б)** Експресија маркера пролиферације Ki67 одређена проточном цитометријом. Репрезентативни хистограми представљају проценат ћелија које експримирају Ki67 (необојена површина) у односу на осенчену површину која представља негативну контролу (необележене ћелије). **(В)** Унутарћелијска локализација Ki67 протеина одређена индиректним имунофлуоресцентним обележавањем ћелија за Ki67 примарним антителом и следственим бојењем одговарајућим FITC-коњугованим секундарним антителом (зелено), док су једра обележавана флуоресцентном DAPI бојом (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије добијене сликањем на епифлуоресцентном микроскопу. Вредност размере износи 20 μ m.

Испитивање клоногеног потенцијала ПД-ММЋ показује да ИЛ-33 значајно подстиче способност формирања колонија ПД-ММЋ у стандардном медијуму у односу на нетретиране ћелије (**Слика 36А**). Са друге стране, сам остеогени медијум такође значајно стимулише CFU-F потенцијал ПД-ММЋ у поређењу са ћелијама култивисаним у стандардном медијуму, док ИЛ-33 не модификује стимулаторни ефекат остеогеног медијума (**Слика 36А**). Поред тога, испитивана је и способност формирања колонија ћелија са остеогеним потенцијалом (CFU-O), а на основу присуства ALP позитивних ћелија у колонијама. Као што је приказано на **Слици 36Б** култивација ПД-ММЋ у стандардном медијуму у присуству ИЛ-33, као и у самом остеогеном медијуму не утиче на проценат CFU-O колонија, у поређењу са заступљеношћу CFU-O колонија гајених у самом стандардном медијуму. Са друге стране, присуство ИЛ-33 у остеогеном медијуму доводи до значајног смањења заступљености CFU-O, у односу на проценате CFU-O у стандардном и остеогеном медијуму (**Слика 36Б**).



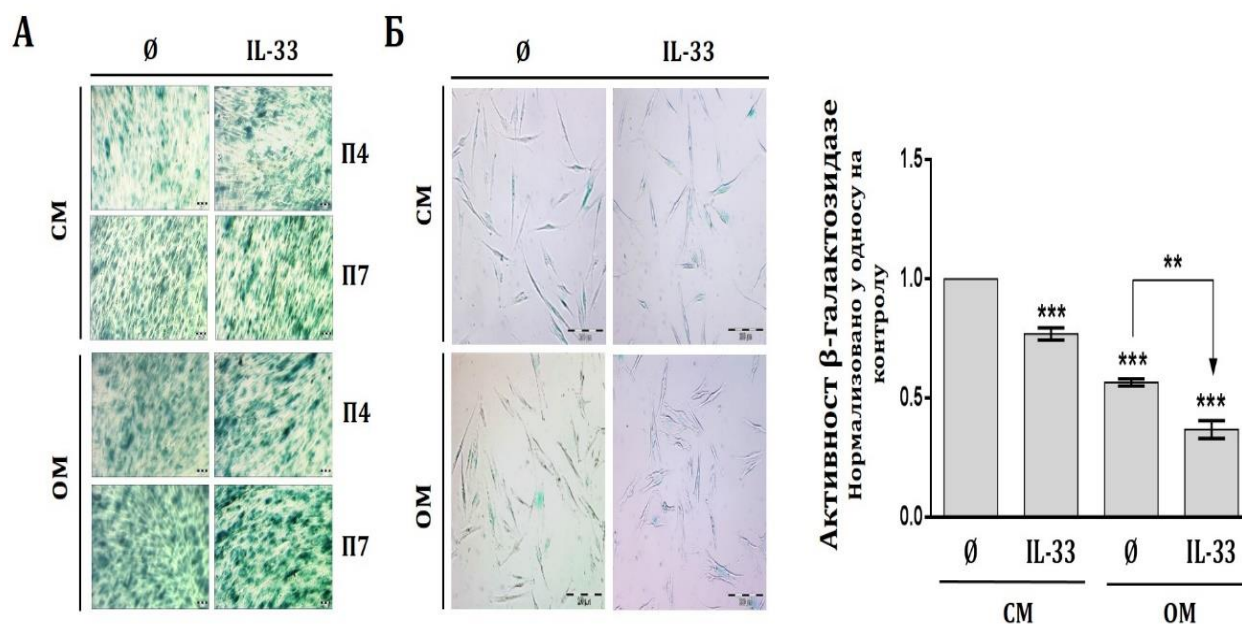
Слика 36. Утицај IL-33 на клоногени капацитет ПД-ММЋ повезан са остеогеном диференцијацијом. (А) CFU-F капацитет. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 24 бунара (100 ћелија/бунару) и култивисане током 14 дана у присуству или одсуству IL-33 (100 ng/ml) у стандардном медијуму или остеогеном медијуму. Ефикасност формирања фибробластних колонија одређена на основу процента развијених колонија у односу на укупни број засејаних ћелија у сваки бунар. Приказана је репрезентативна слика CFU-F обојене *Crystal violet* бојом. Вредност размере износи 500 μm . (Б) CFU-O капацитет. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија са 24 бунара (100 ћелија/бунару) и култивисане у стандардном медијуму током 7 дана, када је даља инкубација колонија настављена наредних 7 дана у присуству или одсуству IL-33 (100 ng/ml) у стандардном култивационом медијуму или остеогеном медијуму. По истеку третмана, ћелије су фиксиране и хистохемијски бојене за детекцију ALP ензима. Приказана је репрезентативна слика CFU-O обојене за присуство ALP ензима. Вредност размере износ 500 μm . CFU-O потенцијал утврђен на основу процентуалног односа броја ALP позитивних колонија и укупног броја колонија (CFU-O/CFU-F*100). Графички резултати представљени су као средња вредност процената колонија \pm SE добијених из три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу (ћелије култивисане у стандардном медијуму у одсуству IL-33) према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; или у односу на ћелије култивисане у остеогеном медијуму у одсуству IL-33: * $p < 0.05$.

Следствена истраживања имала су за циљ испитивање утицаја IL-33 на активност β -галактозидазе, ензима који представља показатељ ћелијског старења. У ту сврху ПД-ММЋ су култивисане током 7 дана у стандардном медијуму или остеогеном медијуму у присуству или одсуству IL-33, при чему је активност β -галактозидазе одређивана након бојења ћелија у монослоју, као и након бојења појединачних ћелија.

На основу одређивања активности β -галактозидазе у монослоју ПД-ММЋ показано је да у присуству IL-33 долази до стимулације активности β -галактозидазе како у стандардном медијуму, тако и у остеогеном медијуму у односу на нетретирание ћелије, при чему сам остеогени медијум значајно стимулише активност овог ензима у поређењу са активношћу оствареном код ћелија гајених у стандардном медијуму (**Слика 37А**). Поред тога, повећана активност β -галактозидазе запажа се и код ПД-ММЋ из виших пасаж (П7), у поређењу са активношћу овог ензима код ћелија из нижих пасаж (П4) (**Слика 37А**), што уједно потврђује повезаност активности овог ензима са процесом старења. Истовремено, стимулаторни тренд који испољавају како IL-33, тако и остеогени медијум уочава се и код ћелија нижих, и код ћелија виших пасаж (**Слика 37А**).

С обзиром на контрадикторност резултата који се односе на истовремену стимулацију пролиферације и активности β -галактозидазе код ПД-ММЋ под утицајем IL-33 током остеогене диференцијације, односно како би се у потпуности расветлио утицај IL-33 на старење ПД-ММЋ одређивана је активност β -галактозидазе на нивоу појединачних ћелија. За потребе овог експеримента након третмана ПД-ММЋ су одлепљиване и у једнаком броју поново постављане у плоче за култивацију ћелија. Након адхезије у ћелијама је одређивана активност β -галактозидазе. Добијени резултати показују да сам остеогени медијум значајно редукује проценат ћелија које експримирају β -галактозидазу у односу на ћелије култивисане у стандардном медијуму, а да IL-33 испољава значајно инхибиторан ефекат на експресију β -галактозидазе како код ПД-ММЋ култивисаних у стандардном медијуму тако и код ПД-ММЋ култивисаних у остеогеном медијуму (**Слика 23Б**). Ови налази истовремено указују да стимулација активности β -

галактозидазе ПД-ММЋ одређена на нивоу ћелија у монослоју може бити заправо последица повећаног броја ћелија под утицајем IL-33 и/или остеогеног медијума.



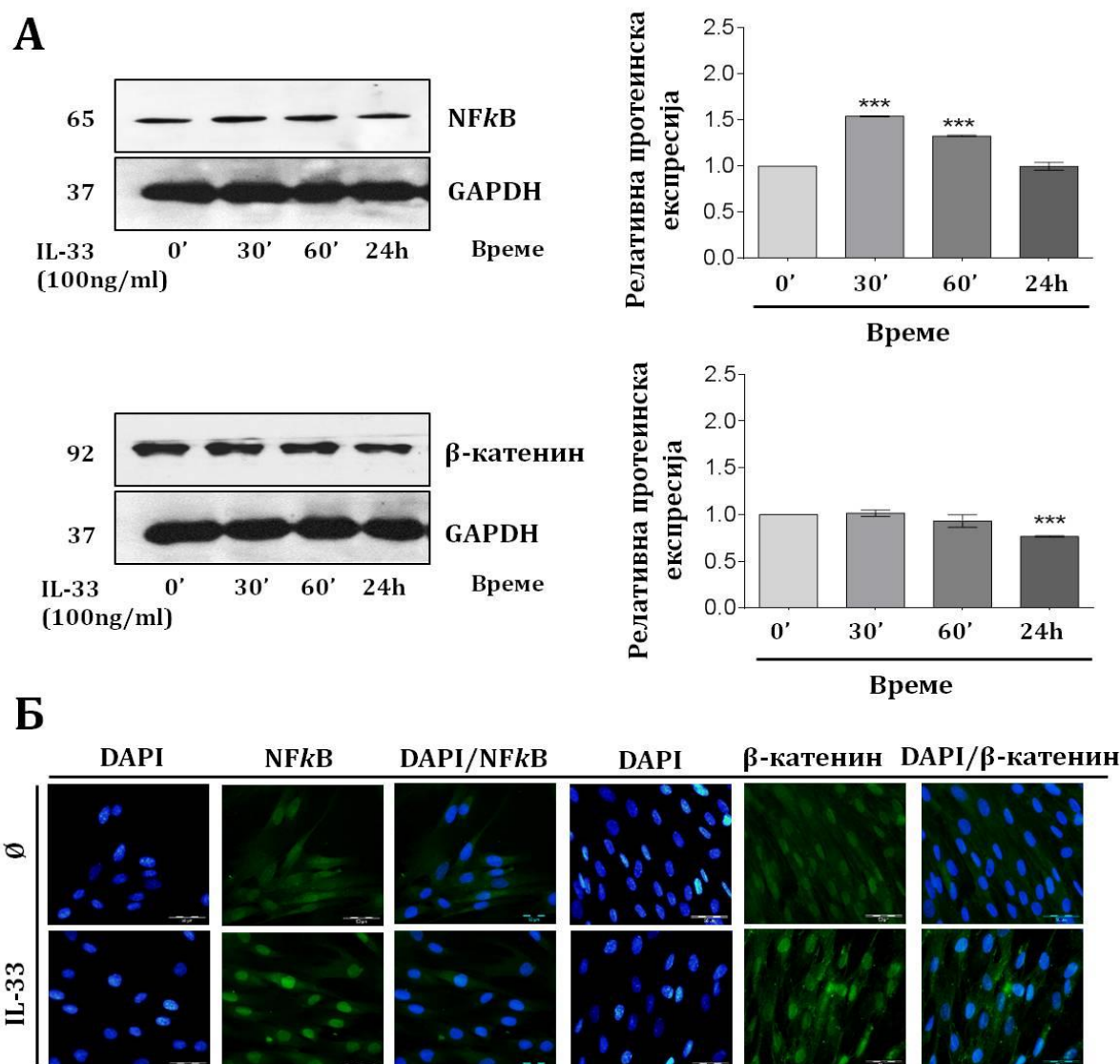
Слика 37. Утицај IL-33 на старење ПД-ММЋ током остеогене диференцијације. (А) Детекција експресије ензима β -галактозидазе у монослоју ПД-ММЋ. Ћелије нижих (П4) и виших (П7) пасажа засејаване су у плоче за културу ћелија и култивисане до субконфлуентности када је стандардни медијум (СМ) замењен остеогеним (ОМ) са или без IL-33 (100 ng/ml). Након 7 дана третмана детектована је активност β -галактозидазе. Приказане су репрезентативне слике ћелија у култури. (Б) Детекција активности ензима β -галактозидазе у појединачним ћелијама. Ћелије су одлепљиване и поново постављане у плоче за култивацију ћелија са 96 бунара (2000 ћелија/бунару). Како би адхерирале ћелије су култивисане наредних 6h у стандардним условима, након чега је одређивана активност β -галактозидазе. Приказане су репрезентативне слике појединачних ћелија, а вредност размере износи 50 μ m. Резултати су графички представљени као средња вредност броја ћелија које експримирају β -галактозидазу \pm SE добијених из три независна експеримента. Вредности су нормализоване, а статистички значајна разлика у односу на контролу (ћелије култивисане у стандардном медијуму у одсуству IL-33) према Student-овом t-тесту: *** $p < 0.001$; или у односу на ћелије култивисане у остеогеном медијуму у одсуству IL-33: ** $p < 0.01$.

4.3.5. УТИЦАЈ IL-33 НА ЕКСПРЕСИЈУ NF- κ B И β -КАТЕНИНА КОД ПД-ММЋ

У контексту утврђивања молекулске основе промена код ПД-ММЋ изазваних под утицајем IL-33 анализирана је експресија, односно активација транскрипционих фактора NF- κ B и β -катенин.

Применом *Western blot* метода показано је да у присуству IL-33 долази до значајног повећања експресије NF- κ B, након 30 и 60 минута у поређењу са експресијом детектованом у контролном узорку ћелија, али и да се овај ефекат смањује након 24h. Са друге стране, анализа експресије β -катенина показује да IL-33 доводи до значајног смањења експресије овог протеина тек након 24h у ПД-ММЋ у односу на експресију испољену код нетретираних ћелија (**Слика 38А**), што би могло да укаже на стимулацију деградације цитоплазматске форме β -катенина под утицајем IL-33.

На основу имунофлуоресентног обележавања, додатно су анализирани промене и у локализацији ових транскрипционих фактора унутар ПД-ММЋ након 72h третмана са IL-33 (100 ng/ml). На **Слици 38Б**, уочава се да, услед присуства IL-33 код ПД-ММЋ долази до повећања експресије NF- κ B транскрипционог фактора у једру, иако *Western blot* анализа показује смањење активности NF- κ B у укупним ћелијским лизатима (**Слика 38А**). Такође, запажа се и да под утицајем IL-33 долази до повећања експресије β -катенина у једру ПД-ММЋ, што заједно указује да IL-33 може да регулише експресију NF- κ B и β -катенина на нивоу укупних протеина, али и њихову унутарћелијску локализацију код ПД-ММЋ.



Слика 38. Утицај IL-33 на активацију NF- κ B и β -катенин сигналних путева у ПД-ММЋ. (А) Ћелије су током 30 и 60 минута, као и 24h третиране са IL-33 (100 ng/ml), након чега је у ћелијским лизатима укупних протеина *Western blot* методом одређивана експресија NF- κ B, β -катенина, као и GAPDH као контролног протеина. Резултати су графички представљени као однос експресије NF- κ B/GAPDH и β -катенин/GAPDH, при чему су вредности нормализоване у односу на нетретирану контролу (0') и приказани су као средња вредност \pm SE за три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролне ћелије гајене у одсуству IL-33 према Student-овом t-тесту: *** p <0.001. Приказане су слике репрезентативних протеинских трака, док је њихова молекулска маса изражена у kDa. (Б) Експресија NF- κ B и β -катенин транскрипционих фактора одређена индиректним имунофлуоресцентним обележавањем након 72h третмана са IL-33 (100 ng/ml) применом примарних антитета за NF- κ B и β -катенин антитета и следственим бојењем са одговарајућим FITC-коњугованим секундарним антителима (зелено), док су једра обележавана флуоресцентном DAPI бојом (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије добијене сликањем на епифлуоресцентном микроскопу. Вредност размере износи 50 μ m.

4.3.6. УЛОГА NF- κ B И B-КАТЕНИНА У СТИМУЛИСАНОЈ ЕКСПРЕСИЈИ ФАКТОРА ПОВЕЗАНИХ СА ПЛУРИПОТЕНЦИЈОМ КОД ПД-ММЋ У ПРИСУСТВУ IL-33

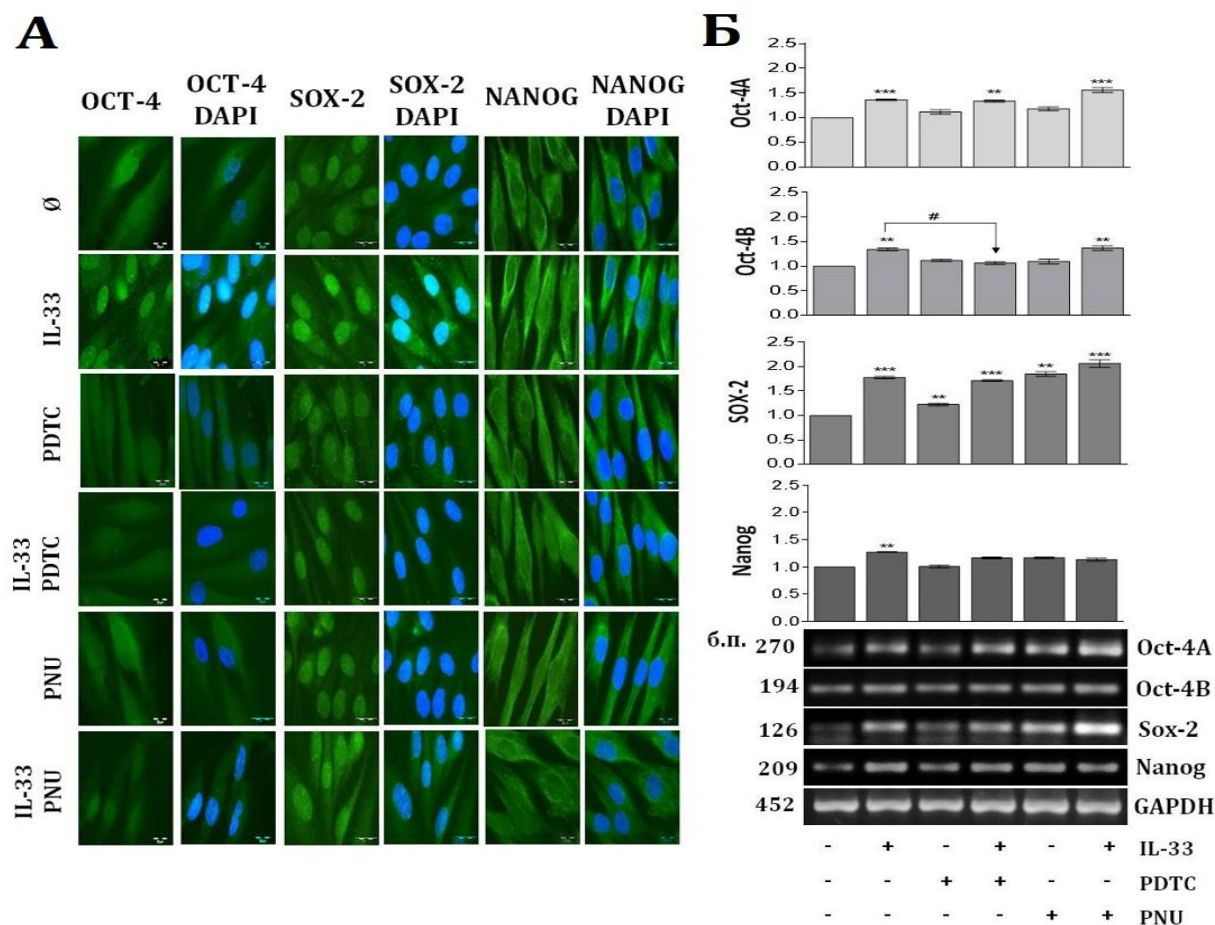
У наставку истраживања анализирана је улога NF- κ B и β -катенин сигналних путева у регулацији стимулације експресије фактора плурипотентности ПД-ММЋ које индукује IL-33 (**Слика 32В и 39**), при чему је одређивана експресија маркера плурипотентности укључујући OСТ-4, SOX-2 и NANOG. У те сврхе коришћени су специфични фармаколошки инхибитори NF- κ B (PDTC) и β -катенина (PNU).

Имунофлуоресцентним обележавањем OСТ-4 протеина показано је да услед присуства PDTC и PNU код ПД-ММЋ долази до инхибиције стимулаторног дејства IL-33, при чему PDTC инхибира и базалну експресију овог фактора, док PNU сам не утиче базалну експресију OСТ-4 код ПД-ММЋ (**Слика 39А**). Међутим, промене индуковане присуством PDTC и PNU не уочавају се у потпуности на генском нивоу, док ови инхибитори не мењају конститутивну експресију OСТ-4А и OСТ-4В. Наиме, иако IL-33 значајно стимулише експресију OСТ-4А и OСТ-4В гена, присуство PDTC или PNU не доводи до смањења експресије OСТ-4А гена индуковане присуством IL-33. Са друге стране, присуство PDTC блокира стимулацију експресије OСТ-4В гена коју остварује IL-33, за разлику од PNU који не испољава овај ефекат (**Слика 39Б**).

Као што је приказано на **Слици 39Б** запажа се да у присуству PDTC код ПД-ММЋ не долази до промена конститутивне протеинске експресије SOX-2 молекула, као ни експресије испољене у присуству IL-33. Иако PDTC благо стимулише базалну генску експресију SOX-2, овај инхибитор не утиче на експресију SOX-2 гена остварену под утицајем IL-33. Са друге стране, PNU индукује повећање базалне експресије SOX-2 молекула, како на генском, тако и на протеинском нивоу независно од присуства IL-33 (**Слика 39А и 39Б**).

