

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana N. Okić Đorđević

EFEKTI INTERLEUKINA-17 NA FUNKCIONALNA  
SVOJSTVA HUMANIH MEZENHIMSKIH  
MATIČNIH ĆELIJA PERIODONCIJUMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana N. Okić Đorđević

**EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON FUNCTIONAL  
PROPERTIES OF HUMAN PERIODONTAL  
LIGAMENT MESENCHYMAL STEM CELLS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

## KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

**Mentor:**

---

**dr Aleksandra Jauković**, *viši naučni saradnik*

*Institut za medicinska istraživanja,*

*Univerzitet u Beogradu*

**Članovi komisije:**

---

**dr Biljana Božić**, *vanredni profesor*

*Biološki fakultet,*

*Univerzitet u Beogradu*

---

**dr Jelena Krstić**, *naučni saradnik*

*Institut za medicinska istraživanja,*

*Univerzitet u Beogradu*

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

Ova disertacija je u potpunosti urađena u **Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu**, u okviru projekta osnovnih istraživanja (OI175062), pod nazivom „**Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija**“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije čiji je rukovodilac dr Diana Bugarski

*Vuku*

## ZAHVALNICA

*Najveću zahvalnost dugujem mentorki dr Aleksandri Jauković na dugogodišnjoj saradnji, prenesenom znanju, strpljenju, pomoći, savetima i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije bez kojih ova teza nikada ne bi bila realizovana.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem ostalim članovima komisije: prof dr Biljani Božić i dr Jeleni Krstić na saradnji, stručnoj pomoći i sadržajnim sugestijama pri konačnom formulisanju ove disertacije.*

*Posebno veliku zahvalnost dugujem dr Diani Bugarski i dr Gordani Jovčić na ukazanom poverenju i prilici da se bavim ovom aktuelnom tematikom kao i na korisnim savetima, razumevanju i sugestijama tokom izrade ove disertacije.*

*Tamari Kukolj, istraživaču-doktorandu, koja je bila uključena u sve segmente izrade ove disertacije veliko hvala. Njena bezrezervna podrška i stručnost su umnogome doprinele kvalitetu ove teze.*

*dr Drenki Trivanović, naučnom saradniku se zahvaljujem na drugarstvu i kolegijalnosti kao i brojnim korisnim savetima u istraživačkom radu.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz laboratorije, posebno dr Huanu Santibanjezu, dr Vesni Ilić, dr Slavku Mojsiloviću, Hristini Obradović i Snežani Marković na svojoj pomoći, konstruktivnim savetima, kolegijalnosti i podršci.*

*Prof dr Aleksandri Korać čija su me nadahnjujuća predavanja zainteresovala i profesionalno usmerila veliko hvala.*

*Hvala dr Maji Miletić na uloženom trudu kako bismo dobili tkiva periodoncijuma za istraživanja sprovedena u okviru ovog rada.*

*Svojim prijateljima se zahvaljujem na razumevanju jer im nisam uvek bila na raspolaganju poslednjih nekoliko godina.*

*Najveću i najiskreniju zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami, Maji, Saši, dedi i Mirki što me prate, vole i podržavaju. Tata, hvala ti na ljubavi i što si bio i ostaćeš uvek uz nas. Mom sinu Vuku, čija me beskrajna ljubav i iskrenost teraju da istrajem i odolim svemu što život nosi.*

## EFEKTI INTERLEUKINA-17 NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA HUMANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA PERIODONCIJUMA

### REZIME

Istraživanja regenerativnih i modulatornih uloga mezenhimskih matičnih ćelija (MMC) u poslednjih nekoliko decenija su zaokupirala pažnju naučnika s obzirom da ove ćelije ispoljavaju karakteristike koje ukazuju na mogućnosti njihove primene u regenerativnoj medicini, kao i na polju ćelijske terapije. Iako MMC izolovane iz različitih adultnih i neonatalnih izvora ispoljavaju potencijal samoobnove i multipotentne diferencijacije (u ćelije mezodermalnog, ali i ektodermalnog i endodermalnog porekla), mnoga istraživanja koja se tiču funkcionalnih karakteristika ovih ćelija tek predstoje kako bi njihova primena bila efikasna i bezbedna.

Jedan od novije otkrivenih izvora MMC je i tkivo periodoncijuma koje predstavlja bogat i lako dostupan izvor MMC, s obzirom da se ovo tkivo dobija nakon ekstrakcije zuba iz ortodontskih razloga. Periodoncijum je vezivno tkivo čija je glavna uloga uspostavljanje čvrste veze između korena zuba i alveolarne kosti. Regenerativni potencijal MMC periodoncijuma (PD-MMC) ogleda se u njihovom potencijalu samoobnove i multipotentne diferencijacije, kao i sposobnosti formiranja tkiva sličnih potpornom tkivu zuba, uključujući periodoncijum i cement. Ove osobine čine PD-MMC dobrim kandidatima za primenu u regeneraciji potpornog tkiva zuba u parodontopatiji, hroničnom inflamatornom oboljenju uzrokovanom bakterijama zubnog plaka. Razvoj hronične parodontopatije podrazumeva procese remodelovanja koštanog tkiva pod uticajem brojnih faktora u koje su uključeni osteoblasti i osteoklasti koji ostvaruju recipročne interakcije sa ćelijama imunskog odgovora regulišući inflamaciju i degradaciju koštanog tkiva. Uloga lokalne mikrosredine u parodontopatiji predstavlja jedan od ključnih faktora u kontekstu ćelijskog odgovora tkiva periodoncijuma na perzistentnu infekciju. U okviru parodontalnih lezija potvrđeno je prisustvo Th17 (od engl. *T helper cells17*) ćelija, značajnih regulatora tkivnog razaranja u toku zapaljenskih procesa, koje proizvode proinflamatorni citokin interleukin (IL)-17. U kontekstu parodontopatije, do sada je pokazano da IL-17 ostvaruje svoju ulogu stimulišući

privlačenje neutrofila na mesto inflamacije kao i direktnim stimulatornim delovanjem Th17 ćelija na diferencijaciju osteoklasta. S druge strane, poznato je da IL-17 reguliše funkcionalne osobine, poput proliferacije i diferencijacije, kako mišjih tako i humanih MMC pri čemu je pokazano da ispoljeni efekti IL-17 zavise od vrste davaoca i tkivnog porekla MMC.