Анализа протеинске експресије NANOG молекула, приказана на **Слици 39А**, показује да примена PDTC инхибитора не модификује конститутивну протеинску и генску експресију овог фактора, али се уочава да у присуству IL-33, PDTC благо повећава локализацију NANOG у једру. Истовремено, присуство PDTC условљава смањење повећања иРНК експресије за NANOG коју индукује IL-33 (**Слика 39А и 39Б**). Такође, услед присуства PNU инхибитора код ПД-ММЋ долази до благе стимулације базалног нивоа NANOG протеина, док у третману заједно са IL-33 PNU,

слично као и PDTC, подстиче једарну локализацију овог протеина (**Слика 39А**). На генском нивоу, примена PNU инхибитора не индукује промене у конститутивној експресији NANOG молекула, али благо инхибира експресију овог гена испољену у присуству IL-33 (**Слика 39Б**).



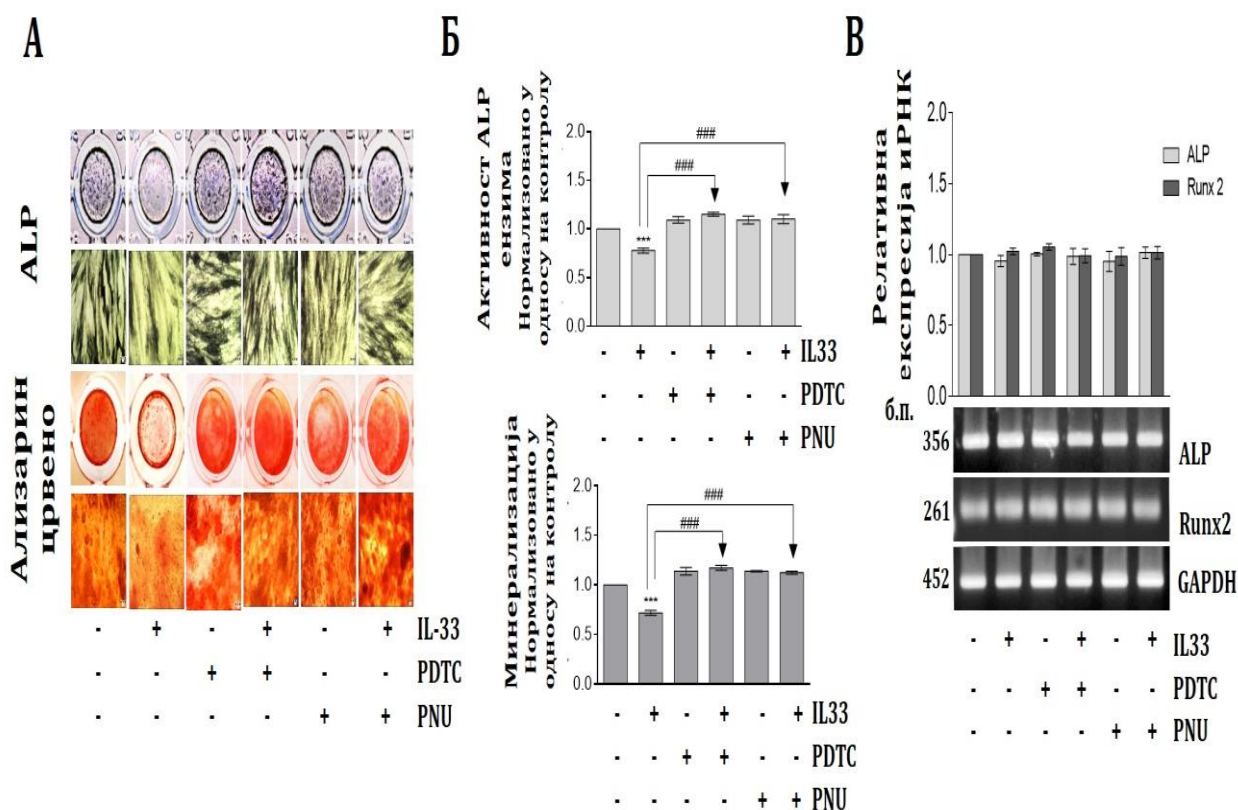
Слика 39. Улога NF-κB и β-катенина у експресији маркера плурипотентности код ПД-ММЋ индукованој деловањем IL-33. Ћелије су гајене током 7 дана у стандардном медијуму у присуству или одсуству IL-33 (100 ng/ml), као и у присуству или одсуству инхибитора NF-κB (PDTC, 2 μM, Tocris) или инхибитора β-катенина (PNU 74654, 5 μM, Sigma Aldrich). Инхибитори су додавани у културе 30 минута пре почетка третмана са IL-33. За потребе анализирања генске експресије ПД-ММЋ гајене су у истим експерименталним групама у стандардном медијуму за култивацију током 24h. **(А)** Експресија маркера плурипотентности одређена индиректним имунофлуоресцентним обележавањем примарним антителима за OCT-4, SOX-2 и NANOG и следственим бојењем одговарајућим FITC-коњугованим секундарним антителима (зелено), док су једра обележавана флуоресцентном DAPI бојом (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије добијене сликањем на епифлуоресцентном микроскопу. Вредност размере износи 20 μm. **(Б)** Генска експресија специфичних маркера плурипотентности одређивана је применом RT-PCR. Резултати су представљени као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству IL-33), а на графицима су приказани резултати средњих вредности ± SE три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту: **p<0.01; ***p<0.001; или у односу на ПД-ММЋ третиране са IL-33: #p<0.05. Приказане су слике репрезентативних гелова, док је њихова величина изражена у броју базних парова (б.п.).

4.3.7. УЛОГА NF- κ B И В-КАТЕНИНА У ИНХИБИЦИЈИ ОСТЕОГЕНЕ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈЕ ПД-ММЋ У ПРИСУСТВУ IL-33

Будући да је IL-33 током третмана испољио инхибиторни ефекат на остеогену диференцијацију ПД-ММЋ, како кроз смањење експресије ALP ензима, тако и кроз редукацију минерализације ванћелијског матрикса (**Слика 33А** и **Слика 34А**), у следећем кораку испитивани су и молекулски механизми који посредују у овом ефекту IL-33.

Добијени резултати, представљени на **Слици 40**, показују да на ћелијском нивоу (ALP активност), као и на нивоу минерализације ванћелијског матрикса, примена PDTC и PNU у потпуности блокира инхибицију остеогенезе коју индукује IL-33, при чему ни PDTC ни PNU не доводе до промена базалног нивоа остеогене диференцијације остварене при гајењу ћелија само у остеогеном медијуму (**Слика 40А** и **40Б**). Међутим, запажа се да се ови ефекти не остварују на генском нивоу, с обзиром да у поређењу са конститутивном експресијом, код третираних ћелија нису забележене значајне промене у експресији иРНК за ALP и Runx2 молекуле (**Слика 40В**).

Стога, имајући у виду да ефекти PDTC и PNU, одређени хистохемијским анализама, нису показани и на генском нивоу, може се претпоставити да инхибиција остеогенезе ПД-ММЋ коју индукује IL-33 не мора бити остварена директно кроз интеракцију NF- κ B и β -катенина са молекулима непосредно укљученим у контролу остеогенезе, као што су Runx2 и ALP.

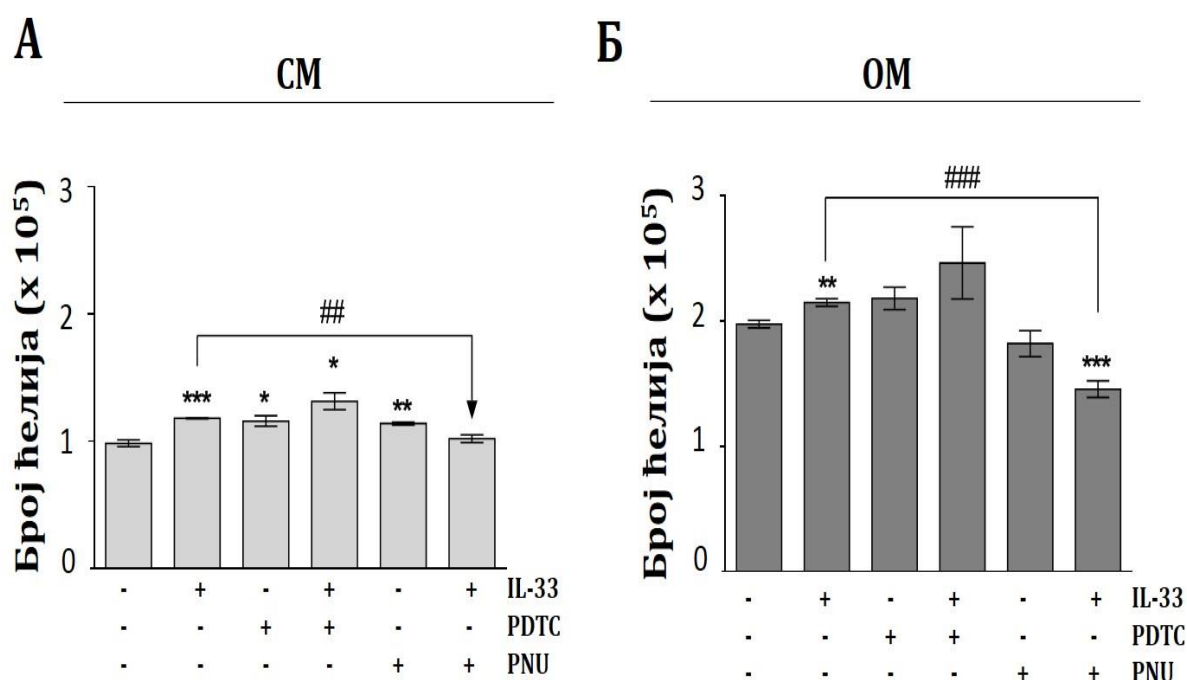


Слика 40. Улога NF-κB и β-катенина у модулатији остеогеног потенцијала ПД-ММЋ индукованог под утицајем IL-33. Ћелије су засејаване плоче за културу ћелија са 96 бунара (5000 ћелија/бунару) и култивисане до субконфлуентности када је започета остеогена диференцијација у присуству или одсуству IL-33 (100 ng/ml), као и у присуству или одсуству инхибитора NF-κB (PDTC, 2 μM, Tocris) или инхибитора β-катенина (PNU 74654, 5 μM, Sigma Aldrich), при чему су инхибитори додавани у културе 30 минута пре почетка третмана са IL-33. За потребе анализирања генске експресије ПД-ММЋ култивисане су у истим експерименталним групама у стандардном медијуму за култивацију током 24h. **(А)** Остеогена диференцијација одређена након 7 дана третмана на основу експресије ALP ензима, као и након 14 дана на основу минерализације (Ализарин црвено бојење). **(Б)** Квантификација остеогене диференцијације ПД-ММЋ. **(В)** Генска експресија маркера специфичних за остеогену диференцијацију. Резултати експресије иРНК за специфичне маркере остеогене диференцијације, одређиване применом RT-PCR, представљени су као однос експресије датог гена и експресије GAPDH, као контролног гена. Вредности су нормализоване у односу на контролу (ћелије култивисане у одсуству IL-33), а на графицима су приказани резултати средњих вредности ± SE три независна експеримента. Приказане су слике репрезентативних ћелија у култури (вредност размере износи 50 μm), као и слике репрезентативних гелова, док је њихова величина изражена у броју базних парова (б.п.). Статистички значајна разлика у односу на контролу према Student-овом t-тесту:***p<0.001; или у односу на ПД-ММЋ третиране са IL-33: ### p<0.001.

4.3.8. УЛОГА NF- κ B И В-КАТЕНИНА У МОДУЛАЦИЈИ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ ПД-ММЋ ИНДУКОВАНЕ ПРИСУСТВОМ IL-33 ТОКОМ ОСТЕОГЕНЕ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈЕ

С обзиром да је претходно показано да IL-33 (100 ng/ml) стимулише пролиферацију ПД-ММЋ након 7 дана култивације, како у стандардном медијуму, тако и у остеогеном медијуму (**Слика 35А**) у наставку истраживања испитивана је улога NF- κ B и β -катенин сигналних путева у испољеним ефектима IL-33.

На основу прикупљених резултата уочава се да присуство PDTC у стандардном медијуму благо стимулише пролиферацију ПД-ММЋ у односу на контролну групу ћелија култивисаних само у стандардном медијуму, али да не утиче на стимулаторни ефекат који остварује IL-33 (**Слика 41А**). При култивацији ПД-ММЋ у остеогеном медијуму у присуству или одсуству IL-33, PDTC благо повећава број ћелија у поређењу са бројем ћелија у самом остеогеном медијуму (**Слика 41Б**). Са друге стране, иако присуство PNU у стандардном медијуму доводи до повећања броја ПД-ММЋ у поређењу са ћелијама гајеним само у стандардном медијуму, у истим условима заједно са IL-33, PNU значајно инхибира стимулаторни ефекат овог цитокина (**Слика 41А**). Такође, не мењајући бројност ПД-ММЋ након култивације у остеогеном медијуму, PNU значајно поништава стимулаторни ефекат који индукује IL-33 (**Слика 41Б**).



Слика 41. Улога NF- κ B и β -катенина у модулацији пролиферације ПД-ММЋ индуковане под утицајем IL-33 током остеогене диференцијације. Ћелије су засејаване у плоче за културу ћелија, култивисане до субконфлуентности у стандардним условима, када је ћелијама додат свеж стандардни или остеогени медијум са или без IL-33 (100 ng/ml), као и у присуству или одсуству инхибитора NF- κ B (PDTC, 2 μ M, Tocris) или инхибитора β -катенина (PNU 74654, 5 μ M, Sigma Aldrich), при чему су инхибитори додавани у културе 30 минута пре почетка третмана са IL-33. Након 7 дана култивације пролиферација ПД-ММЋ одређивана је бојењем Трипан плавим раствором. **(А)** Стандардни медијум (СМ). **(Б)** Остеогени медијум (ОМ). Резултати су графички представљени као средња вредност \pm SE из три независна експеримента. Статистички значајна разлика у односу на ћелије култивисане у стандардном или остеогеном медијуму у одсуству IL-33 према Student-овом t-тесту: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; или у односу на ПД-ММЋ третиране са IL-33: ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

5.

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Интензивна истраживања у области биологије матичних ћелија имају за циљ постављање темеља за развој терапија заснованих на примени ћелија у циљу лечења обољења која конвенционалним методима не могу бити третирана. У оквиру истраживања савремене регенеративне медицине, посебна пажња усмерена је на ММЋ чија употреба не повлачи за собом спорна етичка питања, а истовремено омогућава развијање терапија прилагођених сваком пацијенту. Ипак, иницијална очекивања од примене ММЋ до сада нису испуњена, а такође новији подаци указују да ове ћелије могу имати и нежељен ефекат. Поред тога, свеобухватна истраживања ММЋ изолованих из различитих ткивних извора данас недвосмислено указују на то да, иако ове ћелије поседују одређене заједничке одлике на основу којих се сврставају у ММЋ, популације ММЋ различитих ткива поседују значајне функцијске особености. На основу тога, намеће се закључак да разлике између ММЋ могу бити последица пре свега њиховог порекла и физиолошког микроокружења где ове ћелије врше своје функције. Заједно, ови налази истичу неопходност додатних истраживања како би се сагледали сви аспекти потенцијалне примене ММЋ (**Mahla 2016; Galipeau & Sensébé 2018**). Истраживања матичних ћелија нарочито су значајна као потенцијални начин третмана великих оштећења ткива и органа, као и ткива и органа која имају слаб регенеративни потенцијал. Орофацијално ткиво представља регион са јако slabим потенцијалом регенерације, али истовремено савремена истраживања показују да је ово ткиво изузетно богат извор матичних ћелија. Поред тога, ова ткива су приступачна, а њихово прикупљање се врши након редовних процедура што је веома погодно својство. С обзиром да истраживања указују на хетерогеност орофацијалих матичних ћелија, која се одражавају и на њихове *in vivo* одлике, јасно је да познавање особености ММЋ различитих ткива орофацијалног региона, као и њихов одговарајући одабир има пресудан значај за успешну примену у ћелијској терапији (**Tatullo et al., 2015; Sacchetti et al., 2016; Shakoori et al., 2017**).

Посебно атрактиван извор ММЋ денталног порекла представља ткиво периодонцијума, с обзиром да се ово ткиво може узорковати једноставно, у

склопу редовне интервенције индиковане екстракције зуба (**Soheilifar et al., 2016**). Иако студије показују да ПД-ММЋ поседују карактеристике погодне за ширу клиничку примену, њихова својства и активности у различитим условима средине и биолошким системима нису до краја расветљена (**Liu et al., 2008; Huang et al., 2009; Ding et al., 2010; Mrozik et al., 2013; Han et al., 2014; Zhu & Liang 2015; Abdel Meguid et al., 2017**). У оквиру периодонцијума резидентне ММЋ одговарају на различите активационе стимулусе присутне у микроокружењу. На тај начин ове ћелије учествују у ткивној хомеостази, диференцијацији и обнови потпорног ткива зуба, укључујући ткиво периодонцијума, цемента и алвеоларне кости (**Lekic & McCulloch 1996; Nanci & Bosshardt 2006; Tatullo et al., 2015**). С обзиром да учествују у обнављању ткива, интеракција ових ћелија са инфламаторном средином као окидачем регенеративних процеса је есенцијални део процеса опоравка ткива. Истовремено, инфламаторна микросрединa значајно може допринети модулацији биолошких функција ПД-ММЋ (**Liu et al., 2017**), што је важно за познавање улоге ових ћелија у основи патолошких стања периодонцијума. Уједно, познавање испољавања функцијских промена ПД-ММЋ под утицајем инфламаторне микросредине значајно је и при разматрању могућности њихове примене у ћелијској терапији, с обзиром да пародонтопатија, као најраспрострањеније обољење потпорног ткива зуба, представља хронично инфламаторно обољење.

Имајући у виду наведене налазе, у оквиру ове тезе испитивана су регенеративна и имуномодулаторна својства ПД-ММЋ под утицајем LPS као важног иницијатора инфламације у оквиру ткива усне дупље, као и ендогеног алармина IL-33 чије је присуство у денталном региону релативно недавно показано.

Упркос томе што подаци у литератури показују да LPS може инхибирати (**Trubiani et al., 2012; Diomedede et al., 2017**), али и стимулирати (**Kato et al., 2014**) раст и пролиферацију ПД-ММЋ, наша истраживања указују да LPS не модификује метаболичку активност ни пролиферацију ПД-ММЋ. Ови резултати у сагласности су са резултатима других аутора који показују да LPS (*P. gingivalis*), као ни LPS (*Escherichia coli*) не утичу на пролиферацију и вијабилност ПД-ММЋ, односно

CD105⁺ субпопулацију ПД-ММЋ (Albiero et al., 2015; Albiero et al., 2017). У складу са овим резултатима, наша истраживања су показала да LPS не утиче на ћелијски циклус ПД-ММЋ, што је забележено и код ММЋ изолованих из Вартонове слузи (Mei et al., 2013). Међутим, резултати поновљене стимулације ММЋ зубне пулпе са LPS показују да LPS код ових ћелија може проузроковати успоравање ћелијског циклуса (Feng et al., 2014). Ови налази јасно упућују на постојање специфичног функцијског одговора ММЋ у зависности од њиховог ткивног порекла, потврђујући неопходност сагледавања биолошких функција ММЋ специфичних за сваки ткивни извор. Поред тога, наши резултати показују да LPS не утиче на имунофенотип ПД-ММЋ, што и потврђују истраживања других аутора (Albiero et al., 2017). Уз експресију мембранских маркера ММЋ, у нашим резултатима показано је да ПД-ММЋ експримирају и маркере плурипотентности укључујући ОСТ-4А, ОСТ-4В, SOX-2 и NANOG што је складу са налазима да хумане матичне ћелије изоловане из оралних ткива задржавају матичност, као и пролиферацију током дуготрајне *in vitro* култивације (Diomedede et al., 2017). Истовремено, наши резултати показују да LPS не модификује генску експресију ових фактора. Експресија маркера матичности код матичне ћелије оралних ткива често се повезује са њиховим пореклом из нервне кресте. Наиме, матичне ћелије током развића мигрирају из овог ткива и успостављају популације матичних ћелија у различитим анатомским регионима укључујући орална ткива (Nagoshi et al., 2008; Takashima et al., 2017). Наши претходни резултати такође указују да ПД-ММЋ поседују већу експресију маркера плурипотентности и способност пролиферације у односу на ММЋ изоловане из других ткива, као што су ММЋ масног ткива (Trivanović et al., 2015), а што може представљати пожељна својства ПД-ММЋ у ћелијској терапији (Uribe-Etxebarria et al., 2017). Уједно се и на нивоу ових ћелијских параметара запажа хетерогеност у оквиру популација ММЋ из различитих ткивних извора, указујући на неопходност разумевања јединствених функцијских својстава ММЋ које су последица њиховог ткивног порекла.

Поред утврђивања ефеката на вијабилност, и испољавање фенотипа ММЋ, за процену регенеративног потенцијала од великог значаја представља

познавање регулације линијске опредељености и диференцијације ових ћелија. У оквиру ткива периодонцијума, нарочита пажња истраживача усмерена је ка испитивању остеогеног потенцијала ПД-ММЋ. Наиме, ПД-ММЋ налазе се у периодонцијуму, меком, везивном ткиву које је окружено чврстим минерализованим ткивима корена зуба (цемент) и алвеоларне кости. Из ових разлога, одржавање нивоа минерализације околних ткива представља главни физиолошки захтев ткива периодонцијума. Стога адекватна регулација минерализације, омогућава прилагођавање ткива периодонцијума функционим захтевима. Осим у физиолошким условима, током узрапредовале фазе запаљења потпорног ткива зуба може доћи и до нарушавања интегритета алвеоларне кости. Као последица ових патолошких промена, значајно је сужен избор метода лечења овог обољења, с обзиром да је одговарајући ниво чврстине коштаног ткива основа за успешни протетски третман. Стога је и у клиничком контексту важно разумевање механизма модулације остеогеног потенцијала ПД-ММЋ у инфламаторним условима, будући да су ове ћелије кључни извор прогенитора остеобласта у ткиву периодонцијума. Наши резултати показују да LPS има изражено инхибиторно дејство на остеогену диференцијацију, како на нивоу активности ALP ензима, тако и на нивоу минерализације. Ови ефекти потврђени су на генском нивоу с обзиром да је под утицајем LPS детектована значајна инхибиција експресије најзначајнијих гена за остеогену диференцијацију укључујући Runx2, ALP и остеокалцин. Ови резултати у сагласности су са претходно показаним инхибиторним ефектом LPS (*P. gingivalis*) на активност ALP ензима, продукцију COL1A1 (*collagen, type I, alpha 1*) и остеокалцина код ПД-ММЋ (Kato et al., 2014). Слично томе, смањење остеогеног потенцијала ПД-ММЋ у присуству LPS утврђено је и у истраживању Li и сарадника (2014), при чему је показано да је овај ефекат посредован активацијом NF-κB транскрипционог фактора. Поред LPS, показано је да и други фактори присутни у инфламаторној средини попут IL-17 (Okić-Dorđević et al., 2016), IL-7 (Jian et al., 2016) и TNF-α (Tan et al., 2016) испољавају инхибиторно дејство на остеогену диференцијацију ПД-ММЋ. Ови налази наводе на закључак да инфламација, кроз смањење остеогеног потенцијала диференцијације ПД-ММЋ, може доприносити

нарушавању интегритета алвеоларне кости, односно знатној прогресији обољења потопрног ткива зуба. Међутим, на супрот свим овим налазима, запажено је да под утицајем LPS (*E. coli*) остеогена диференцијација CD105⁺ субпопулације ПД-ММЋ стимулирана, што је поред повећане минерализације матрикса било праћено и повећаном генском експресијом Runx2 и ALP молекула (**Albiero et al., 2105**). Стога, иако је модулација остеогенезе, као правца диференцијације ПД-ММЋ највише изучавана, може се закључити да утицај LPS на ПД-ММЋ није у потпуности разјашњен, а показани ефекти могу бити последица и различите активности LPS пореклом из разноврсних бактеријских извора.

Изузев остеогене диференцијације, и подаци у вези са утицајем биолошки активних молекула на друге правце диференцијације ПД-ММЋ веома су оскудни. Из ових разлога, а имајући у виду значај укупног диференцијационог потенцијала ПД-ММЋ, у нашим истраживањима испитиван је утицај LPS на хондрогену и адипогену диференцијацију ПД-ММЋ. За разлику од инхибиције остеогене диференцијације, хондрогена и адипогена диференцијација ПД-ММЋ биле су стимулиране у присуству LPS. Повећан ниво хондрогене диференцијације код ПД-ММЋ третираних са LPS, био је испољен и на генском нивоу, с обзиром да је детектована стимулација експресије Sox-9 гена. У одређеној мери, ови налази су у складу са показаном стимулацијом хондрогене диференцијације ММЋ костне сржи људи под утицајем LPS посредством NF-κB сигналним путем (**Caron et al., 2012**). Слично томе, LPS је стимулисао стварање липидних капљица и експресију PPAR-γ гена, односно адипогену диференцијацију. На основу ових резултата може се претпоставити да LPS може бити значајан усмеравајући/регулаторни фактор у диференцијацији ПД-ММЋ, с обзиром да је инхибиција диференцијације ка једној ћелијској лози праћена стимулацијом другог диференцијационог правца. Иако су адипогена и хондрогена диференцијација ПД-ММЋ упитне у условима *in vivo* (**Mao & Prockop 2012**), ови резултати указују да се ипак не може искључити чињеница да LPS може учествовати у преусмеравању диференцијације ПД-ММЋ. Поред тога, индукујући фенотип ПД-ММЋ који није препознат као носилац регенеративних процеса у физиолошким условима, LPS може допринети развоју неких патолошких промена. Наиме, накупљање неутралних липидних капљица у

цитоплазми може бити у основи метаболичких промена у ћелијама (**Thiam et al., 2013**), узрокујући старење ћелија и оксидативни стрес, као што је показано код ММЋ зубне пулпе третираних са LPS (**Feng et al., 2014**). С обзиром да у нашим експериментима није запажено сједињавање липидних капљица код ПД-ММЋ, може се претпоставити да адипогена диференцијација ПД-ММЋ може бити и последица *in vitro* услова култивације, али и промена у метаболизму ћелија.

Досадашња истраживања молекулских механизма укључених у дејство LPS показују да LPS индукује фосфорилацију и активацију бројних сигналних путева у цитоплазми ћелија. Следственом активацијом транскрипционих фактора регулише се и усмерава одговор ћелије на стимулус (**Botero et al., 2010**). Један од добро познатих сигналних путева који LPS у различитим ћелијама активира је MAPK сигнални пут који укључује систем киназа серин/треонинске фамилије (**Watters et al., 2002**). Наиме, MAPK сигнални пут координише бројне ћелијске процесе укључујући раст ћелија, одговор на оштећење и стрес, активацију ћелија урођене имуности, апоптозу, диференцијацију и друге функције ћелија (**Watters et al., 2002; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2004; Suganuma & Workman, 2012**). Поред физиолошких одговора, ова сигнализација посредује и патолошким стањима попут различитих малигнитета, неуродегенеративних и кардиоваскуларних обољења (**Raman et al., 2007; Dhillon et al., 2007; Munoz & Ammit 2010**). Главни учесници сигналне каскаде MAPK сигнализације су ERK (од енгл. *Extracellular signal-Regulated Kinases*), киназе c-Jun N- терминалног краја (JNKs) и p38 MAPK (**Keshet & Seger, 2010**). Активацијом ових ензима, следствено се активира велики број цитоплазматских и једарних транскрипционих фактора и у ћелији индукује ткивно специфични одговор. Имајући у виду да је претходно показано да LPS активира MAPK сигнализацију и код ММЋ денталних ткива (**Botero et al., 2010; Wang et al., 2013; He et al., 2015**) у нашим испитивањима утврђивана је активност овог сигналног пута код ПД-ММЋ. Анализа ефекта LPS на активацију све три класе MAPK ERK1,2, p38 и JNK сигналног пута показала је да се у присуству овог фактора након 24h стимулације активира само ERK1,2 сигнализација, с обзиром да је повећање фосфорилисаног облика утврђено само код овог протеина. Како је у нашим испитивањима уочено да LPS може

модулисати диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ, анализирана је и укљученост ERK1,2 сигнализације у ове промене. Наши резултати показују да ERK1,2 сигнализација може у одређеној мери бити кључна у диференцијацији коју код ПД-ММЋ регулише LPS. Добијени налази у складу су са резултатима приказаним код *Maο* и сарадника, који су показали да активација ERK1,2 сигнализације посредује у инхибицији остеогене диференцијације ПД-ММЋ (2016). Поред тога, наши резултати указују и да ERK1,2 вероватно није директно укључен у инхибицију остеогене диференцијације код ПД-ММЋ третираних са LPS путем модификације Runx2 транскрипционог фактора. Насупрот томе, на основу експресије *Sox-9* и *PPAR-γ* гена наслућује се значајнија укљученост ERK1,2 у стимулацији хондрогене и адипогене диференцијације. Међутим, без обзира на укљученост транскрипционих фактора, повећана адипогена и/или хондрогена диференцијација показана у нашој студији упућује на могуће негативне ефекте LPS на регенерацију периодонцијума, што ће будућим истраживањима бити неопходно потврдити. Слично нашим резултатима и улози ERK1,2 у диференцијацији ПД-ММЋ, показано је да је овај сигнални пут кључан у хондрогеној (Arita et al., 2011), али и адипогеној диференцијацији ММЋ костне сржи (Li et al., 2016). Интересантно је запазити да код ММЋ различитог ткивног порекла исти сигнални путеви могу бити посредници диференцијационих процеса ових ћелија. Ипак, јединствена својства различитих популација ММЋ засигурно условљавају и активацију ткивно специфичних одговора на молекулском нивоу, што потврђује значај познавања молекулских механизма у регулацији биолошких функција својствених ММЋ сваког ткивног извора.

При сагледавању регенеративног капацитета ММЋ, важну одлику ових ћелија представља њихова миграторна способност. Наиме, највећи број потенцијалних стратегија у ћелијској терапији заснива се на системској апликацији ових ћелија, што захтева ефикасну миграцију и привлачење примењених ћелија на циљно место. Међутим, механизми којима ММЋ остварују ове функције нису до краја испитани (Nagyova et al., 2014; De Becker & Van Riet 2016). Један од претпостављених механизма подразумева да фактори раста, као и инфламаторна микросредина и фактори секретовани од стране оштећеног ткива

утичу на миграторна својства ММЋ и усмеравају њихову активност. Из ових разлога данас се интензивно испитују ефекти различитих фактора који би могли бити искоришћени у циљу побољшавања миграторних способности ММЋ за потенцијалну терапијску примену (Sohni & Verfaillie 2013; Eggenhofer et al., 2014; Zachar et al., 2016). Насупрот томе, у физиолошким условима резидентне ММЋ највероватније бивају подстакнуте на миграцију факторима присутним у локално оштећеном ткиву како би регионално испољиле своје регенеративне функције. Ипак, резултати миграторног потенцијала ММЋ нису конзистентни, а уочава се разлика између ефеката истих фактора на ММЋ различитих ткивних извора. Код ПД-ММЋ изолованих из ткива захваћеног инфламацијом показан је виши миграторни потенцијал (Park et al., 2011), што би потенцијално могао бити повољан механизам током регенеративног процеса, захваљујући накупљању ових ћелија на месту оштећења потпорног ткива зуба. За разлику од ових података, резултати *in vitro* истраживања спроведених у оквиру ове тезе показују да LPS не утиче на покретљивост ПД-ММЋ. Са друге стране, у присуству LPS показана је повећана миграторна способност ММЋ паратиroidне жлезде (Brandau et al., 2010). Слично двојаким ефектима LPS, зависних од ткивног извора ММЋ, наша претходна истраживања показала су да IL-17, као проинфламаторни фактор, може испољавати различите ефекте на миграцију ММЋ у зависности од њиховог ткивног порекла. Са једне стране, у условима *in vitro*, IL-17 инхибира миграторну способност ПД-ММЋ (Okić-Đorđević et al., 2016), док стимулише миграцију ММЋ периферне крви (Krstić et al., 2015). Стога се и на примеру миграторне способности ММЋ јасно уочавају разлике у функцијском одговору које се највероватније могу објаснити као последица ткивног порекла ММЋ, односно њиховим различитим функцијама које врше у ткиву у коме се физиолошки налазе. Осим тога, не треба занемарити ни чињеницу да и специфично микроокружење у којима се резидентне ММЋ налазе значајно обликује функцијски одговор ММЋ сходно потребама организма у датом тренутку.

Иако наша истраживања показују да LPS не утиче на миграцију ПД-ММЋ, у овој студији је показано да LPS стимулише контрактилност ових ћелија. Наиме,

најновија истраживања указују да миграторна способност ћелија може бити у корелацији са другим ћелијским функцијама, укључујући имуносупресивни (**Bertolo et al., 2017**) и диференцијациони потенцијал (**Andersen et al., 2015; Desai et al., 2014**).

Имајући у виду да је утврђено постојање обрнуте корелације између способности миграције, као својства ћелија сличним фибробластима, и контрактилности, као својства миофибробласта (**Desai et al., 2014**), следећи циљ наших истраживања био је испитивање контрактилности и експресије маркера миофибробласта код ПД-ММЋ у присуству LPS.

Наиме, диференцијација миофибробласта представља кључан догађај током регенеративног процеса и обнове ткива. Управо контрактилна својства ових ћелија омогућавају физиолошко ремоделовање ткива. Међутим, прекомерна активација миофибробласта може имати штетне ефекте, узрокујући стварање хипертрофичних ожиљака, као и фиброзно ткиво у различитим обољењима и туморима (**Hinz 2007; Darby et al., 2014**). У оралном ткиву може се претпоставити да током хроничних инфламација, као што су пародонтопатија или хиперпластични гингивитис, миофибробласти испољавају измењене, патолошке функције (**Smith 2018**). Нашим експериментима показано је да LPS стимулише контрактилност и експресију маркера миофибробласта укључујући експресију α -SMA, TGF- β , фибронектина, и NG-2, добро познатих маркера миофибробласта, перицита и прогенитора нервних ћелија. Експресија NG-2 претходно је показана у ћелијама ткива периодонцијума (**Bueno et al., 2013**) и ПД-ММЋ (**Iwasaki et al., 2013**). Сличан правац диференцијације показан је у одговору фибробласта периодонцијума на оптерећење узроковано ортодонским силама (**Xu et al., 2015**) или у одговору ендотелских ћелија услед хемијског стреса (**Kimura et al., 2013**). С обзиром да LPS не модификује миграторни потенцијал ПД-ММЋ, али стимулише експресију маркера миофибробластног фенотипа, наши резултати указују да LPS може подстицати миофибробластну диференцијацију ПД-ММЋ, при чему су индуковане промене посредоване активацијом ERK1,2 сигналног пута. Ови налази у сагласности су са претходно показаним подацима који се односе на улогу ERK1,2 сигнализације у миофибробластној

диференцијацији ендотелских прогениторских ћелија периодонцијума (**Kimura et al., 2013**). Имајући у виду потенцијално позитивне, али и негативне ефекте активности миофибробласта, наши резултати индуковане миофибробластне диференцијације ПД-ММЋ под утицајем LPS, указују на неопходност додатних истраживања како би се расветлила улога миофибробластног фенотипа, индукованог инфламаторним условима, у регенерацији ткива периодонцијума.

Узевши у обзир наведене податке, резултати у оквиру ове тезе указују да LPS, иако не модификује вијабилност, фенотип и миграторну способност ПД-ММЋ, модификујући диференцијациони потенцијал LPS може бити значајан фактор у обликовању укупног регенеративног потенцијала ових ћелија. Уједно, ови налази наводе на закључак да усмеравање диференцијационог процеса може бити механизам којим LPS доприноси измењеној функционости ПД-ММЋ. Следствено томе, индукујући ове функцијске промене код ПД-ММЋ, LPS значајно може условљавати прогресију патолошког стања ткива током инфламаторног обољења пародонцијума.

Поред испитивања ових особина ПД-ММЋ, наша истраживања обухватила су и анализу утицаја LPS на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са имуномодулаторним потенцијалом. Наиме, истраживања показују да ММЋ свих ткивних извора поседују имуномодулаторни капацитет (**Mattar & Bieback 2015**), те је ово својство ММЋ данас предмет опсежних истраживања. С обзиром да су ММЋ костне сржи првооткривени извор ММЋ, као и да физиолошки имају улогу у модулацији сазревања имунских ћелија, имуномодулаторни потенцијал највише је изучаван на овом типу ММЋ, те овај ткивни извор представља „златни стандард“ изолације „класичних“ ММЋ (**Donders et al., 2018**). Међутим, инвазивни методи прикупљања ММЋ костне сржи, као и мали принос изолације, усмерили су истраживања имуномодулаторних својстава ММЋ ка ММЋ других ткива. Међутим, до сада је ограничен број студија у којима се истовремено пореде имуномодулаторни ефекти ових ћелијских популација, што би било значајно за репродукцибилност добијених резултата (**Mattar & Bieback 2015**).

Као резидентне матичне ћелије ткива периодонцијума, ПД-ММЋ учествују у регенеративној микросредини као сензори и/или активни учесници у

комуникацији са факторима и ћелијама имунског система (**Bassir et al., 2016; Andrukhov et al., 2017**). На тај начин ПД-ММЋ могу бити укључене у имуномодулаторне процесе, али и регулацију обољења потпорног ткива зуба (**Racz et al., 2014; Zhu & Liang., 2015**). Иако недавне студије указују на смањене имуносупресивне способности ПД-ММЋ изолованих из ткива захваћеног инфламацијом (**Liu et al., 2012; Tang et al., 2016**), испољавање ових особина ПД-ММЋ није у потпуности разјашњено. Истраживања указују да фактори присутни у гингивалној течности пацијената са пародонтопатијом (**Issaranggun Na Ayuthaya et al., 2017**), као и солубилни фактори секретовани од стране активираних МНЋ периферне крви (**Wada et al., 2009**) могу утицати на имуносупресивни потенцијал ПД-ММЋ. Такође, истраживања показују да LPS, као један од најзначајнијих фактора развоја инфламације, може подстицати продукцију антиинфламаторних (**Moon et al., 2013**), али и проинфламаторних цитокина код хуманих ПД-ММЋ (**Kato et al., 2014**). Ови наизглед контрадикторни резултати указују на сложене механизме регулације имуномодулаторних својстава ПД-ММЋ, као и на још увек неутврђену улогу LPS у обликовању имуномодулаторног потенцијала ПД-ММЋ. Имајући у виду ове непознанице, у оквиру ове тезе анализиран је утицај LPS на интеракцију ПД-ММЋ са лимфоидним и мијелоидним ћелијама периферне крви у условима *in vitro*, као и потенцијални молекулски механизми који се налазе у основи деловања LPS.

Привлачење имунских ћелија на место инфламације представља важан део процеса имунског одговора (**Muller 2011**). Пролазећи кроз ендотелску баријеру имунске ћелије ступају у интеракцију са резидентним ћелијама како би учествовале у ткивној хомеостази, али и обнови ткива. Значај проласка имунских ћелија кроз ендотел утврђен је и у регулацији хомеостазе и обнове ткива периодонцијума (**Bryant et al., 2012**). Међутим, услед неодговарајуће активности имунске ћелије могу узроковати оштећење потпорног апарата зуба (**Jin & Cao, 2015**), због чега је важно познавање механизма регулације овог процеса. У досадашњим истраживањима утицај ПД-ММЋ на трансендотелску миграцију мононуклеарних и полиморфонуклеарних ћелија периферне крви није испитиван. Испитивањима обухваћеним овом тезом по први пут је утврђено да

ПД-ММЋ благо смањују трансендотелску миграцију мононуклеарних ћелија. Осим тога, наша истраживања показују да LPS значајно подстиче инхибиторно дејство ПД-ММЋ на трансендотелску миграцију мононуклеарних ћелија, што може представљати важан механизам регулације инфламаторног одговора током инфламације потпорног ткива. Овај ефекат LPS био је праћен благим смањењем експресије CD29 антигена у популацији мононуклеарних ћелија ко-култивисаним са ПД-ММЋ третираним са LPS. Потенцијално, регулација експресије CD29 антигена могао би бити механизам који се налази у основи блокирања проласка мононуклеарних ћелија кроз ендотелску баријеру. Међутим, како би се ове претпоставке потврдиле потребно је спровести додатна истраживања. Поред тога, на молекулском нивоу, наши резултати показују да посредством активације ERK1,2 сигналног пута LPS може остваривати инхибиторан ефекат на трансендотелску миграцију, док активација ERK1,2 сигналног пута није укључена у инхибицију експресије CD29 код мононуклеарних ћелија. Стога, ови налази указују и на постојање додатних механизма који учествују у регулацији експресије овог протеина, али и у трансендотелској миграцији мононуклеарних ћелија. Уједно, добијени резултати упућују на сложеност механизма регулације процеса проласка мононуклеарних ћелија кроз ендотелску баријеру. Слично ефектима ПД-ММЋ, показано је да ММЋ костне сржи инхибирају експресију адхезивних молекула и рецептора који учествују у трансендотелској миграцији, како на лимфоцитима, тако и на ендотелским ћелијама (**Benvenuto et al., 2015**). Имајући у виду наведене податке, може се претпоставити да би модулација експресије адхезивних молекула и рецептора који учествују у трансендотелској миграцији могао бити механизам инхибиције трансендотелске миграције мононуклеарних ћелија које индукују ПД-ММЋ третиране са LPS. Поред тога, нашим истраживањима утврђено је да ПД-ММЋ значајно смањују трансендотелску миграцију полиморфонуклеарних ћелија. Међутим, за разлику од утицаја третмана ПД-ММЋ са LPS на трансендотелску миграцију мононуклеарних ћелија, наши резултати показују да третман ПД-ММЋ са LPS не утиче додатно на трансендотелску миграцију полиморфонуклеарних ћелија. Показан инхибиторан ефекат ПД-ММЋ на трансендотелску миграцију

полиморфонуклеара у одређеној мери у складу је са резултатима недавних судија које указују да ММЋ костне сржи инхибирају адхезију неутрофила за ендотелске ћелије активирани са TNF- α (Munir et al., 2015), као и да ММЋ костне сржи, Вартонове слузи и трабекуларне кости поседују сличну способност супресије привлачења неутрофила (Munir et al., 2016). Међутим, за разлику од ових налаза, бројне студије указују и да ММЋ из различитих ткивних извора могу имати стимулаторну улогу у привлачењу и активацији неутрофила посредством IL-8 и MIF (Brandau et al., 2010; Cassatella et al., 2011; Hsu et al., 2013; Brandau et al., 2014). Стога сви ови подаци наводе на заључак да ММЋ, иако пореклом из различитих ткива, значајно могу регулисати миграцију, односно покретљивост како мононуклеарних тако и полиморфонуклеарних ћелија, при чему треба имати у виду да специфични услови микросредине представљају важне факторе који усмеравају функцијски одговор ткивно специфичних ММЋ.

Претходна истраживања показују да хумане ММЋ костне сржи могу ограничавати трансендотелску миграцију леукоцита продукујући IL-6 када се кокултивишу са ендотелским ћелијама (Luu et al., 2013). Наши резултати такође показују да LPS индукује експресију IL-6 код ПД-ММЋ, али да ли је овај молекул у основи инхибиције трансендотелске миграције мононуклеарних ћелија остаје да се додатно испита. Претходним истраживањима показано је и да IL-6, присутан у кондиционираним медијумима ММЋ пореклом из костне сржи и Вартонове слузи, посредује у инхибицији трансендотелске миграције полиморфонуклеарних ћелија (Munir et al., 2016). Насупрот овим подацима, наши резултати показују да повећана експресија IL-6 код ПД-ММЋ третираних са LPS није праћена додатним променама трансендотелске миграције полиморфонуклеарних ћелија, те да су у овај процес укључени други регулаторни механизми. Стога сви ови подаци указују на неопходност додатних истраживања како би се расветлили механизми укључени у модулацију трансендотелске миграције имунских ћелија од стране ПД-ММЋ. Посматрајући физиолошки контекст ткива периодонцијума, наши резултати указују на испољавање различитих ефеката ПД-ММЋ, као и ПД-ММЋ третираних са LPS, на привлачење различитих субпопулација имунских ћелија, што упућује да координисано и избалансирано привлачење имунских ћелија,

може бити значајан регулаторни задатак ПД-ММЋ током развоја инфламаторног процеса.

Као део испитивања утицаја ПД-ММЋ на ћелије лимфоидног порекла, у нашим истраживањима анализиран је утицај ПД-ММЋ на пролиферативни капацитет CD4⁺ мононуклеарних ћелија, као и релативна заступљеност CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} популације у мононуклеарним ћелијама. Добијени резултати показују да LPS не модификује супресивни ефекат ПД-ММЋ на пролиферативни индекс CD4⁺ лимфоцита, као ни однос експресије CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} популације мононуклеарних ћелија стимулираних митогеном. Ови резултати наводе на наизглед контрадикторан закључак о имуномодулаторном деловању ПД-ММЋ. Са једне стране, може се протумачити да ПД-ММЋ испољавају имуносупресивно дејство инхибирајући активацију лимфоцита, док истовремено могу деловати имуностимулаторно смањујући број регулаторних Т лимфоцита. Међутим, иако се CD4⁺CD25^{високо} могу посматрати као субпопулација регулаторних Т лимфоцита (**Mayer et al., 2012**), како би се разјаснио значај овог ефекта, додатне фенотипске и функцијске анализе ММЋ су неопходне. Осим тога, с обзиром да IL-2 рецептор α (CD25) представља рани маркер активираних Т лимфоцита, може се претопставити да ПД-ММЋ заправо смањују фреквенцију активираних CD4⁺ лимфоцита, и на тај начин додатно доприносе имуносупресији. На молекулском нивоу, наши резултати показују да промене ових функција нису посредоване активацијом ERK1,2 сигнализације, што упућује на активност других сигналних путева који учествују у регулацији функција и фенотипа CD4⁺ лимфоцита. Истраживања показују да COX-2 и његов продукт PGE2 имају важну улогу у имуносупресивним функцијама ПД-ММЋ, инхибирајући пролиферацију Т лимфоцита како *in vitro* тако и *in vivo* (**Ding et al., 2010**). Наши резултати показују да ПД-ММЋ конститутивно експримирају COX-2 и IL-6, али да повећање њихове експресије индуковано присуством LPS ипак није праћено променама ефеката ПД-ММЋ на пролиферативни капацитет CD4⁺ мононуклеарних ћелија, као ни на заступљеност CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} популације мононуклеарних ћелија. За разлику од ефеката ПД-ММЋ значај ових молекула у имуномодулацији показан је код ММЋ пореклом из костне сржи.

Наиме, СОХ-2 продукован од стране ММЋ костне сржи може учествовати у преусмеравању Т лимфоцита ка фенотипу регулаторних Т лимфоцита (**Hsu et al., 2013**). Са друге стране, и на моделу миша, IL-6 кога продукују ММЋ костне сржи може испољити инхибиторан (**Bouffi et al., 2010**), али и стимулаторан ефекат на пролиферацију лимфоцита (**Vega-Letter et al., 2016**). Ови налази недвосмислено потврђују да су имуномодулаторна својства ММЋ условљена њиховим ткивним пореклом, те је од изузетне важности независно сагледавати имуномодулаторни потенцијал ММЋ специфичних за сваки ткивни извор. Стога, повећана експресија СОХ-2 и IL-6 свакако указује да ови фактори могу имати значајну улогу у модулацији функцијског одговора ПД-ММЋ, али и да су додатна испитивања неопходна како би се разјаснила њихова улога у својствима ПД-ММЋ повезаним са имуномодулаторним потенцијалом.

С обзиром да је парииодонцијум изложено антигенима бактерија, одговарајући функцијски одговор ћелија урођене имуности од великог значаја је за хомеостазу овог ткива, а уједно и ткиво парииодонцијума. Ипак, испитивањења имуномодулаторних функција ПД-ММЋ у контексту расветљавања њихове улоге у регулацији активности полиморфонуклеарних ћелија према доступној литератури нису вршена. Насупрот томе, резултати досадашњих истраживања утицаја ММЋ других ткивних извора на активност полиморфонуклеарних ћелија веома су неконзистентни. Са једне стране, аутори истичу протективну улогу ММЋ костне сржи и масног ткива у регулацији активности неутрофила, као механизма спречавања оштећења ткива услед њихове појачане активности (**Raffaghello et al., 2008; Ramasamy et al., 2010; Jiang et al., 2016**), док други наглашавају способност ММЋ различитих ткива, укључујући и ММЋ костне сржи, ка подстицању антимикробне активности полиморфонуклеарних ћелија (**Brandau et al., 2010; Cassatella et al., 2011; Hsu et al., 2013; Brandau et al., 2014**). У студијама *Brandau* и сарадника показано је да LPS подстиче ефекторске функције ММЋ изолованих из паратиреоидне жлезде, костне сржи и пљувачне жлезде (**2010; 2014**), при чему је запажено да под утицајем LPS ММЋ регулација активности полиморфонуклеарних ћелија зависна од ткивног порекла ММЋ (**Brandau et al., 2014**). Поред тога, у истој студији показано је да ММЋ поседују

способност да стимулишу процес фагоцитозе коју врше полиморфонуклеарне ћелије што указује да ММЋ могу да доприносе уклањању бактерија, те да резидентне ММЋ могу функционисати као локални регулатори имуности у инфицираном ткиву (**Brandau et al., 2014**). Са аспекта инфламације потпорног ткива зуба, овакве функција код ПД-ММЋ би могле бити од великог значаја за регулацију инфламаторног процеса у овом региону, што би потенцијално могао бити и протективни механизам. Међутим, иако би се очекивало да ПД-ММЋ, као ММЋ периферних ткива, у већој мери изложене антигенима спољашње средине, испољавају јачи одговор на структуре патогена (**Brandau et al., 2014**), наша испитивања модулације респираторног праска показују да ПД-ММЋ не утичу на ово својство полиморфонуклеарних ћелија, као и да LPS не модификује активност ПД-ММЋ. Без обзира на то, како би се у потпуности сагледао допринос ПД-ММЋ у регулацији активности ћелија урођене имуности, поред респираторног праска полиморфонуклеарних ћелија, у будућим истраживањима биће потребно спровести додатне анализе функција полиморфонуклеарних ћелија, како *in vitro*, тако и *in vivo*.

Уз непосредну активност имунских ћелија, усмеравање и ефикасност имунског одговора зависно је од бројности различитих популација и субпопулација имунских ћелија (**Calder 2007; Rothenberg 2010; Proserpio & Mahata 2016**). Претходне студије јасно показују да стромалне ћелије, укључујући ММЋ, пре свега пореклом из костне сржи, регулишу стварање и сазревање имунских ћелија током хематопоезе (**Cheung et al., 2014; Aqmasheh et al., 2017; Nombella-Arrieta & Isringhausen 2017**). С обзиром на одређене функцијске сличности између ПД-ММЋ и ММЋ костне сржи, у оквиру ове тезе испитиван је утицај ПД-ММЋ на пролиферацију и диференцијацију ћелија мијелоидног порекла, односно способност формирања колонија одређених хематопоеетских прогенитора присутних у популацији моноклеарних ћелија периферне крви у условима *in vitro*. Резултати наших истраживања показали су да након ко-култивације ММЋ са ПД-ММЋ долази до повећаног стварања укупног броја CFC колонија.

Показани резултат у сагласности је са стимулаторним ефектом који испољавају ММЋ изоловане из различитих региона ткива пупчаника (Xu et al., 2014), али и са налазима да ММЋ костне сржи и других феталних ткива подржавају експанзију хематопоеетских матичних ћелија (Huang et al., 2007; Walenda et al., 2010; Wang et al., 2010; Briquet et al., 2010; Köse et al., 2018). Стога наши резултати потврђују да, слично ММЋ костне сржи, и ПД-ММЋ иако потичу из ткива које није у директној вези са процесом хематопоезе, могу *in vitro* подржавати стварање колонија опредељених хематопоеетских прогенитора у популацији моноклеарних ћелија периферне крви. На молекулском нивоу, конститутивна експресија IL-6, као цитокина који стимулише мијелопоезу, код ПД-ММЋ, може представљати значајан фактор овог ефекта ПД-ММЋ, слично ММЋ костне сржи. Са друге стране, претретман ПД-ММЋ са LPS поништава стимулаторни ефекат ПД-ММЋ на способност формирања CFC колонија, што указује да LPS модификује статус ПД-ММЋ, и последично ово функцијско својство ПД-ММЋ. Поред тога, недавна *in vitro* студија такође је показала да након третмана хуманих ММЋ костне сржи са LPS долази до стимулације продукције различитих фактора, укључујући G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-11, M-CSF и CSF, који учествују у стимулацији формирања мијелоидних колонија од стране хуманих CD34⁺ ћелија из крви пупчаника (Ziegler et al., 2016). Ипак, за разлику од ових налаза, показана стимулација експресије IL-6 код ПД-ММЋ третираних са LPS у нашим резултатима и инхибиторан ефекат ПД-ММЋ третираних са LPS на CFC указује на постојање других регулаторних механизма који су највероватније последица јединствених функцијских својстава ПД-ММЋ. Осим тога, ове разлике између ефеката ПД-ММЋ и ММЋ костне сржи могу уједно бити последица и различитог ткивног порекла како ММЋ, тако и извора крви, с обзиром да је у нашим истраживањима коришћена популација моноклеарних ћелија периферне крви адултних особа.

При разматрању развоја лозно специфичних колонија, у нашим експериментима запажено је да моноклеарне ћелије периферне крви у највећој мери формирају CFU-GM колоније, док присуство ПД-ММЋ има стимулаторан ефекат на број ових колонија. Наши резултати показују да, иако ПД-ММЋ

претретиране са LPS такође стимулишу формирање CFU-GM код МНЋ, ова стимулација је значајно мања у односу на нетретиране ПД-ММЋ. Ипак, подстицање стварања CFU-GM колонија од стране ПД-ММЋ у присуству или одсуству LPS није праћено повећањем експресије маркера мијелоидних ћелија CD33 и CD14 у популацији мононуклеарних ћелија. Шта више, уочена је смањена заступљеност CD14⁺ ћелија у популацији МНЋ ко-култивисаним са ПД-ММЋ третираним са LPS. Анализирајући молекулске механизме испољених промена, запажено је да примена инхибитора ERK1,2 сигнализације поништава инхибиторан ефекат који LPS испољава на укупан број CFC и CD14 експресију код МНЋ.

Будући да LPS регулише имуномодулаторна својства ПД-ММЋ, додатне студије су неопходне како би се утврдило да ли механизам деловања LPS укључује супресију пролиферације Т лимфоцита у зависности од мијелоидних ћелија у оквиру МНЋ, као што је недавно показано на примеру ММЋ костне сржи (Rozenberg et al., 2016).

На основу наших резултата може се закључити да ПД-ММЋ поседују специфични унутрашњи потенцијал за подржавање хематопоезског потенцијала популације мононуклеарних ћелија периферне крви *in vitro*, што је у одређеној мери слично утицају ММЋ костне сржи. Овај резултат се уједно може објаснити функцијским сличностима ПД-ММЋ и ММЋ костне сржи, али свакако треба имати у виду да ПД-ММЋ поседују и јединствена својства у основи наведених функција која је потребно расветлити. Поред тога, наши резултати показују да LPS *in vitro* може представљати значајан модулаторни фактор ових функција ПД-ММЋ.

Иако су у оквиру имуномодулаторних активности ММЋ директни међућелијски контакти значајан механизам регулације одговора имунских ћелија, продукција активних биомолекула до сада представља најбоље описан механизам деловања ММЋ, а уједно и ПД-ММЋ. Показано је да у периодонцијуму LPS стимулише генску и протеинску експресију антиинфламаторних молекула као што је IDO (Moon et al., 2013), али такође индукује и проинфламаторне молекуле код ПД-ММЋ попут IL-1 β , IL-6 и IL-8 (Kato et al., 2014). Наши резултати такође показују да LPS индукује експресију IL-6 као проинфламаторног молекула, али и

COX-2 као антиинфламаторног молекула, истовремено не мењајући експресију HLA молекула. Поред тога, наши резултати указују да ERK1,2 активиран под утицајем LPS може бити укључен у регулацију експресије COX-2 и IL-6 код ПД-ММЋ, што је у сагласности са показаном улогом ERK1,2 сигнализације у повећању експресије PGE2 (Tian et al., 2016) и IL-6 (Zhang et al., 2014) код ММЋ костне сржи. На основу наших резултата, може се закључити да LPS, на месту инфламације, кроз стимулацију продукције различитих имуномодулаторних фактора, може доприносити стварању специфичног инфламаторног микроокружења. Следствено, ови услови могу утицати на околне ћелије и доприносити регулацији тока инфламације. Као што је показано LPS индукује експресију проинфламаторних, али и антинфламаторних молекула, због чега се истовремено намеће закључак да и равнотежа продукованих активних биолошких молекула од стране ПД-ММЋ може бити један од кључних фактора у регулацији исхода инфламаторног процеса у потпорном ткиву зуба.

Поред стимулације ових имуномодулаторних молекула наша истраживања по први пут показују да LPS, може индуковати експресију *ST2* гена, али и инхибирати базални ниво експресије *IL-33* гена код ПД-ММЋ. Ови резултати истовремено указују да секреција IL-33 може бити модулисана спољашњим сигнаlima. Наиме, након стимулације са лигандима *PAMP* рецептора попут LPS и дволанчане РНК, као и АТР и РМА, IL-33 је детектован у супернатантима епителних ћелија рожњаче (Zhang et al., 2011), астроцита и ћелија глије (Hudson et al., 2008), као и фибробласта срца (Sanada et al., 2007). У оралном ткиву, недавно је показано да се под утицајем *P. gingivalis* значајно подстиче експресија IL-33 на генском и протеинском нивоу у епителним ћелијама гингиве (Tada et al., 2015; Tada et al., 2017). Поред тога, истраживања других аутора указују на повећану експресију овог цитокина у оралном ткиву услед инфламаторних услова (Malcom et al., 2015; Lapérine et al., 2016; Sağlam et al., 2017), као и да IL-33 може доприносити ресорпцији алвеоларне кости (Malcom et al., 2015; Lapérine et al., 2016). Стога, IL-33, као инфламаторни медијатор са једне и ендогени алармин са друге стране, може бити важан регулатор функција резидентних матичних ћелија, а тиме и потенцијално контролисати регенеративне процесе оралног

ткива. Поред тога, детектовано повећање експресије *ST2* гена код ПД-ММЋ под утицајем LPS може указивати на механизам којим LPS може регулисати активност IL-33 код ПД-ММЋ.

Полазећи од ових чињеница, а с обзиром да се у доступној литератури не могу пронаћи подаци у вези са утицајем IL-33 на биолошка својства матичних ћелија оралног ткива, циљ наших истраживања био је и испитивање ефеката IL-33 на својстава и функције ПД-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом. Добијени резултати показују да IL-33 не утиче на метаболичку активност, морфолошка својства, као и имунофенотип ПД-ММЋ, што је био изузетно значајан полазни резултат како би се спровела даља испитивања функцијских својстава ПД-ММЋ. Резултати такође показују да IL-33 стимулише експресију маркера плурипотентности укључујући OCT-4, SOX-2 и NANOG, указујући на потенцијалну способност подстицања матичности ових ћелија и очувања прогениторских субпопулација. Како би смо потврдили ову хипотезу, у наставку истраживања анализиран је утицај IL-33 на диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ, и то како током третмана IL-33 за време индуковане диференцијације, тако и након седмодневног претретмана ПД-ММЋ са IL-33. Наши резултати показују да присуство IL-33 у диференцијационом медијуму индукује инхибицију минерализације ПД-ММЋ, иако су недавне студије показале да IL-33 може и стимулисати остеогену диференцијацију стромалних ћелија костне сржи (**Kenswil et al., 2018**). Осим тога, наши резултати показују да IL-33 не утиче на формирање гликозаминогилкана и липидних капљица, односно на хондрогену и адипогену диференцијацију, иако други аутори показују да *ST2/IL-33* сигнализација може бити значајна у овим процесима (**Miller et al., 2010; Bonyadi Rad et al., 2017**). Стога се и на примеру утицаја IL-33 на ММЋ, јасно запажа зависност испољавања функцијског одговора ММЋ од ткивног извора, што је највероватније последица њиховог различитог порекла и микросредине у којој се у физиолошким условима ове ћелије налазе. Наши резултати показују и да је диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ претретираних са IL-33 неизмењен, што указује да сам IL-33 заправо не модификује диференцијациони потенцијал ПД-ММЋ. Посебно се запажа да је способност минерализације претретираних ПД-ММЋ у потпуности обновљена.

Заиста, када је анализирана остеогенеза на нивоу активности ALP ензима уочава се да присуство IL-33 током диференцијације инхибира индуковану, али не и спонтану остеогену диференцијацију, док претретман ПД-ММЋ са овим цитокином индукује стимуацију како спонтане, тако и индуковане активности ALP ензима. На основу наших резултата може закључити да IL-33 у условима *in vitro* у највећој мери учествује у регулацији остеогеног потенцијала. Потпуна обнова остеогеног потенцијала ПД-ММЋ након седмодневног претретмана повезана је и са непромењеном експресијом гена маркера остеогене диференцијације попут Runx2 и ALP након третмана ПД-ММЋ са IL-33, чија експресија код ММЋ је временски регулисана (Xu et al., 2015). Као транскрипциони фактор Runx2 кооперативно интерагује са многим другим факторима, те његова експресија може бити повезана и са другим функцијама, попут ћелијског циклуса и регулације раста, као што је показано код остеобласта (Galindo et al., 2005). Такође, истраживања указују да остеогена диференцијација може бити посредована повећаном активношћу Runx2, али не и његовом повећаном генском експресијом (Shui et al., 2003), као и да његова експресија не мора бити индукована остеогеним сигнаlima попут BMPs (од енгл. *Bone morphogenetic proteins*) (Osyczka et al., 2004). Осим тога, може се претпоставити да други механизми попут нивоа фосфорилације Runx2, индукованог MAPK сигнализацијом, могу бити укључени у активност Runx2 уместо директне стимулације експресије његовог гена (Shui et al., 2003; Li et al., 2017). Стога се може претпоставити да у присуству IL-33, Runx2 учествује у другим функцијама ПД-ММЋ, пре него у остеогенези. Ипак, додатне анализе ефеката IL-33 на остеогене маркере у ширем временском опсегу су неопходне, како би се утврдила кинетика протеинске и генске експресије ових маркера.

С обзиром на уочене наизглед супротне ефекте IL-33 на остеогени потенцијал, посебан осврт представљало је детаљно испитивање модулације остеогене диференцијације ПД-ММЋ. Пролиферација представља прву фазу током остеогене диференцијације преостеобласта (Stein & Lian 1993; Rutkovskiy et al., 2016), те је у оквиру наших истраживања испитивана пролиферативна активност ПД-ММЋ за време остеогене диференцијације кроз анализу бројности, клоногеног

потенцијала и ћелијског старења. Наши резултати показују да IL-33 индукује повећање пролиферације и подржава високу експресију Ki67 ($\geq 90\%$) код ПД-ММЋ. Такође, значајно је и то да сам остеогени медијум стимулише пролиферацију ПД-ММЋ. Интересантно је запазити сличан, висок проценат Ki67 позитивних ћелија код ММЋ костне сржи пацова ($>80\%$) (Yang et al., 2015), или више од 70% Ki67 позитивних ћелија у популацији ММЋ масног ткива (Nawrocka et al., 2017). Иако ови налази указују на високу пролиферацију ММЋ, уједно се могу запазити и разлике у пролиферативној способности ММЋ различитог ткивног порекла. Како се Ki67 експримира у свим фазама ћелијског циклуса осим у G0 фази може се закључити да се већина ПД-ММЋ налази у активној деоби, а да мањи део ове популације припада мирујућој популацији ћелија која се споро дели у условима *in vitro*, док IL-33 и остеогени медијум не мењају заступљеност ових популација. Показана висока заступљеност ћелија које експримирају Ki67 уједно може и да указује да биологија ПД-ММЋ може бити повезана са незрелим остеопрогениторима, чији пролиферативни капацитет може бити механизам који значајно доприноси ремоделовању коштаног ткива (Kristensen et al., 2014). Показана висока позитивност Ki67 експресије код ПД-ММЋ, али и заступљеност популација ПД-ММЋ различитих фаза ћелијског циклуса одређених пропиридијум јодидом указује на потребу за додатним анализама ћелијског циклуса ПД-ММЋ комбинованим методама. На тај начин би се разјаснио статус ћелијског циклуса ПД-ММЋ, а уједно и потврдила потенцијална повезаност ПД-ММЋ са популацијом остеопрогенитора.

Поред пролиферације и експресије Ki67 у наставку истраживања одређиван је клоногени капацитет ПД-ММЋ у присуству IL-33 за време остеогене диференцијације. У те сврхе, експериментални приступ подразумевао је одређивање броја и ефикасност стварања CFU-F колонија, као и ALP⁺ колонија које садрже остеобласте (CFU-O), као лозне прогениторе током индукције остеогенезе. Добијени резултати показују да око 5% ПД-ММЋ има способност формирања колонија, што потврђује наша претходна истраживања (Okić-Dorđević et al., 2016), док је овај проценат нешто виши у односу на друге студије где је 2% ПД-ММЋ имало способност формирања колонија (Zheng et al., 2009). Може се

претпоставити да се у основи ових разлика највероватније могу налазити различити фактори култивације ћелија, попут густине ћелија приликом засејавања или ефикасност примењеног метода за изолацију ћелија, која може утицати на присуство ћелија са клоногеним потенцијалом у изолованој популацији. Са друге стране, наши резултати показују да је у присуству IL-33 клоногеност ПД-ММЋ стимулирана, док сам остеогени медијум такође индукује повећање броја колонија (>10%). Поред тога, запажа се да стимулаторни ефекат остеогеног медијума у присуству IL-33 није додатно измењен. Наши резултати показују да је >50% CFU-F колонија ПД-ММЋ ALP⁺, односно представља колоније у којима се налазе остеобласти (CFU-O), док се под утицајем IL-33 у остеогеном медијуму смањује проценат ових колонија. На основу ових резултата може се закључити да IL-33 има потенцијално важну улогу у регулацији усмеравања остеогене диференцијације и минерализације код ПД-ММЋ, али и очувања остеобластних прогенитора у популацији ПД-ММЋ у ткиву периодонцијума. На овај начин регулирана диференцијација ПД-ММЋ је од посебног значаја с обзиром да током хроничне инфламације потпорног ткива зуба долази до разарања коштаног ткива алвеоларне кости. Уједно, очување клоногеног капацитета ПД-ММЋ, потенцијално може представљати значајан протективни механизам деловања IL-33 током инфламаторних процеса пародонцијума.

Резултати недавних истраживања на *in vivo* моделу показују да стимулација деобе и повећане активности ALP ензима могу представљати механизам смањења старења хуманих ММЋ костне сржи (Tian et al., 2017). Ипак, у доступној литератури још увек нема података о улози IL-33 у старењу матичних ћелија. Имајући у виду ове непознанице, у оквиру ове тезе испитиван је и утицај IL-33 на старење ПД-ММЋ током остеогене диференцијације. Наши резултати показују да се са порастом броја пасажа, односно са старењем ПД-ММЋ повећава активност ензима β -галактозидазе, што је у складу са чињеницом да овај ензим представља показатељ ћелијског старења (Dimri et al., 1995; Yang & Hu 2005; Debacq-Chainiaux et al., 2009). Поред тога, на основу наших резултата уочава се изузетно висока експресија овог ензима код ПД-ММЋ гајених у монослоју што се може објаснити успостављањем контактне инхибиције између ћелија (Leontieva

et al., 2014). Наиме, ензим β -галактозидазе се осим током старења експримира и код контактено инхибираних ћелија, када долази до реверзибилног заустављања ћелијског циклуса, али не и старења. Иако механизми који антагонистички регулишу процес старења и контактне инхибиције нису разјашњени, оба процеса се заснивају на активацији лизозома, а тиме и експресији β -галактозидазе (**Krishna et al., 1999; Kurz et al., 2000; Yang & Hu 2005; Blagosklonny 2013; Leontieva et al., 2014; Biran et al., 2017**). Такође, уочава се интензивније бојење ћелија гајених у остеогеном медијуму, као и у присуству IL-33 истовремено са повећаном пролиферацијом ПД-ММЋ у овим експерименталним групама. Како бисмо разјаснили наизглед контрадикторне резултате стимулације пролиферације и сенесценције у истим експерименталним групама, анализирали смо активност β -галактозидазе и код појединачних ћелија. Наши резултати показали су да остеогени медијум значајно инхибира активност β -галактозидазе, при чему се запажа додатан инхибиторни ефекат у присуству IL-33. Стога ови налази потврђују да IL-33 спречавајући старење ПД-ММЋ и кроз подстицање пролиферације доприноси очувању прогениторске популације ћелија, као и субпопулације остеогених прогнатора. Истовремено, намеће се закључак да механизам инхибиције остеогене диференцијације ПД-ММЋ од стране IL-33 није посредован инхибицијом пролиферације или стимулацијом старења ћелија. Недавне студије показале су да аскорбинска киселина, као важан стимулаторни фактор неизоставан у остеогеном медијуму, повећава пролиферативни капацитет код хуманих остеобласта изолованих од пацијената оболелих од остеоартритиса, путем смањења сенесценције и експресије реактивних кисеоничних молекула (**Burger et al., 2017**). Ипак, остаје да се утврди да ли је стимулација антиоксидативних механизма у основи блокирања старења које IL-33 индукује код ПД-ММЋ. У прилог овим налазима, наша испитивања показују да IL-33, за разлику од LPS, стимулише експресију маркера плурипотентности укључујући ОСТ-4, SOX-2 и NANOG. Иако улога ових фактора код ММЋ није у потпуности расветљена сматра се да је њихова експресија повезана са својством матичности, при чему ефекат IL-33 на матичност прогениторских ћелија из здравог ткива није до сада утврђиван. Са друге стране, истраживања су показала да IL-33 кроз

стимулацију маркера плурипотентности подржава матичност код многих туморских ћелија попут ћелија тумора дојке (Hu et al., 2017), као и ћелија колоректалног тумора (Akimoto et al., 2016). Показана повећана пролиферација и клонгеност, праћена стимулисаном експресијом маркера плурипотентности у сагласности је са налазима у којима је утврђена повезаност повећане експресије OCT-4A (Liu L et al., 2015), SOX-2 (Liu P et al., 2015) и NANOG (Huang et al., 2014) са повећаном пролиферацијом ММЋ зубне пулпе и клоногеним капацитетом ММЋ костне сржи (Liu et al., 2009). Код ММЋ изолованих из зубне пулпе показано је да повећана експресија OCT-4A стимулише експресију других гена плурипотентности попут OCT-4B1, SOX-2, NANOG, Klf4 и c-Myc (Liu L et al., 2015), што подржава кооперативни модел функционисања ових транскрипционих фактора (Liu et al., 2007; Niwa 2007). Истовремено, резултати експресије маркера плурипотентности указују на слична молекулска својства ММЋ пореклом из различитих ткива, међутим остаје да се утврде ткивно специфични механизми који контролишу експресију ових фактора.

У контексту утврђивања молекулске основе промена код ПД-ММЋ изазваних под утицајем IL-33 у оквиру ове тезе анализирана је активација транскрипционих фактора NF-κB и β-катенина. Наиме, испољавање ефеката проинфламаторних цитокина у ћелијама које учествују у имунском одговору веома често је посредовано активношћу NF-κB сигналног пута (Tak & Firestein 2001; Numata et al., 2016; Liu et al., 2017). Са друге стране, β-катенин представља важан сигнални пут који је укључен у регулацију процеса остеогенезе, као и у процесе одржања матичности ММЋ (Han et al., 2014; Ring et al., 2014; Kim et al., 2015). Уз то, β-катенин има важну улогу у развојним процесима биологије зуба (Zhang et al., 2016), као и регулацији експресије маркера плурипотентности и одржања матичности ембрионалних матичних ћелија (Raggioli et al., 2014) и ММЋ костне сржи (Hoffman & Benoit, 2015). Активација NF-κB под утицајем IL-33 претходно је показана код различитих типова ћелија као што су синовиоцити слични фибробластима (Lee et al., 2016), ендотелске ћелије (Choi et al., 2012) и хумане HEK293RI ћелије (Ali et al., 2011), док је код макрофага показано да IL-33 по везивању за рецептор активира β-катенин (Li et al., 2014). Наши резултати по

први пут показују да IL-33 може активирати NF- κ B и β -катенин сигнализацију код ПД-ММЋ, али и да су овим сигналним путевима регулисане различите функције ПД-ММЋ. Са једне стране, активација β -катенина посредује у регулацији пролиферације, док су NF- κ B, али и β -катенин укључени у стимулацију експресије маркера плурипотентности и инхибицију остеогене диференцијације које индукује IL-33. Показана стимулација пролиферације посредована активношћу β -катенина у складу је са претходно запаженим доприносом активације β -катенина у повећаној пролиферацији нервних матичних ћелија узрокованој хипоксијом (Qi et al., 2017). Слично томе, претходна истраживања показују да повећана активност NF- κ B корелира са повећаном експресијом OCT-4 и NANOG, одржавајући на тај начин недиференцирано стање iPS ћелија (Takase et al., 2013). Наши резултати подржавају ове налазе, с обзиром да смо показали да активација NF- κ B, као и β -катенина под утицајем IL-33 код ПД-ММЋ индукује повећање експресије OCT-4 и NANOG. Ипак, иако улога маркера плурипотентности у регулацији диференцијације није још увек разјашњена, утврђено је да SOX-2 може инхибирати остеогену диференцијацију смањујући активност β -катенина код хуманих остеобласта, и на тај начин подстицати њихову самообнову и експанзију (Seo et al., 2011). Такође, овим истраживањима потврђен је негативан утицај активације NF- κ B на остеогенезу ПД-ММЋ (Li et al., 2014), док наши резултати указују и да активирани β -катенин учествује у инхибицији остеогенезе. Међутим, улога овог сигналног пута у остеогенези код ММЋ оралних ткива није у потпуности разјашњена. Наиме, уочено је да услед инфламаторних сигнала долази како до стимулације остеогене диференцијације ПД-ММЋ (Liang et al., 2016; Zhang et al., 2016), али и до инхибиције остеогенезе ММЋ зубне пулпе (Qin et al., 2015). Стога ови подаци потврђују да иако су ПД-ММЋ и ММЋ зубне пулпе блиског ткивног порекла ове ММЋ поседују јединствена функцијска својства. На молекулском нивоу, инхибиција остеогене диференцијације може бити индукована активацијом NF- κ B који потом подстиче деградацију цитоплазматског β -катенина индукујући тиме његову следствену активацију у једру (Chang et al., 2013). На тај начин, кооперација ових сигналних путева може представљати потенцијални механизам регулације функција ПД-ММЋ.

Приказани резултати недвосмислено указују на значај разумевања утицаја инфламаторне микросредине на регенеративна и имуномодулаторна својства ПД-ММЋ, односно значај утицаја фактора који чине нишу ткива периодонцијума. Са једне стране, LPS представља изражен фактор у модулацији диференцијационог потенцијала ПД-ММЋ, али и регулатор имуномодулаторних активности ових ћелија. Истовремено, LPS индукује и експресију различитих молекула који могу бити у основи испољавања функција ПД-ММЋ, али и обликовати састав нише и следствено утицати на друге ћелије у окружењу. Ови подаци наводе на закључак да LPS, као важан фактор у индукцији инфламације потпорног ткива зуба, може деловањем на ПД-ММЋ значајно модификовати регенеративни/диференцијациони одговор ових ћелија током патолошких процеса. Поред тога, ПД-ММЋ изложене утицају LPS, и кроз продукцију солубилних фактора и модулацију активности имунских ћелија, могу бити значајна ћелијска популација укључена у ток и прогресију инфламације потпорног ткива зуба. За разлику од LPS, IL-33 у највећој мери утиче на остеогену диференцијацију. Уз то, IL-33 доприноси очувању прогениторске популације ћелија, као и субпопулације остеогених прогенитора кроз спречавање старења ПД-ММЋ и подстицања пролиферације и клоногености. На основу ових података може се претпоставити да IL-33 током пародонтопатије испољава протективне ефекте на потпорно ткиво зуба, делујући пре свега на очување бројности и диференцијационог капацитета популације ПД-ММЋ, као главних ћелија које доприносе обнови ткива периодонцијума.

На основу приказаних резултата јасно се закључује да LPS и IL-33, као важни фактори који се могу наћи у ниши периодонцијума захваћеног инфламацијом, значајно мењају својства ПД-ММЋ, утичући на регенеративне процесе у ткиву из кога потичу. Измењена функцијска својства ПД-ММЋ под утицајем LPS указују на потенцијално негативни ефекат, док IL-33 може испољавати потенцијално повољан ефекат на ПД-ММЋ у патолошким условима. Истовремено, како потенцијална примена у оквиру ћелијске терапије и ткивног инжењеринга захтева свеобухватно познавање карактеристика и функцијских својстава ПД-ММЋ, наши налази доприносе расветљавању функцијских промена

ових ћелија под утицајем фактора присутним у инфламаторној микросредини. Нова сазнања о функцијским својствима ПД-ММЋ у различитим условима микросредине од пресудног су значаја за разумевање тока и развоја хроничне инфламације потпорног ткива зуба и нових терапија. Стога, добијени резултати могу бити важна основа за побољшање доступних видова лечења оштећених ткива усне дупље.

6.

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу претходно изложених циљева и представљених резултата, изведени су следећи закључци:

1. Испитивање утицаја и механизма деловања LPS на својства и функције ПД-ММЂ повезаних са регенеративним потенцијалом показује да:

- LPS не утиче на вијабилност ПД-ММЂ укључујући метаболичку активност, пролиферацију и ћелијски циклус ПД-ММЂ.
- LPS не модификује морфологију и фенотипска својства ПД-ММЂ.
- LPS модификује диференцијациони потенцијал ПД-ММЂ, при чему изражено инхибира остеогену диференцијацију, што је праћено инхибицијом гена остеогене диференцијације (*Runx2*, *ALP*, *OCN*).
- LPS стимулише хондрогену и адипогену диференцијацију, што је праћено стимулацијом експресије одговарајућих диференцијационих маркера (*SOX-9*, *PPAR-γ*, редом).
- LPS не утиче на миграторну способност ПД-ММЂ, али подстиче контрактилност, односно стицање миофибробластног фенотипа кроз стимулацију експресије молекула карактеристичних за миофибробласте код ПД-ММЂ (фибронектин, TGF-β, α-SMA, NG-2).
- LPS активира ERK1,2 сигнални пут MAPK сигнализације.
- Посредством ERK1,2 сигналног пута LPS инхибира остеогену диференцијацију, а стимулише хондрогену и адипогену диференцијацију.
- Посредством ERK1,2 сигналног пута LPS код ПД-ММЂ стимулише контрактилност, као и експресију протеина карактеристичних за миофибробласте.

2. Испитивање утицаја и механизма деловања LPS на својства и функције ПД-ММЂ повезаних са имуномодулаторним потенцијалом:

- Претретман ПД-ММЂ са LPS инхибира трансендотелску миграцију мононуклеарних ћелија, док благо утиче на смањење експресије површинског маркера CD29 код мононуклеарних ћелија.

- Инхибиција трансендотелске миграције мононуклеарних ћелија посредована је ERK1,2 сигналним путем.
- LPS не утиче на способност ПД-ММЋ да инхибирају пролиферацију митогеном стимулисане CD4⁺ субпопулације мононуклеарних ћелија.
- LPS не утиче на способност ПД-ММЋ да инхибирају релативну заступљеност CD4⁺CD25^{високо}/CD4⁺CD25^{ниско} лимфоцита.
- LPS не утиче на способност ПД-ММЋ да инхибирају трансендотелску миграцију полиморфонуклеарних ћелија.
- ПД-ММЋ саме, као и ПД-ММЋ претретиране са LPS не модификују респираторни прасак полиморфонуклеарних ћелија.
- ПД-ММЋ саме, као и ПД-ММЋ претретиране са LPS, не мењају значајно релативну заступљеност CD45⁺, CD34⁺ и CD33⁺ ћелија у популацији мононуклеарних ћелија.
- Претретман ПД-ММЋ са LPS значајно инхибира релативну заступљеност CD14⁺ ћелија у популацији мононуклеарних ћелија, а опажена инхибиција посредована је LPS-активираним ERK1,2 сигналним путем.
- LPS блокира стимулацију формирања колонија одређених хематопоеетских прогенитора присутних у популацији МНЋ (превасходно CFU-GM) од стране ПД-ММЋ, што је посредовано ERK1,2 сигналним путем.
- LPS не утиче на конститутивну експресију HLA-A и HLA-DR гена, док стимулише генску и протеинску експресију COX-2 и IL-6 код ПД-ММЋ посредством ERK1,2 сигналним путем.
- ПД-ММЋ конститутивно експримирају *ST2* и *IL-33* ген, при чему LPS повећава експресију *ST2* гена и смањује експресију гена за *IL-33*, а ови ефекти нису посредовани ERK1,2 сигналним путем.

3. Испитивање утицаја и механизма деловања IL-33 на својства и функције ПД-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом показује да:

- IL-33 не утиче на морфологију, метаболичку активност и фенотипска својства ПД-ММЋ.
- IL-33 стимулише експресију маркера плурипотентности код ПД-ММЋ укључујући OCT-4, SOX-2 и NANOG.
- IL-33 инхибира остеогену диференцијацију ПД-ММЋ, истовремено не утичући на хондрогенезу и адипогенезу.

- IL-33 не модификује експресију гена маркера остеогене диференцијације, *Runx2* и *ALP*.
- Претретман ПД-ММЋ са IL-33 стимулише остеогену диференцијацију на нивоу експресије ALP ензима, док не утиче на хондрогену и остеогену диференцијацију.
- IL-33 стимулише пролиферативну активност ПД-ММЋ током остеогене диференцијације.
- IL-33 подстиче способност формирања CFU-F колонија ПД-ММЋ у стандардном медијуму, али не модификује стимулаторни ефекат остеогеног медијума.
- IL-33 не утиче на проценат ALP позитивних колонија (CFU-O) гајених у стандардном медијуму, док у остеогеном медијуму IL-33 смањује проценат CFU-O колонија.
- IL-33 инхибира експресију β -галактозидазе, како код ПД-ММЋ култивисаних у стандардном медијуму, тако и код ПД-ММЋ култивисаних у остеогеном медијуму.
- IL-33 стимулише протеинску експресију NF- κ B и β -катенина и регулише њихову унутарћелијску локализацију код ПД-ММЋ.
- Стимулација експресије OCT-4 и NANOG протеина под утицајем IL-33 код ПД-ММЋ посредовано је NF- κ B и β -катенин сигналним путевима, док стимулација експресије SOX-2 од стране IL-33 код ПД-ММЋ није посредована овим сигналним путевима.
- Инхибиција остеогене диференцијације ПД-ММЋ индукована присуством IL-33 посредована је NF- κ B и β -катенин сигналним путевима не укључујући промену експресије *Runx2* и *ALP*.
- Стимулација пролиферације ПД-ММЋ током остеогене диференцијације индукована присуством IL-33 посредована је активношћу β -катенина.

7.

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 43(11):5721-32.
2. Abdel Meguid E, Ke Y, Ji J, El-Hashash AHK. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. *J Cell Physiol.* 2018 233:1825-1835.
3. Acharya A, Shetty S, Deshmukh V. Periodontal ligament stem cells: an overview. *Journal Of Oral Biosciences.* 2010 52(3):275-82.
4. Ahmed AS, Sheng MH, Wasnik S, Baylink DJ, Lau KW. Effect of aging on stem cells. *World J Exp Med.* 2017 7(1):1-10. eCollection 2017.
5. Akhmanova M, Osidak E, Domogatsky S, Rodin S, Domogatskaya A. Physical, spatial, and molecular aspects of extracellular matrix of in vivo niches and artificialscaffolds relevant to stem cells research. *Stem Cells Int.* 2015;2015:167025.
6. Akimoto M, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment. *Nat Commun.* 2016 7:13589.
7. Albiero ML, Amorim BR, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Silvério KG. Osteogenic potential of periodontal ligament stem cells are unaffected after exposure to lipopolysaccharides. *Braz Oral Res.* 2017 31:e17. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0017.
8. Albiero ML, Amorim BR, Martins L, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Silvério KG. Exposure of periodontal ligament progenitor cells to lipopolysaccharide from *Escherichia coli* changes osteoblast differentiation pattern. *J Appl Oral Sci.* 2015 23(2):145-52.
9. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2011 187(4): 1609-16.
10. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009 217(2):144-60.
11. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016 92(1-2):41-51.
12. Al-Shaibani MBH, Wang X, Lovat PE, Dickinson AM. Cellular Therapy for Wounds: Applications of Mesenchymal Stem Cells in Wound Healing. In: Alexandrescu VA (Ed). *Wound Healing.* InTech Open. 2016. ISBN: 978-953-51-2679-9 pp. 99-131.
13. Alvarez R, Lee HL, Wang CY, Hong C. Characterization of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from humanperiodontal ligament based on cell surface markers. *Int J Oral Sci.* 2015 7(4):213-9.
14. Amrollahi P, Shah B, Seifi A, Tayebi L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 69:1383-90.

15. Andersen RK, Zaher W, Larsen KH, Ditzel N, Drews K, Wruck W, Adjaye J, Abdallah BM, Kassem M. Association between *in vivo* bone formation and ex vivo migratory capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015 6:196.
16. Andrukhov O, Andrukhova O, Özdemir B, Haririan H, Müller-Kern M, Moritz A, Rausch-Fan X. Soluble CD14 enhances the response of periodontal ligament stem cells to *P. gingivalis* Lipopolysaccharide. *PLoS One.* 2016 11(8):e0160848. eCollection 2016.
17. Andrukhov O, Hong JS, Andrukhova O, Blufstein A, Moritz A, Rausch-Fan X. Response of human periodontal ligament stem cells to IFN- γ and TLR-agonists. *Sci Rep.* 2017 7(1):12856.
18. Anjos-Afonso F, Currie E, Palmer HG, Foster KE, Taussig DC, Bonnet D. CD34(-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell.* 2013 13(2):161-74.
19. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 2014 32(3):252-60.
20. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull.* 2017 7(2):165-177.
21. Arita NA, Pelaez D, Cheung HS. Activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1,2) is needed for the TGF β -induced chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 405:564-9.
22. Arsenijevic A, Harrell CR, Fellabaum C, Volarevic V. Mesenchymal stem cells as new therapeutic agents for the treatment of primary biliary cholangitis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2017;2017:7492836.
23. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human highendothelial venules. *Am J Pathol.* 2003 163(1):69-79.
24. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med.* 2015 6(1):29-34.
25. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol.* 2002 30(1):42-8.
26. Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, Andrada LC, Intini G. Potential for stem cell-based periodontal therapy. *J Cell Physiol.* 2016 231:50-61.
27. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, de Souza Costa CA, Hebling J2. Effect of LPS treatment on the viability and chemokine synthesis by epithelial cells and gingival Fibroblast. *Arch Oral Biol.* 2015 60(8):1117-21.
28. Benakanakere M, Kinane DF. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *Front Oral Biol.* 2012 15:41-55.

29. Benayahu D, Shefer G, Shur I. Insights into the transcriptional and chromatin regulation of mesenchymal stem cells in musculo-skeletal tissues. *Ann Anat.* 2009 191(1):2-12.
30. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 102(9):3324-9.
31. Benvenuto F, Voci A, Carminati E, Gualandi F, Mancardi G, Uccelli A, Vergani L. Human mesenchymal stem cells target adhesion molecules and receptors involved in T cell extravasation. *Stem Cell Res Ther.* 2015 6:245.
32. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013 13(4):392-402.
33. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 1176:101-17.
34. Bernitz JM, Kim HS, MacArthur B, Sieburg H, Moore K. Hematopoietic stem cells count and remember self-renewal divisions. *Cell.* 2016 167(5):1296-309.e10.
35. Bertolo A, Pavlicek D, Gemperli A, Baur M, Pötzel T, Stoyanov J. Increased motility of mesenchymal stem cells is correlated with inhibition of stimulated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *J Stem Cells Regen Med.* 2017 13(2):62-74. eCollection 2017.
36. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, Cote-Sierra J. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun.* 2014 55:33-41.
37. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Simmons. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008 2(4):313-9.
38. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014 30:677-704.
39. Biran A, Zada L, Abou Karam P, Vadai E, Roitman L, Ovadya Y, Porat Z, Krizhanovsky V. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell.* 2017 16(4):661-71.
40. Blagosklonny MV. Hypoxia, MTOR and autophagy: Converging on senescence or quiescence. *Autophagy.* 2013 9(2):260-62.
41. Blanpain C, Fuchs E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science.* 2014 344(6189):1242281.
42. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 2007 128(3):445-58.
43. Bojic S, Volarevic V, Ljujic B, Stojkovic M. Dental stem cells-characteristics and potential. *Histol Histopathol.* 2014 29(6):699-706.
44. Bonyadi Rad E, Musumeci G, Pichler K, Heidary M, Szychlinska MA, Castrogiovanni P, Marth E, Böhm C, Srinivasaiah S, Krönke G, Weinberg A, Schäfer U. Runx2 mediated Induction of Novel Targets ST2 and Runx3 Leads to Cooperative Regulation of Hypertrophic Differentiation in ATDC5 Chondrocytes. *Sci Rep.* 2017 7(1):17947.

45. Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol* 2000. 2018 76(1):43-50.
46. Botero TM, Son JS, Vodopyanov D, Hasegawa M, Shelburne CE, Nör JE. MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells. *J Dent Res*. 2010 89(3):264-9.
47. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*. 2010 5:e14247.
48. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 2015 125, 2621-29.
49. Brandau S, Jakob M, Bruderek K, Bootz F, Giebel B, Radtke S, Mauel K, Jäger M, Flohé SB, Lang S. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One*. 2014 9(9):e106903 eCollection 2014.
50. Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, Lang S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol*. 2010 88: 1005–15.
51. Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, Beguin Y, Gothot A. Prolonged *ex vivo* culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica*. 2010 95(1):47-56.
52. Bruna F, Contador D, Conget P, Erranz B, Sossa CL, Arango-Rodríguez ML. Regenerative potential of mesenchymal stromal cells: age-related changes. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:1461648.
53. Bryant J, Ahern DJ, Brennan FM. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells. *Arthritis Rheum*. 2012 64(7):2137-146.
54. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 2006 169(2):338-46.
55. Bueno C, Ramirez C, Rodríguez-Lozano FJ, Tabarés-Seisdedos R, Rodenas M, Moraleda JM, Jones JR, Martinez S. Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. *Cell Transplant*. 2013 22(11):2017-28.
56. Burger MG, Steinitz A, Geurts J, Pippenger BE, Schaefer DJ, Martin I, Barbero A, Peltari K. Ascorbic Acid Attenuates Senescence of Human Osteoarthritic Osteoblasts. *Int J Mol Sci*. 2017 18(12). pii: E2517.
57. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr*. 2007 137(3 Suppl 2):773S-80S.
58. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 213(2):341-47.

59. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med.* 2017 6(6):1445-51.
60. Caplan AI. MSCs: the sentinel and safe-guards of injury. *J Cell Physiol.* 2016 231(7):1413-6.
61. Caplan, A.I.J. Mesenchymal stem cells. *Orthop. Res.* 1991 9:641-650
62. Caron MM, Emans PJ, Surtel DA, Cremers A, Voncken JW, Welting TJ, van Rhijn LW. Activation of NF- κ B/p65 facilitates early chondrogenic differentiation during endochondral ossification. *PLoS One.* 2012 7(3):e33467.
63. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 104(1):282-7.
64. Carrion FA, Figueroa FE. Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? *Stem Cell Res Ther.* 2011 2(3):23.
65. Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells.* 2011 29(6): 1001-11.
66. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980 56(2):289-301.
67. Caton J, Bostanci N, Remboutsika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med.* 2011 15:1054-65.
68. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014 31:31-7.
69. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 106:9021-26
70. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2014 64(1):57-80.
71. Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl (2011).* 2011 1(3):63-67.
72. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000 127(8):1671-9.
73. Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissue Eng.* 2017 8:2041731417702531 eCollection 2017 Jan-Dec.
74. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007 25(11):2739-49.

75. Chang J, Liu F, Lee M, Wu B, Ting K, Zara JN, Soo C, Al Hezaimi K, Zou W, Chen X, Mooney DJ, Wang CY. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013 110 (23):9469-74.
76. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res.* 2002 37(3):196-203.
77. Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentrestudy. *Clin Oral Implants Res.* 2012 23(9):1045-54.
78. Chen FM, Gao LN, Tian BM, Zhang XY, Zhang YJ, Dong GY, Lu H, Chu Q, Xu J, Yu Y, Wu RX, Yin Y, Shi S, Jin Y. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2016 7:33.
79. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials.* 2012 33(27):6320-44.
80. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol.* 2006 84(5):413-21.
81. Cheng J, Yang K, Zhang Q, Yu Y, Meng Q, Mo N, Zhou Y, Yi X, Ma C, Lei A, Liu Y. The role of mesenchymal stem cells in promoting the transformation of androgen-dependent human prostate cancer cells into androgen-independent manner. *Sci Rep.* 2016 6:16993.
82. Cheung LC, Strickland DH, Howlett M, Ford J, Charles AK, Lyons KM, Brigstock DR, Goldschmeding R, Cole CH, Alexander WS, Kees UR. Connective tissue growth factor is expressed in bone marrow stromal cells and promotes interleukin-7-dependent B lymphopoiesis. *Haematologica.* 2014 99(7):1149-56.
83. Choi S, Cho TJ, Kwon SK, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. *Int J Oral Sci.* 2013 5(1):7-13.
84. Choi S, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, Kwon YG. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 421(2): 305-311.
85. Chotinantakul K, Leraanaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* 2012;2012:270425.
86. Colombo F, Sampogna G, Coccozza G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. *J Microsc Ultrastruct.* 2017 5(1):1-8.
87. Cook D, Genever P. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 2013 786:213-29.
88. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006 107(1): 367-372.

89. Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res.* 2008 43(5):531-36.
90. Crisan M, Dzierzak E. The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development.* 2016 143(24): 4571-81.
91. da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brígido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2014 2014:342410.
92. da Silva L, Caplan AI, Nardi N. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008 26:2287-99.
93. Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. *Methods Mol Biol.* 2007 412:349-363.
94. Daley GQ. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell.* 2012 10(6):740-9.
95. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014 7:301-11 eCollection 2014.
96. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004 72(9):5041-51.
97. Daughtry B, Mitalipov S. Concise Review: parthenote stem cells for regenerative medicine: genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl Med.* 2014 3(3): 290-98
98. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells.* 2016 8(3):73-87.
99. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bernardo ME, Biagi E, Brini AT, D'Amico G, Fagioli F, Ferrero I, Locatelli F, Maccario R, Marazzi M, Parolini O, Pessina A, Torre ML, Italian Mesenchymal Stem Cell Group. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des.* 2013 19(13):2459-73.
100. de Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ, Jansen JH, Raymakers RA. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia.* 2006 20(4):750-54.
101. de Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related? *Stem Cells Dev.* 2016 25(24):1843-52.
102. de Witte SF, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. Toward development of imesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. *Front Immunol.* 2016 6:648. eCollection 2015.

103. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009 4:1798–1806
104. Del Fattore A, Teti A, N Rucci. Bone cells and the mechanisms of bone remodeling. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 4:2302-21.
105. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010 2010:865601.
106. Desai VD, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Plos One.* 2014 9(1):e86865. eCollection 2014.
107. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 192(19):5002-17.
108. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007 26(22):3279-90
109. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013 2013:503754.
110. Di Nicola, M. Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002 99(10): 3838–43.
111. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol.* 2013 4:201.
112. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 92(20):9363-7.
113. Ding G, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, Wang W, Wang S. Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs.* 2010 191(5):357-364.
114. Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wang S. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* 2010 a 28(10):1829-38.
115. Diomedea F, Thangavelu SR, Merciaro I, D'Orazio M, Bramanti P, Mazzon E, Trubiani O. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation in human periodontal ligament stem cells: role of epigenetic modifications to the inflammation. *Eur J Histochem.* 2017 61(3):2826.
116. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2007 25(8): 2025-32.
117. Djouad F, Pence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 2003 102(10): 3837-44.
118. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and

similarities. *Cell Cycle*. 2012 11(2):377-83.

119. Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development*. 2008 135(9): 1575-87.

120. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 8(4):315-7.

121. Donders R, Bogie JFJ, Ravanidis S, Gervois P, Vanheusden M, Marée R, Schrynemackers M, Smeets HJM, Pinxteren J, Gijbels K, Walbers S, Mays RW, Deans R, Van Den Bosch L, Stinissen P, Lambrechts I, Gyselaers W, Hellings N. Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2018 27(2):65-84.

122. Đorđević IO, Kukolj T, Krstić J, Trivanović D, Obradović H, Santibañez JF, Mojsilović S, Ilić V, Bugarski D, Jauković A. The inhibition of periodontal ligament stem cells osteogenic differentiation by IL-17 is mediated via MAPKs. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 71:92-101.

123. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 10(2):120-36.

124. Du M, Yin J, Zhu MJ. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Sci*. 2010 86(1):103-9.

125. Duan L, Chen J, Zhang H, Yang H, Zhu P, Xiong A, Xia Q, Zheng F, Tan Z, Gong F, Fang M. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3(+) regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med*. 2012 18:753-61.

126. Dupin E, Coelho-Aguiar JM. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A*. 2013 83(1):38-47.

127. Dupin E, Sommer L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*. 2012 366(1):83-95.

128. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015 125(17):2605-13.

129. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*. 2014 5:148 eCollection 2014.

130. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012 56(3):151-65

131. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, Bellusci S. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*. 2017 21(2):166-177.

132. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005 106(13):4057-65.

133. Eloje-Fadrosch EA, Rasko DA. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis.

Annu Rev Med. 2013 64:145–63.

134. English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett.* 2008 115(1):50-8.

135. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol.* 2013 91(1):19–26

136. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 292(5819):154-6.

137. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Tan W, Huang D, Lu X, Tao T, Zhang J, Li L, Gu Z. Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res.* 2014 356(2):369-80.

138. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006 40:50-76.

139. Fisher MB, Mauck RL. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 19(1):1-13.

140. Florian MC, Geiger H. Concise review: polarity in stem cells, disease, and aging. *Stem Cells.* 2010 28(9):1623-9.

141. Fortino VR, Chen RS, Pelaez D, Cheung HS. Neurogenesis of neural crest-derived periodontal ligament stem cells by EGF and bFGF. *J Cell Physiol.* 2014 229(4):479-88.

142. Fracchiolla NS, Fattizzo B, Cortelezzi A. Mesenchymal stem cells in myeloid malignancies: a focus on immune escaping and therapeutic implications. *Stem Cells Int.* 2017 2017:6720594.

143. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 3(4):393-403.

144. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for Fibroblast in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974 2(2):83-92.

145. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 4(5):267-74.

146. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 6(2):230-47.

147. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976 47:327-59.

148. Friedenstein AJ. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol. Blood Transfus.* 1989 32:159-67.

149. Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron.* 2013 80(3):588-601.

150. Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyann H, Im HJ, Choi JY, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ. The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2005 280(21):20274-85.
151. Galipeau J, Krampera M, Barrett J, Dazzi F, Deans RJ, DeBruijn J, Dominici M, Fibbe WE, Gee AP, Gimble JM, Hematti P, Koh MB, LeBlanc K, Martin I, McNiece IK, Mendicino M, Oh S, Ortiz L, Phinney DG, Planat V, Shi Y, Stroncek DF, Viswanathan S, Weiss DJ, Sensebe L. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy*. 2016 18(2):151-9.
152. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018 22(6):824-833 doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
153. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, Tse HF, Fu QL, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016 7(1): e2062.
154. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 39(6):1003-18.
155. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 77(8):4756-59.
156. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014 1840(8):2506-19.
157. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007 10(3):149-60.
158. Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Misirkic-Marjanovic M, Djonov V, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response. *Stem Cells Int*. 2017 2017:6294717.
159. Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008 35(3): 228-38.
160. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 105(7):2821-7.
161. Gonzalez MA, Bernad A. Characteristics of adult stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2012 741:103-20.
162. Gu LH, Zhang TT, Li Y, Yan HJ, Qi H, Li FR. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cell Mol Immunol*. 2015 12(4):444-55.
163. Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, Rockenstein E, Masliah E, Peterson KL, Stallcup WB, Chen J, Evans SM. Pericytes of multiple organs do not

- behave as mesenchyma stem cells *in vivo*. Cell Stem Cell. 2017 20(3):345-359.e5.
164. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? Biomed Res Int. 2014; 2014: 216806.
165. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. Nat Rev Microbiol. 2012 10(10):717-25.
166. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. Eur J Immunol. 2014 44(2):328-38.
167. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol. 2014 35(1):3-11.
168. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. 2015 15(1):30-44.
169. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Aust Dent J. 2014 59 Suppl 1:117-30.
170. Han N, Zheng Y, Li R, Li X, Zhou M, Niu Y, Zhang Q. β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. PLoS One. 2014 9(2):e88890. eCollection 2014.
171. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. J Oral Sci. 2011 53(3):263-71.
172. Hart D. Why mesenchymal stem/progenitor cell heterogeneity in specific environments? —Implications for tissue engineering applications following injury or degeneration of connective tissues. J Biomedical Science and Engineering. 2014 7, 526-32.
173. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal. 2011 9:12.
174. Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC 3rd, Genco CA. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. Mol Oral Microbiol. 2010 25(5):305-16.
175. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood. 2003 102(7):2660-9.
176. He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. Folia Microbiol (Praha). 2015 60(1):69-80.
177. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009 25:377-406.
178. He W, Wang Z, Luo Z, Yu Q, Jiang Y, Zhang Y, Zhou Z, Smith AJ, Cooper PR. LPS promote the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells via MAPK signaling pathway. J Cell Physiol. 2015 230(3):554-61.
179. Hefti AF. Aspects of cell biology of the normal periodontium. Periodontol 2000.

1993;3:64-75.

180. Heidary Rouchi A, Mahdavi-Mazdeh M. Regenerative Medicine in Organ and Tissue Transplantation: Shortly and Practically Achievable? *Int J Organ Transplant Med.* 2015 6(3): 93–8.

181. Hill BS, Pelagalli A, Passaro N, Zannetti A. Tumor-educated mesenchymal stem cells promote pro-metastatic phenotype. *Oncotarget.* 2017 8(42):73296-73311 eCollection 2017 Sep 22.

182. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007 127(3):526-37.

183. Hoffman MD, Benoit DS. Agonism of Wnt- β -catenin signalling promotes mesenchymal stem cell (MSC) expansion, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2015 9(11):E13-26.

184. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2010 10(12):1496-500.

185. Horwitz EM, Keating A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? *Cytotherapy.* 2000 2(5):387-8.

186. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for CellularTherapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005 7(5):393-5.

187. Hosseinikia R, Nikbakht MR, Moghaddam AA, Tajehmiri A, Hosseinikia M, Oubari F, Nikougoftar Zarif M, Pasdar Y, Mansouri K. Molecular and cellular interactions of allogenic and autologous mesenchymal stem cells with innate and acquired immunity and their role in regenerative medicine. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017 11(1):63-77.

188. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front microbiol.* 2016 7:53 eCollection 2016.

189. Hsu SC, Wang LT, Yao CL, Lai HY, Chan KY, Liu BS, Chong P, Lee OK, Chen HW. Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4+ CD45RO+ T cells. *Immunobiology.* 2013 218(1): 90–95.

190. Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, Jui HY, Wu KK, Lee CM. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- γ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol.* 2013 190(5):2372-80.

191. Hu H, Sun J, Wang C, Bu X, Liu X, Mao Y, Wang H. IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 485(3):643-50.

192. Huang B, Li G, Jiang XH. Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Res Ther.* 2015 6-35.

193. Huang CE, Hu FW, Yu CH, Tsai LL, Lee TH, Chou MY, Yu CC. Concurrent expression of

OCT-4 and NANOG maintains mesenchymal stem-like property of human dental pulp cells, *Int J Mol Sci.* 2014 15(10):18623-39.

194. Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, Zheng Q, Xie CG, Gu JH, McNiece IK, Wang JF. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant.* 2007 16(6):579-85.

195. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 88(9):792-806.

196. Huang N, Gibson FC 3rd. Immuno-pathogenesis of periodontal disease: current and emerging paradigms. *Curr Oral Health Rep.* 2014 1(2):124-132.

197. Huang X, Du W, Barrett RP, Hazlett LD. ST2 is essential for Th2 responsiveness and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 48(10):4626-33.

198. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc Biol.* 2008 84(3): 631-643.

199. Iriarte CGT, Ramirez OR, Garcia AM, Teran SLV, Clavel JFG. Isolation of periodontal ligament stem cells from extracted premolars. Simplified method. *Revista Odontológica Mexicana.* 2017 21, (1):13-21.

200. Iseri K, Iyoda M, Ohtaki H, Matsumoto K, Wada Y, Suzuki T, Yamamoto Y, Saito T, Hihara K, Tachibana S, Honda K, Shibata T. Therapeutic effects and mechanism of conditioned media from human mesenchymal stem cells on anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016 310(11):F1182-91.

201. Issaranggun Na Ayuthaya B, Satravaha P, Pavasant P. Interleukin-12 modulates the immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2017 52(3): 546-55.

202. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol.* 2013 84(10):1425-33.

203. Ji ST, Kim H, Yun J, Chung JS, Kwon SM. Promising therapeutic strategies for mesenchymal stem cell-based cardiovascular regeneration: From cell priming to tissue engineering. *Stem Cells Int.* 2017;2017:3945403.

204. Jian CX, Fan QS, Hu YH, He Y, Li MZ, Zheng WY, Ren Y, Li CJ. IL-7 suppresses osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through inactivation of mitogen-activated protein kinase pathway. *Organogenesis.* 2016 12(4):183-193.

205. Jiang D, Muschhammer J, Qi Y, Kügler A, de Vries JC, Saffarzadeh M, Sindrilaru A, Beken SV, Wlaschek M, Kluth MA, Ganss C, Frank NY, Frank MH, Preissner KT, Scharffetter-Kochanek K. Suppression of neutrophil-mediated tissue damage—a novel skill of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2016 34(9):2393-406.

206. Jiang Z, Liu G, Meng F, Wang W, Hao P, Xiang Y, Wang Y, Han R, Li F, Wang L, Li X.

- Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol.* 2017 101(11):1583-90.
207. Jin J, Cao J. Upregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human periodontal ligament cells induced by interleukin-1 β . *Aust Dent J.* 2015 60(3):382-9.
208. Jones E, Schäfer R. Biological differences between native and cultured mesenchymal stem cells: implications for therapies. *Methods Mol Biol.* 2015 1235:105-20.
209. Jones LA, Roberts F, Nickdel MB, Brombacher F, McKenzie AN, Henriquez FL, Alexander J, Roberts CW. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol.* 2010 40:426–36.
210. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 2013 38(2):209-23.
211. Kadle RL, Abdou SA, Villarreal-Ponce AP, Soares MA, Sultan DL, David JA, Massie J, Rifkin WJ, Rabbani P, Ceradini DJ. Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory T-cell expansion. *PLoS One.* 2018 13(3):e0193178 eCollection 2018.
212. Kakkar R, Lee R. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 7(10): 827–40.
213. Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, Parfenova YV, Tkachuk VA. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae.* 2011 3(4):30-7.
214. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007 282(19):14515-24.
215. Kanji S, Das H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5217967. Epub 2017 Oct 29.
216. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007 449(7162):557–63.
217. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol.* 2014 59(2):167-75.
218. Kay AG, Long G, Tyler G, Stefan A, Broadfoot SJ, Piccinini AM, Middleton J, Kehoe O. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immuneresponses in inflammatory arthritis. *Sci Rep.* 2017 7(1):18019.
219. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012 10(6):709-16.
220. Keller G, Snodgrass HR. Human embryonic stem cells: The future is now. *Nat. Med.* 1999 5(2) 151–2.

221. Kenswil KJG, Jaramillo AC, Ping Z, Chen S, Hoogenboezem RM, Mylona MA, Adisty MN, Bindels EMJ, Bos PK, Stoop H, Lam KH, van Eerden B, Cupedo T, Raaijmakers MHGP. Characterization of endothelial cells associated with hematopoietic niche formation in humans identifies IL-33 as an anabolic factor. *Cell Rep.* 2018 22(3):666-78.
222. Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 2010 661:3-38.
223. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015 16(3):239-53.
224. Kim HS, Kim KH, Kim SH, Kim YS, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Lee YM. Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2010 40(6): 265–270.
225. Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013 5(1):13-31.
226. Kimura H, Okubo N, Chosa N, Kyakumoto S, Kamo M, Miura H, Ishisaki A. EGF positively regulates the proliferation and migration, and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals. *Cell Physiol Biochem.* 2013 32:899-914.
227. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4285215.
228. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods.* 2016 99:62-8.
229. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007 9(1):204.
230. Komatsu T. Oxidative stress and periodontal disease in Down Syndrome. In: Ekuni D, Battino M, Tomofuji T, Putnins EE (Eds). *Studies on Periodontal Disease.* Springer, Berlin. 2014. ISBN 978-1-4614-9557-4; pp. 211–223.
231. Kondo M, Yamaoka K, Y. Tanaka. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *Int J Mol Sci.* 2014 15(11):21270-85.
232. Köse S, Aerts-Kaya F, Köprü ÇZ, Nemitlu E, Kuşkonmaz B, Karaosmanoğlu B, Taşkıran EZ, Altun B, Uçkan Çetinkaya D, Korkusuz P. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate *in vitro* hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Exp Hematol.* 2018 57:30-41.e1.
233. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011 25(9):1408–14.

234. Krampera, M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 101(9):3722–29.
235. Krishna DR, Sperker B, Fritz P, Klotz U. Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? *Mech Ageing Dev*. 1999 109(2):113–23.
236. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse JM. Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling, *Am. J. Pathol*. 2014 184(3):778-89.
237. Krstić J, Obradović H, Jauković A, Okić-Đorđević I, Trivanović D, Kukolj T, Mojsilović S, Ilić V, Santibañez JF, Bugarski D. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochim Biophys Acta*. 2015 1853(2):431-44.
238. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, Niedbala W, McKenzie AN, Teixeira MM, Liew FY, Xu D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol*. 2008 181(7):4780–90.
239. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009 183(10):6469–77.
240. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000 113(pt 20):3613–622.
241. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PGJ. Single-colony derived strains of human marrow stromal Fibroblast form bone after transplantation *in vivo*. *Bone Miner. Res*. 1997 12(9):1335–347.
242. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 6(5):552-70.
243. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol*. 2014 32(8):795-803.
244. Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, Sourice S, Le Tilly E, Palmer G, Davideau JL, Geoffroy V, Guicheux J, Beck-Cormier S, Lesclous P. Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. *PLoS One*. 2016 11(12):e0168080 eCollection 2016.
245. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*. 2015 168(2):140-6.
246. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 11(5):321-34.
247. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells

inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 2003 57(1): 11–20.

248. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005. 437:275–280

249. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther.* 2016 7:37.

250. Lee DK, Song SU. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cell Immunol.* 2018 326:68-76. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.08.009.

251. Lee EJ, So MW, Hong S, Kim YG, Yoo B, Lee CK. Interleukin-33 acts as a transcriptional repressor and extracellular cytokine in fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2016 77:35-43.

252. Lee JH, Um S, Song IS, Kim HY, Seo BM. Neurogenic differentiation of human dental stem cells *in vitro*. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014 40(4):173-80.

253. Lefrançais E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw.* 2012 23(4):120-7.

254. Lefrançais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard JP. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 111(43):15502-7.

255. Lefrançais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 109(5):1673-78.

256. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of Fibroblast in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996 245(2):327-41.

257. Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 111(24):8832-37.

258. Li C, Li B, Dong Z, Gao L, He X, Liao L, Hu C, Wang Q, Jin Y. Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor κ B pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2014 5(3):67.

259. Li C, Li H, Jiang Z, Zhang T, Wang Y, Li Z, Wu Y, Ji S, Xiao S, Ryffel B, Radek KA, Xia Z, Lai Y. Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathog.* 2014 10(2):e1003918 eCollection 2014 Feb.

260. Li C, Wang X, Tan J, Wang T, Wang Q. The immunomodulatory properties of periodontal ligament stem cells isolated from inflamed periodontal granulation. *Cells Tissues Organs.* 2014 199(4):256-65.

261. Li F, Guo X, Chen SY. Function and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2017 4:32. eCollection 2017.

262. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010 327(5965):542-45.
263. Li Q, Pang Y, Liu T, Tang Y, Xie J, Zhang B, Chen H. Effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on hematologic malignancies. *Oncol Lett*. 2018 15(5):6982-90. doi: 10.3892/ol.2018.8254.
264. 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. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. 2012 19(9):1505-13.
265. Li W, Wei S, Liu C, Song M, Wu H, Yang Y. Regulation of the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow-derived stromal cells by extracellular uridine triphosphate: The role of P2Y2 receptor and ERK1,2 signaling. *Int J Mol Med*. 2016 37(1):63-73.
266. Li X, Yue S, Luo Z. Mesenchymal stem cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Oncotarget*. 2017 8(60):102600-616 eCollection 2017 Nov 24.
267. Li Y, Ge C, Franceschi RT. MAP kinase-dependent RUNX2 phosphorylation is necessary for epigenetic modification of chromatin during osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2017 232(9):2427-35.
268. Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis*. 2014 20(1):25-34.
269. Liang L, Zhou W, Yang N, Yu J, Liu H. ET-1 promotes differentiation of periodontal ligament stem cells into osteoblasts through ETR, MAPK, and Wnt/ β -catenin signaling pathways under inflammatory microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016 2016; 8467849. ID 8467849.
270. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*. 2014 23(9):1045-59.
271. Liang Y, Jie Z, Hou L, Aguilar-Valenzuela R, Vu D, Soong L, Sun J. IL-33 induces neutrophils and modulates liver injury in viral hepatitis. *J Immunol*. 2013 190(11):5666-75.
272. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000 6(11):1282-86.
273. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016 16(11):676-89.
274. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013 28(9):1109-16.
275. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013 28(9):1109-16.
276. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? *Transfus Med Hemother*. 2010 37(2):75-83.
277. Liu C, Feng X, Wang B, Wang X, Wang C, Yu M, Cao G, Wang H. Bone marrow

- mesenchymal stem cells promote head and neck cancer progression through periostin-mediated phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin. *Cancer Sci.* 2018 109(3):688-98. doi: 10.1111/cas.13479. Epub 2018 Jan 23.
278. Liu D, Xu J, Liu O, Fan Z, Liu Y, Wang F, Ding G, Wei F, Zhang C, Wang S. Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation. *J Clin Periodontol.* 2012 39 (12):1174-82.
279. Liu J, Li Q, Liu S, Gao J, Qin W, Song Y, Jin Z. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1380851.
280. Liu J, Wang L, Liu W, Li Q, Jin Z, Jin Y. Dental follicle cells rescue the regenerative capacity of periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment. *PLoS One.* 2014 9(9):e108752 eCollection 2014.
281. Liu L, Papa EF, Dooner MS, Machan JT, Johnson KW, Goldberg LR, Quesenberry PJ, Colvin GA. Homing and long-term engraftment of long- and short-term renewal hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2012 7(2):e31300.
282. Liu L, Wu L, Wei X, Ling J. Induced overexpression of OCT-4A in human dental pulp cells enhances pluripotency and multilineage differentiation capability. *Stem Cells Dev.* 2015 24(8):962-72.
283. Liu N, Lu M, Tian X and Z Han. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 211(2):279-86.
284. Liu P, Cai J, Dong D, Chen Y, Liu X, Wang Y, Zhou Y. Effects of SOX-2 on proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *PLoS One.* 2015 10(10):e0141346 eCollection 2015.
285. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017 2. pii: 17023.
286. Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic NANOG and OCT-4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009 18(7):1013-22.
287. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng US, Zhang L, Wang S, Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 110(37):14918-23.
288. Liu X, Li M, Wu Y, Zhou Y, Zeng L, Huang T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 386(1):181-185.
289. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells.* 2008 26(4):1065-73.
290. Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Pizarro TT. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012 5(1):18.

291. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton EJ. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Natl. Cancer Inst.* 1951 12(1):197-201.
292. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009 31(1):84–98.
293. Luu NT, McGettrick HM, Buckley CD, Newsome PN, Rainger GE, Frampton J, Nash GB. Crosstalk between mesenchymal stem cells and endothelial cells leads to downregulation of cytokine-induced leukocyte recruitment. *Stem Cells.* 2013 31(12):2690-702.
294. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014 32(6):1408-19.
295. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 1994 171(1):131–137.
296. Ma F, Chen D, Chen F, Chi Y, Han Z, Feng X, Li X, Han Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote breast cancer metastasis by interleukin-8- and interleukin-6-dependent induction of CD44(+)/CD24(-) cells. *Cell Transplant.* 2015 24(12):2585-99.
297. Ma OK-F, Chan KH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World Journal of Stem Cells.* 2016 8(9):268-78.
298. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014 21(2):216-25.
299. Machado CV, da Silva Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013 35(1):62-7.
300. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014 12:260.
301. Maeda H, Wada N, Fujii S, Tomokiyo A, Akamine A. Periodontal ligament stem cells. In: Ali Gholamrezanezhad (Ed.). *Stem cells in clinic and research.* InTech Open. 2011. ISBN: 978-953-307-797-0; pp. 619-636.
302. Maehle AH. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc Lond.* 2011 65(4):359-78.
303. Maffei S, Brevini TAL, Gandolfi F. Freezing and Freeze-Drying: The Future Perspective of Organ and Cell Preservation. In: Brevini TAL (Ed.). *Stem Cells in Animal Species: From Pre-clinic to Biodiversity.* Springer. 2014. ISBN: 978-3-319-03572-7; pp. 167-184.
304. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol.* 2016;2016:6940283.
305. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A, Lappin DF, Fukada SY, Nile CJ, Liew FY, Culshaw S. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J Dent Res.* 2015 94(7):968-75.

306. Manuguerra-Gagné R, Boulos PR, Ammar A, Leblond FA, Krosli G, Pichette V, Lesk MR, Roy DC. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*. 2013 31(6):1136-48.
307. Mao CY, Wang YG, Zhang X, Zheng XY, Tang TT, Lu EY. Double-edged-sword effect of IL-1 β on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- κ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways. *Cell Death Dis*. 2016 14;7:e2296.
308. Mao F, Tu Q, Wang L, Chu F, Li X, Li HS, Xu W. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget*. 2017 8(23):38008-21.
309. Mao JJ, Prockop DJ. Stem cells in the face: tooth regeneration and beyond. *Cell Stem Cell*. 2012 11(3):291-301.
310. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 78(12):7634-38.
311. Martin SJ, Henry CM, Cullen SP. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol Cell*. 2012 46(4):387-97.
312. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 2008 3(1):1-5.
313. Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *Int Immunol*. 2010 22(6):479-89.
314. Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol*. 2015 6:560 eCollection 2015.
315. Maximow, A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol. (Frankf.)*. 1909 8:125-134.
316. Mayani H. The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000Res*. 2016 28;5. pii: F1000 Faculty Rev-1524. eCollection 2016.
317. Mayer E, Bannert C, Gruber S, Klunker S, Spittler A, Akdis CA, Szépfalusi Z, Eiwegger T. Cord blood derived CD4+CD25(high) T cells become functional regulatory T cells upon antigen encounter. *PLoS One*. 2012 7(1):e29355.
318. McCauley LK, Mj Somerman MJ (Eds). *Mineralized Tissues in Oral and Craniofacial Science: Biological Principles and Clinical Correlates*. Wiley-Blackwell. 2012. ISBN: 978-0-470-95833-9.
319. McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res*. 1960 13:115-25.

320. Mehta A. Risk factors associated with periodontal diseases and their clinical considerations. *Int J Contemp Dent Med Rev.* 2015 1–15.
321. Mei YB, Zhou WQ, Zhang XY, Wei XJ, Feng ZC. Lipopolysaccharides shapes the human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Physiol Biochem.* 2013 32(2):390-401.
322. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 20(5-6):419-27.
323. Ménard C, Tarte K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Res Ther.* 2013 4(3):64.
324. Merino-González C, Zuñiga FA, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C, Nova-Lamperti E, Salomón C, Aguayo C. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potencial clinical application. *Front Physiol.* 2016 7:24 eCollection 2016.
325. Miletić M, Mojsilović S, Okić Đorđević I, Kukulj T, Jauković A, Santibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. *Arch Biol Sci.* 2014 66(1):261-271.
326. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, Xu D, Sattar N, McInnes IB, Liew FY. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res.* 2010 107(5):650-8.
327. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway-A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2011 131(2):179-86.
328. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008 205(2):339–46.
329. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond).* 2011 8(1):22.
330. Mirono V, Visconti RP, Markwald RR. What is regenerative medicine? The emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 4(6):773-81.
331. Mitsiadis TA, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater.* 2015 30:248-57.
332. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury and Inflammation. *Immunity.* 2015 42(6):1005-19.
333. Moon JS, Cheong NR, Yang SY, Kim IS, Chung HJ, Jeong YW, Park JC, Kim MS, Kim SH, Ko HM. Lipopolysaccharide-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the periodontalligament. *J Periodontal Res.* 2013 48(6):733-9.
334. Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real JM. Adipocyte differentiation. In: Symonds ME (Ed.). *Adipose Tissue Biology.* Springer. 2012. ISBN: 978-1-4614-0965-6; pp. 17-38.
335. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006 441(7097):1068-74.

336. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 505(7483):327–34.
337. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008 3(10):e3331.
338. Mrozik KM, Wada N, Marino V, Richter W, Shi S, Wheeler DL, Gronthos S, Bartold PM. Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regen Med*. 2013 8(6):711-23.
339. Muller WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol*. 2011 6:323-44.
340. Muller-Sieburg CE, Sieburg HB, Bernitz JM, Cattarossi G. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood*. 2012 119(17):3900-7.
341. Munir H, Luu NT, Clarke LS, Nash GB, McGettrick HM. Comparative ability of mesenchymal stromal cells from different tissues to limit neutrophil recruitment to inflamed endothelium. *PLoS One*. 2016 11(5):e0155161 eCollection 2016.
342. Munir H, Rainger GE, Nash GB, McGettrick H. Analyzing the effects of stromal cells on the recruitment of leukocytes from flow. *J Vis Exp*. 2015 (95):e52480.
343. Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2010 58(3):561-8.
344. Murray IR, Péault B. Q&A: Mesenchymal stem cells - where do they come from and is it important? *BMC Biol*. 2015 13:99.
345. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014 2014:476068.
346. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2006 41(4):303-10.
347. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4):392-403.
348. Nagyova M, Slovinska L, Blasko J, Grulova I, Kuricova M, Cigankova V, Harvanova D, Cizkova D. A comparative study of PKH67, DiI, and BrdU labeling techniques for tracing rat mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 201450(7):656–63.
349. Najar M, Krayem M, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune Netw*. 2017 17(2):89-102.
350. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development (Cambridge, England)*. 2014 141(24):4656–66.
351. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease.

Periodontol 2000. 2006 40:11-28.

352. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006 108:2114–20.
353. Nawrocka D, Kornicka K, Szydlarska J, Marycz K. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis and promotes proliferation of adipose-derived mesenchymal stromal cells isolated from patients with type 2 diabetes by reducing cellular oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017 2017:3027109.
354. Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K. Human pluripotent stem cells: Towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases. *World J Stem Cells*. 2016 8(2):56-61.
355. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development*. 2007 134(4):635-46.
356. Nombela-Arrieta C, Isringhausen S. The role of the bone marrow stromal compartment in the hematopoietic response to microbial infections. *Front Immunol*. 2017 7:689 eCollection 2016.
357. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 12(2):126-31.
358. Numata T, Ito T, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R. IL-33 promotes ICAM-1 expression via NF- κ B in murine mast cells. *Allergol Int*. 2016 65(2):158-165.
359. Ogawa T, Yagi T. Bioactive mechanism of *Porphyromonas gingivalis* lipid A. *Periodontology* 2000. 2010 54(1)71–7.
360. Ogawa T. Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 1993 332(1-2): 197–201.
361. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1999 19(11)1279–88.
362. Osyczka AM, Diefenderfer DL, Bhargava G, Leboy PS. Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells. Tissues. Organs*. 2004 176(1-3):109-19.
363. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *A. J. Ciba Found. Symp*. 1988 136:42-60.
364. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck WA (Ed.). *Bone and Mineral Research*. Elsevier, New York. 1985. pp. 1–25.
365. Padeta I, Nugroho WS, Kusindarta DL, Fibrianto YH, Budipitojo T. Mesenchymal stem cell-conditioned medium promote the recovery of skin burn wound. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances (AJAVA)*. 2017 12(3):132-141.
366. Pagella P, Neto E, Lamghari M, Mitsiadis TA. Investigation of orofacial stem cell niches and their innervation through microfluidic devices. *Eur Cell Mater*. 2015 29:213-23.

367. Palmer G, Lipsky BP, Smithgall MD, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, Gabay C, Smith DE. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine*. 2008 42(3):358–364.
368. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 60(3):738–749.
369. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004 113(2):153-62.
370. Panagakos F, Scannapieco F. Periodontal Inflammation: From Gingivitis to Systemic Disease? In: Panagakos F (Ed.). *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment*. InTech Open. 2011. ISBN: 978-953-307-376-7; pp. 155-168.
371. Pang S, Shen J, Liu Y, Chen F, Zheng Z, James AW, Hsu CY, Zhang H, Lee KS, Wang C, Li C, Chen X, Jia H, Zhang X, Soo C, Ting K. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by a short isoform of NELL-1. *Stem Cells*. 2015 33(3):904-15.
372. Pappenheim A. Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie*. 1896 145:587–643.
373. Pappenheim A. Zwei Fälle akuter grosslymphozytärer Leukämie. *Folia Haematologica*. 1907 4:301–8. On Pappenheim and his haematological work see: Dinser Ricarda. *Der Beitrag Artur Pappenheims zur Hämatologie um die Jahrhundertwende*. Ruhr-Universität Bochum; 2001. MD thesis.
374. Parish CR, Glidden MH, Quah BJ, Warren HS, Coligan JE. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol*. 2009 Chapter 4:Unit4.9. doi: 10.1002/0471142735.im0409s84.
375. Parish CR, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current Protoc Immunol*. 2002 Chapter 4: Unit 4.9.
376. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *J ClinPeriodontol*. 2011 38(8): 721-31.
377. Pascual-Figal DA, Lax A, Perez-Martinez MT, del Carmen Asensio-Lopez M, Sanchez-Mas J; GREAT Network. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2016 54(1):29-35.
378. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*. 2006 42:80–7.
379. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*. 2012 60(1)15–39.
380. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem*. 2012 113(9):2806-12.
381. Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, Sorrentino V.

- Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev.* 2011 20(5):915-23.
382. Pitaru S, Narayanan AS, Etikala A, Treves-Manusevitz S. Periodontal stem cells: A historical background and current perspectives. *Curr Oral Health Rep.* 2014 1(1):26-33.
383. Pöllänen MT, Laine MA, Ihalin R, Uitto VJ. Host-bacteria crosstalk at the dentogingival junction. *Int J Dent.* 2012; 2012:821383
384. Prockop DJ. Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biol.* 2016 51:7-13.
385. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997. 276(5309):71-4.
386. Proserpio V, Mahata B. Single-cell technologies to study the immune system. *Immunology.* 2016 147(2):133-40.
387. Qi C, Zhang J, Chen X, Wan J, Wang J, Zhang P, Liu Y. Hypoxia stimulates neural stem cell proliferation by increasing HIF-1 α expression and activating Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Mol. Biol (Noisy-le-grand).* 2017 63(7):12-9.
388. Qin Z, Fang Z, Zhao L, Chen J, Li Y, Liu G. High dose of TNF- α suppressed osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling. *J. Mol. Histol.* 2015 46(4-5):409-20.
389. Qiu J, Papatsenko D, Niu X, Schaniel C, Moore K. Divisional history and hematopoietic stem cell function during homeostasis. *Stem Cell Reports.* 2014 2(4):473-90.
390. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols.* 2007 2(9):2049–2056.
391. Quinn C, Flake AW. In vivo differentiation potential of mesenchymal stem cells: prenatal and postnatal modelsystems. *Transfus Med Hemother.* 2008 35(3):239-47.
392. Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, Nagy A, Varga G. Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *J Physiol Pharmacol.* 2014 65(3):327-39.
393. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells.* 2008 26(1):151-62.
394. Raggioli A, Junghans D, Rudloff S, Kemler R. Beta-catenin is vital for the integrity of mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 2014 9(1):e86691 eCollection 2014.
395. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007 1(1):35-8.
396. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007 26(22):3100-112.

397. Ramasamy R, Krishns K, Maqbool M, Vellasamy S, Sarmadi VH, Abdulah M, Vidyadaran S. The effect of human mesenchymal stem cell on neutrophil oxidative burst. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2010 6(2):11-17.
398. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 2006 441(7097):1080-86.
399. Rashedi I, Gómez-Aristizábal A, Wang XH, Viswanathan S, Keating A. TLR3 or TLR4 activation enhances mesenchymal stromal cell-mediated Treg induction via Notch signaling. *Stem Cells*. 2017 35(1):265-275.
400. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 12(3):154–68.
401. Reisman M, Adams KT. Stem cell therapy: a look at current research, regulations, and remaining hurdles. *P T*. 2014 39(12):846-57.
402. Rennerfeldt DA, Van Vliet KJ. Concise Review: when colonies are not clones: evidence and implications of intracolony heterogeneity in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2016 34(5):1135-41.
403. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017 16(1):31.
404. Ring A, Kim YM, Kahn M. Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev*. 2014 10(4):512-25.
405. Rizvanov AA, Persson J, Şahin F, Bellusci S, Oliveira PJ. Hematopoietic and mesenchymal stem cells in biomedical and clinical applications. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3157365.
406. Robey P. “Mesenchymal Stem Cells”: Fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000res*. 2017 20;6. Pii: F1000 Faculty Rev-524 ecollection 2017.
407. Rodolfa KT. Inducing pluripotency. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27062/>
408. Romeo L, Diomede F, Gugliandolo A, Scionti D, Lo Giudice F, Lanza Cariccio V, Iori R, Bramanti P, Trubiani O, Mazzon E. Moringin induces neural differentiation in the stem cell of the human periodontal ligament. *Sci Rep*. 2018 14;8(1):9153.
409. Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol*. 2011 750:47-59.
410. Rothenberg EV. Lineage determination in the immune system. *Immunol Rev*. 2010 238(1):5–11.
411. Rouabhia M. Advantages and limitations of oral stem cell use for oral tissue replacement. *J Oral Biol*. 2015 2(1):9
412. Roussel L, Erard M, Cayrol C and Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep*. 2008 9(10):1006-12.

413. Rozenberg A, Rezk A, Boivin MN, Darlington PJ, Nyirenda M, Lia R, Jalili F, Winer R, Artsy EA, Uccelli A, Reese JS, Planchon SM, Cohen JA, Bar-Or A. Human mesenchymal stem cells impact Th17 and Th1 responses through a prostaglandin E2 and myeloid-dependent mechanism. *Stem Cells Trans Med.* 2016 5(11):1506-14.
414. Rucci N. Molecular biology of bone remodeling. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008 5(1): 49-56.
415. Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006 108(12):3938-44.
416. Rutkovskiy A, Stensløkken KO, Vaage IJ. Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016 22:95-106.
417. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, Cossu G, Serafini M, Sampaolesi M, Tagliafico E, Tenedini E, Saggio I, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. No identical "Mesenchymal Stem Cells" at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports.* 2016 6(6):897-913.
418. Sağlam M, Köseoğlu S, Aral CA, Savran L, Pekbağrıyanık T and Çetinkaya A. Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology.* 2017 105(2):184-90.
419. Saleh M, Shamsasanjan K, Movassaghpourakbari A, Akbarzadehlaleh P, Molaeipour Z. The impact of mesenchymal stem cells on differentiation of hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull.* 2015 5(3):299-304.
420. Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathan P, Puan KJ, Röttschke O, Hui JH, Raghunath M, Stanton LW, Nurcombe V, Cool SM. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells.* 2015 33(6):1878-91.
421. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007 117(6):1538-49.
422. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res.* 2000 79(10):1808-14.
423. Schäfer R, Spohn G, Baer PC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Can preconditioning strategies improve therapeutic efficacy? *Transfus Med Hemother.* 2016 43(4):256-267.
424. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil.* 2009 36(5): 368-89.
425. Schepers K, Fibbe WE. Unraveling mechanisms of mesenchymal stromal cell-mediated immunomodulation through patient monitoring and product characterization. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 1370(1):15-23.

426. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Frohlich A, Adelman K, Wohlfert EA, Pott J, Griseri T, Bollrath J, Hegazy AN, Harrison OJ, Owens BMJ, Löhning M, Belkaid Y, Fallon PG, Powrie F. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014 513(7519):564-68.
427. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 23(5):479-90.
428. Schopf RE, Mattar J, Meyenburg W, Scheiner O, Hammann KP, Lemmel EM. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. *J Immunol Methods*. 1984 67(1):109-17.
429. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 2(6):640-53.
430. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 26(1):212-22.
431. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 364(9429):149-55.
432. Seo E, Basu-Roy U, Zavadil J, Basilico C, Mansukhani A. Distinct functions of SOX-2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage. *Mol. Cell. Biol*. 2011 31(22):4593-608.
433. Shahriyari L, Komarova NL. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS One*. 2013 8(10):e76195 eCollection 2013.
434. Shakoori P, Zhang Q, Le AD. Applications of mesenchymal stem cells in oral and craniofacial regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2017 29(1):19-25.
435. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 143(13):2273-80.
436. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2003 18 (2) 213-21.
437. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 2(5):a000414.
438. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol*. 1963 62:327-36.
439. Simonson OE, Domogatskaya A, Volchkov P, Rodin S. The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Ann Med*. 2015 47(5):370-80.
440. Sjöberg LC, Nilsson AZ, Lei Y, Gregory JA, Adner M, Nilsson GP. Interleukin 33

exacerbates antigen driven airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in a mouse model of asthma. *Sci Rep.* 2017 7(1):4219.

441. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med.* 2014 Sep 3;10:34. doi: 10.1186/1746-160X-10-34.

442. Smith PC. Role of myofibroblasts in normal and pathological periodontal wound healing. *Oral Dis.* 2018 (1-2):26-29.

443. Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep.* 2011 12(2): 113–122.

444. Soheilifar S, Amiri I, Bidgoli M, Hedayatipanah M. Comparison of periodontal ligament stem cells isolated from the periodontium of healthyteeth and periodontitis-affected teeth. *J Dent (Tehran).* 2016 13(4):271-278.

445. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013 2013:130763.

446. Song B, Zhang YL, Chen LJ, Zhou T, Huang WK, Zhou X, Shao LQ. The role of Toll-like receptors in periodontitis. *Oral Dis.* 2017 23(2):168-80.

447. Song IS, Han YS, Lee JH, Um H, Kim HY, Seo BM. Periodontal Ligament Stem Cells for Periodontal Regeneration. *Cur Oral Health Rep.* 2015 2(4):236-44.

448. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cellmediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006 1: e79.

449. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016 7(1):125.

450. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016 7(1):125.

451. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M (Ed.). *Cellular and molecular biology of bone.* Academic Press, Tokyo. 1993. ISBN: 9780080925004 pp. 47–95.

452. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012 21(14):2724–52.

453. Su F, Liu SS, Ma JL, Wang DS, E LL, Liu HC. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of osteoprotegerin-engineered periodontal ligament stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015 6:22.

454. Suganuma T, Workman JL. MAP kinases and histone modification. *J Mol Cell Biol.* 2012 4(5):348-50.

455. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus

- mice and humans. *Stem Cells*. 2009 27(6):1421-32.
456. Symonds CE, Galderisi U, Giordano A. Aging of the inceptive cellular population: the relationship between stem cells and aging. *Aging (Albany NY)*. 2009 1(4):372-81.
457. Tada H, Shimauchi H, Takada H, Matsushita K. Possible Roles of IL-33 in Periodontal Diseases: *Porphyromonas gingivalis* Induced IL-33 in Human Gingival Epithelial Cells. In: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds). *Interface Oral Health Science 2014*. Springer, Tokyo. 2015. ISBN: 978-4-431-55192-8; pp. 293-303.
458. Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H. *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells. *Biomed Res*. 2017 38(3):167-173.
459. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 107(1):7-11.
460. Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K. The role of NF-κB signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2013 8(2) e56399.
461. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007 129(7):1377-1388.
462. Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development*. 2015 142(4):787-96.
463. Talabot-Ayer D, Martin P, Vesin C, Seemayer CA, Vigne S, Gabay C, Palmer G. Severe neutrophil-dominated inflammation and enhanced myelopoiesis in IL-33-overexpressingCMV/IL33 mice. *J Immunol*. 2015 194(2):750-60.
464. Tan J, Zhou L, Xue P, An Y, Luo L, Zhang R, Wu G, Wang Y, Zhu H, Wang Q. Tumor Necrosis Factor-α attenuates the osteogenic differentiation capacity of periodontal ligament stem cells by activating PERK signaling. *J Periodontol*. 2016 87(8):e159-71.
465. Tan Y, Kagan JC. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol Cell*. 2014 54(2):212-23.
466. Tang HN, Xia Y, Yu Y, Wu RX, Gao LN, Chen FM. Stem cells derived from "inflamed" and healthy periodontal ligament tissues and their sheet functionalities: a patient-matched comparison. *J Clin Periodontol*. 2016 43(1):72-84.
467. Tang L, Bergevoet SM, Gilissen C, de Witte T, Jansen JH, van der Reijden BA, Raymakers RA. Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells. *BMC Pharmacol*. 2010 10:12.
468. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2015 12(1):72-7 eCollection 2015.

469. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 1968 161(3836):54-6.
470. Thiam AR, Farese RV Jr, Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013. 14:775-86.
471. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 282(5391):1145-7.
472. Tian Y, Wang J, Wang W, Ding Y, Sun Z, Zhang Q, Wang Y, Xie H1, Yan S, Zheng S. Mesenchymal stem cells improve mouse non-heart-beating liver graft survival by inhibiting Kupffer cell apoptosis via TLR4-ERK1,2-Fas/FasL-caspase3 pathway regulation. *Stem Cell Res Ther*. 2016 7(1):157.
473. Tian Y, Xu Y, Xue T, Chen L, Shi B, Shu B, Xie C, Max Morandi M, Jaeblo T, Marymont JV, Dong Y. Notch activation enhances mesenchymal stem cell sheet osteogenic potential by inhibition of cellular senescence. *Cell. Death. Dis*. 2017 8(2):e2595.
474. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res*. 1961 14:213-22.
475. Tomás I, Arias-Bujanda N, Alonso-Sampedro M, Casares-de-Cal MA, Sánchez-Sellero C, Suárez-Quintanilla D, Balsa-Castro C. Cytokine-based predictive models to estimate the probability of chronic periodontitis: development of diagnostic nomograms. *Sci Rep*. 2017 7(1):11580.
476. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 2008 26(1):99-107.
477. Trivanović D, Jauković A, Popović B, Krstić J, Mojsilović S, Okić-Djordjević I, Kukolj T, Obradović H, Santibanez JF, Bugarski D. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci*. 2015 141:61-73.
478. Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016 17(3):194–200.
479. Trubiani O, Ballerini P, Murmura G, Pizzicannella J, Giuliani P, Buccella S, Caputi S. Toll-like receptor 4 expression, interleukin-6, -8 and Ccl-20 release, and NF- κ B translocation in human periodontal ligament mesenchymal stem cells stimulated with LPS-*P. Gingivalis*. *European Journal of Inflammation*. 2012 10(1):81-9.
480. Tsai CC, Hung SC. Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*. 2012 11(20):3711-2.
481. Tsai KS, Yang SH, Lei YP, Tsai CC, Chen HW, Hsu CY, Chen LL, Wang HW, Miller SA, Chiou SH, Hung MC, Hung SC. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology*. 2011 141(3):1046-56.
482. Ullah I, Subbarao RB, Kim EJ, Bharti D, Jang SJ, Park JS, Shivakumar SB, Lee SL, Kang D,

- Byun JH, Park BW, Rho GJ. In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sci.* 2016 J154:39-51.
483. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015 35(2). pii: e00191
484. Uribe-Etxebarria V, Luzuriaga J, García-Gallastegui P, Agliano A, Unda F, Ibarretxe G. Notch/Wnt cross-signalling regulates stemness of dental pulp stem cells through expression of neural crest and core pluripotency factors. *Eur Cell Mater.* 2017 34:249-70.
485. Vega-Letter AM, Kurte M, Fernández-O'Ryan C, Gauthier-Abeliuk M, Fuenzalida P, Moya-Urbe, Altamirano C, Figueroa F, Irrarázabal C, Carrión F. Differential TLR activation of murine mesenchymal stem cells generates distinct immunomodulatory effects in EAE. *Stem Cell Res Ther.* 2016 7(1):150.
486. Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2012 2(3):154-62.
487. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 18(9):pii: E1852.
488. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol.* 2009 219(3):667-76.
489. Wagenaar JF, Gasem MH, Goris MG, Leeftang M, Hartskeerl RA, van der Poll T, van 't Veer C, van Gorp EC. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 3(6):e453.
490. Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2010 14(1-2):337-50.
491. Wang J, Dai J, Liu B, Gu S, Cheng L, Liang J. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activates canonical Wnt/ β -catenin and p38 MAPK signalling in stem cells from the apical papilla. *Inflammation.* 2013 36(6):1393-402.
492. Wang JC, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay. *Blood.* 1997 89(11):3919-24.
493. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, Yang Q, Wang C, Duan Y, Jin Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A.* 2011 17(7-8):1015-26.
494. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 12(10):643-55.
495. Wang PL, Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival Fibroblast-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002 13(2):132-42.

496. Wang Q, Ding G, Xu X. Periodontal ligament stem cells regulate apoptosis of neutrophils. *Open Med (Wars)*. 2017 12:19-23 eCollection 2017 Jan.
497. Wang W, Bochtler T, Wuchter P, Manta L, He H, Eckstein V, Ho AD, Lutz C. Mesenchymal stromal cells contribute to quiescence of therapy-resistant leukemic cells in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2017 99(5):392-398.
498. Wang X, Hisha H, Mizokami T, Cui W, Cui Y, Shi A, Song C, Okazaki S, Li Q, Feng W, Kato J, Ikehara S. Mouse mesenchymal stem cells can support human hematopoiesis both *in vitro* and *in vivo*: the crucial role of neural cell adhesion molecule. *Haematologica*. 2010 95(6):884-91.
499. Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, Bai SZ, Dong Y, Chen FM, Zhao YM. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. *Sci Rep*. 2016 6:28126.
500. Wasmer MH, Krebs P. The role of IL-33-dependent inflammation in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2017 7:682 eCollection 2016.
501. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010 5(4):e10088.
502. Watters JJ, Sommer JA, Pfeiffer ZA, Prabhu U, Guerra AN, Bertics PJ. A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. *J Biol Chem*. 2002 277(11):9077-87.
503. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 34(6):747-54.
504. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 100(1):157-68.
505. Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003 91(1):1-12.
506. Whitfield MJ, Lee WC, Van Vliet KJ. Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res*. 2013 11(3):1365-77.
507. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008 135(6):1118-29.
508. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005 85(2):635-78.
509. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*. 2003 34(6):461-75.
510. Wohrer S, Knapp DJ, Copley MR, Benz C, Kent DG, Rowe K, Babovic S, Mader H, Oostendorp RA, Eaves CJ. Distinct stromal cell factor combinations can separately control

- hematopoietic stem cell survival, proliferation, and self-renewal. *Cell Rep.* 2014. 7(6):1956-67.
511. Wolf DP, Morey R, Kang E, Ma H, Hayama T, Laurent LC, Mitalipov S. Concise Review: Embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer: a horse in the race? *Stem Cells.* 2017 35(1):26-34.
512. Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther.* 2015 151:107-20.
513. Wu KH, Wu HP, Chan CK, Hwang SM, Peng CT, Chao YH. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: from bench to bedsides. *Cell Transplant.* 2013 22(4):723-9.
514. Wu T, Liu Y, Wang B, Li G. The roles of mesenchymal stem cells in tissue repair and disease modification. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014 9(5):424-31.
515. Wu XB, Liu Y, Wang GH, Xu X, Cai Y, Wang HY, Li YQ, Meng HF, Dai F, Jin JD. Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- κ B activation. *Sci Rep.* 2016 6:21420.
516. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2014 7: 89–99.
517. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 105(31):10913–18.
518. Xu H, Bai D, Ruest LB, Feng JQ, Guo YW, Tian Y, Jing Y, He Y, Han XL. Expression analysis of α -smooth muscle actin and tenascin-C in the periodontal ligament under orthodontic loading or in vitro culture. *Int J Oral Sci.* 2015 7(4):232-41.
519. Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2015 7(12):2527-35 eCollection 2015.
520. Xu M, Zhang B, Liu Y, Zhang J, Sheng H, Shi R, Liao L, Liu N, Hu J, Wang J, Ning H, Liu T, Zhang Y, Chen H. The immunologic and hematopoietic profiles of mesenchymal stem cells derived from different sections of human umbilical cord. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014 46(12):1056-65.
521. Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. PLAP-1/asperin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem.* 2007 282(32):23070-80.
522. Yamashita YM, MT Fuller. Asymmetric centrosome behaviour and the mechanisms of stem cell division. *J Cell Biol.* 2008 180(2):261-66.
523. Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, AJ Hunt. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 2(1):a001313.
524. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory

properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010 1(1):5.

525. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2011 90(3):317-324.

526. Yang J, Plikus MV, Komarova NL. The role of symmetric stem cell divisions in tissue homeostasis. *PLoS Comput Biol.* 2015 11(12):e1004629 eCollection 2015 Dec.

527. Yang JX, Zhang N, Wang HW, Gao P, Yang QP, Wen QP. CXCR4 receptor overexpression in mesenchymal stem cells facilitates treatment of acute lung injury in rats. *J Biol Chem.* 2015 290(4):1994-2006.

528. Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol.* 2005 40(10):813-19.

529. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008 87(8):767-71.

530. Yoshizawa T, Takizawa F, Iizawa F, Ishibashi O, Kawashima H, Matsuda A, Endo N, Kawashima H. Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 2004 24(8): 3460-72.

531. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007 52(1 Suppl):S4-16.

532. Yu PF, Huang Y, Han YY, Lin LY, Sun WH, Rabson AB, Wang Y, Shi YF. TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2⁺ neutrophils. *Oncogene.* 2017 36(4):482-90.

533. Zachar L, Bačenková D, Rosocha J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J Inflamm Res.* 2016 9:231-240 eCollection 2016.

534. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, Zhu X, Lu C, Liang W, Liao L, Zenke M, Zhao RC. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood.* 2009 113(1): 46-57.

535. Zhang C, Yan B, Cui Z, Cui S, Zhang T, Wang X, Liu D, Yang R, Jiang N, Zhou Y, Liu Y. Bone regeneration in minipigs by intrafibrillarly-mineralized collagen loaded with autologous periodontal ligament stem cells. *Sci Rep.* 2017 7(1):10519.

536. Zhang F, Lu M, Wang H, Ren T. Aspirin attenuates angiotensin II-induced inflammation in bone marrow mesenchymal stem cells via the inhibition of ERK1,2 and NF- κ B activation. *Biomed Rep.* 2013 1(6):930-34.

537. Zhang F, Song J, Zhang H, Huang E, Song D, Tollemar V, Wang J, Wang J, Mohammed M, Wei Q, Fan J, Liao J, Zou Y, Liu F, Hu X, Qu X, Chen L, Yu X, Luu HH, Lee MJ, He TC, Ji P. Wnt and BMP signaling crosstalk in regulating dental stem cells: implications in dental tissue engineering. *Genes Dis.* 2016 3(4):263-76.

538. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-

- negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2013 16(6):779-85.
539. Zhang J, Li ZG, Si YM, Chen B, Meng J. The difference on the osteogenic differentiation between periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells under inflammatory microenviroments. *Differentiation.* 2014 88(4-5):97-105.
540. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 43(9): 1383-91.
541. Zhang L, Zhou Y, Sun X, Zhou J, Yang P. CXCL12 overexpression promotes the angiogenesis potential of periodontal ligament stemcells. *Sci Rep.* 2017 7(1):10286.
542. Zhang W, Ju J, Rigney T, Tribble G. *Porphyromonas gingivalis* infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblasticbone formation in a periodontitis mouse model. *BMC Oral Health.* 2014 14:89.
543. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal Of Cellular Immunotherapy.* 2016 2(1):3-20.
544. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 2010 19(5):607-14.
545. Zhao W, Hu Z. The enigmatic processing and secretion of interleukin-33. *Cell Mol Immunol.* 2010 7(4): 260–62.
546. Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y. Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue. Eng Part A.* 2009 15(9):2363-71.
547. Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int.* 2015 2015:972313.
548. Ziegler P, Boettcher S, Takizawa H, Manz MG, Brümmendorf TH. LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann Hematol.* 2016 95(2):173-78.
549. Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning.* 2015 8:125-34 eCollection 2015.
550. Zong C, Zhang H, Yang X, Gao L, Hou J, Ye F, Jiang J, Yang Y, Li R, Han Z, Wei L. The distinct roles of mesenchymal stem cells in the initial and progressive stage of hepatocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2018 9(3):345.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Тамара Кукољ рођена је 12. децембра 1988. године у Београду. Након завршене IX београдске гимназије, школске 2007/2008. године уписала је студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, смер Молекуларна биологија и физиологија. Основне академске студије завршила је 2010. године са просечном оценом 9,34. Исте године уписала је мастер студије на Биолошком факултету, смер Молекуларна биологија и физиологија, а 2011. године определила се за модул Експериментална биомедицина. Мастер студије завршила је 2012. године одбравивши мастер рад под називом „Ефекат мезенхимских матичних ћелија и њихових солубилних продуката на пролиферацију три туморске ћелијске линије“ са оценом 10, док је просечна оцена положених испита на мастер студијама износила 9,52. Експериментални део мастер рада реализован је у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду у оквиру националног пројекта *Регенеративни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија* (ОИ 175062). Докторске студије Тамара Кукољ уписала је 2012. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, на модулу Биологија ћелија и ткива, при чему је положила све програмом предвиђене испите са просечном оценом 9,90. Од априла 2013. године Тамара Кукољ укључена је у рад исте Лабораторије, као стипендиста докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије. Тамара Кукољ је 26.02.2015. изабрана у звање истраживач-сарадник, а од октобра 2016. године запослена на истом пројекту Лабораторије за експерименталну хематологију и матичне ћелије.

Тамара Кукољ ангажована је и на међународним билатералним пројектима и то са Републиком Аустријом и Републиком Словачком. Такође, као део истраживачког тима Лабораторије за експерименталну хематологију и матичне ћелије од 2017. године, Тамара Кукољ укључена је у COST акцију CA16119 под називом: *In vitro total cell guidance and fitness (Cellfit)*, док је од 2018. године укључена у COST акцију CA17116 под називом: *International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches (SPRINT)*.

Захваљујући стипендијама Тамара Кукољ је током 2015. године похађала курс *The seventh EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS)* и курс *CellFit Training school 2018: „Dream it, print it, do it“ A practical full immersion course of 3D printing* током 2018. године. Уз то, Тамара Кукољ је коаутор едукативне изложбе „Замршено одрастање матичне ћелије“ на 9. Фестивалу науке, као и изложбе „Матичне ћелије – Алхемија 21. века“ у Музеју науке и технике у Београду, реализоване у организацији Центра са промоцију науке.

До сада је Тамара Кукољ у сарадњи са другим ауторима објавила укупно 23 публикације, од тога је 15 библиографских јединица објављено у целини: 6 радова у врхунским међународним часописима (M21), 4 рада у истакнутим међународним часописима (M22), 2 рада у међународним часописима (M23), 2 рада у националним часописима (M53) и један рад у тематском зборнику националног значаја (M44). Тамара Кукољ коаутор је 6 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34) и 2 саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара Кукољ

Број индекса Б3030/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Утицај LPS и IL-33 на адултне матичне ћелије ткива периодонцијума:
функцијске промене и активирани молекулски механизми“**

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

Потпис аутора

У Београду, 21.09.2018.

Тамара Кукољ

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Кукољ

Број индекса Б3030/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Утицај LPS и IL-33 на адултне матичне ћелије ткива периодонцијума: функцијске промене и активирани молекулски механизми“

Ментори Др Дренка Тривановић, научни сарадник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Др Диана Бугарски, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 21.09.2018.

Тамара Кукољ

Изјава о коришћењу

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

„Утицај LPS и IL-33 на адултне матичне ћелије ткива периодонцијума: функцијске промене и активирани молекулски механизми“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 21.09.2018.



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

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

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

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

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

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