Kako u literaturi nema dovoljno podataka o biološkim efektima i mehanizmima delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMC, ciljevi ove disertacije su, pored izolacije i karakterizacije PD-MMC, bili usmereni na ispitivanje uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva ovih ćelija kao i molekularnih mehanizama uključenih u delovanje IL-17 na PD-MMC. Kako bi se zadovoljili kriterijumi Komiteta za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, karakterizacija PD-MMC izolovanih iz zdravih osoba je izvedena ispitivanjem sposobnosti adhezije izolovanih ćelija za plastiku, određivanjem ekspresije markera mezenhimskih, hematopoetskih, kao i embrionalnih matičnih ćelija kao i ispitivanjem sposobnosti PD-MMC da se diferenciraju u tri ćelijske loze (osteogenu, adipogenu i hondrogeno) nakon kultivacije u odgovarajućim diferencijacionim medijumima. U drugom delu istraživanja ispitivani su uticaji i mehanizmi delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMC, uključujući njihovu proliferaciju, klonogeni kapacitet, migraciju i osteogenu diferencijaciju. U kontekstu osteogene diferencijacije praćena je ekspresija gena za markere osteogeneze (alkalnu fosfatazu (ALP), Osteoklacin (Ocn) i RUNX2/Cbfa1 (od engl. *Runt-related transcription factor 2/Core binding factor 1*)) u PD-MMC kultivisanim u osteogenom diferencijacionom medijumu. Dodatno je ispitivano učešće MAPK (od engl. *Mitogen Associated Protein Kinases*) signalnih puteva u delovanju IL-17 na funkcionalne osobine PD-MMC. Trećim segmentom istraživanja obuhvaćena su ispitivanja uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na ekspresiju i aktivnost enzima uključenih u razgradnju komponenti ekstraćelijskog matriksa, poput matriksnih metaloproteinaza (MMP) i urokinaze (uPA, od engl. *urokinase type plasminogen activator*) u PD-MMC. Uz to, ispitivano je i učešće MAPK signalnih puteva u delovanju IL-17 na ekspresiju i aktivnost ovih enzima u PD-MMC. U poslednjem segmentu istraživanja ispitivan je uticaj IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMC određivanjem delovanja IL-17 na potencijal PD-MMC da modulišu spontanu i mitogenom-stimulisanu proliferaciju T limfocita periferne krvi, kao i analizom njegovih efekata na gensku ekspresiju molekula povezanih sa imunomodulatornim delovanjem PD-MMC, uključujući HLA (od engl. *Human Leukocyte Antigen*)-A, HLA-DR, HLA-G, IL-6 i indoleamindioksigenaza-1 (IDO-1).



Rezultati dobijeni u sklopu ove disertacije su pokazali da su PD-MMĆ uspešno izolovane iz svih ispitivanih uzoraka pri čemu je utvrđeno da u skladu sa kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju izolovane ćelije ispoljavaju osnovne karakteristike MMĆ uključujući adherentnost za plastiku, ekspresiju specifičnih markera MMĆ, uz odsustvo ekspresije markera hematopoetskih ćelija, kao i multipotentni potencijal diferencijacije u ćelije osteogene, hondrogene i adipogene loze. Uz to, naši rezultati su pokazali i da izolovane PD-MMĆ eksprimiraju markere embrionalnih matičnih ćelija, Nanog, Oct4, SOX-2 i SSEA4, kao i da ispoljavaju receptor za IL-17.

Ispitivanja uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ su pokazala da IL-17 dovodi do blagog smanjenja proliferacije ovih ćelija samo nakon 24h inkubacije, dok s druge strane stimuliše klonogeni kapacitet PD-MMĆ indukujući povećanje broja CFU-F (od engl. *Colony Forming Unit Fibroblast*) kolonija sličnih fibroblastima. Takođe je utvrđeno da IL-17 inhibira migraciju PD-MMĆ, kao i osteogenu diferencijaciju ovih ćelija indukujući smanjenje ekspresije gena za ALP, RUNX2/Cbfa1 i Ocn. Uz to je pokazano da IL-17 aktivira sve tri klase MAPK: p38, ERK1,2 i JNK u PD-MMĆ, kao i da se inhibitorski efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ ostvaruje preko aktivacije ERK1,2 i/ili JNK MAPK signalnih puteva.

Rezultati dobijeni u sklopu narednog segmenta istraživanja su pokazali da IL-17 indukuje povećanu enzimsku aktivnost, proteinsku i gensku ekspresiju MMP-2 i uPA u PD-MMĆ, dok nema efekta na ekspresiju MMP-9 u ovim ćelijama. Dodatno su naši nalazi pokazali da je stimulatorski efekat IL-17 na ekspresiju MMP-2 i uPA posredovan aktivacijom ERK1,2 MAPK signalnog puta.

U poslednjem segmentu naših ispitivanja uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMĆ dobijeni rezultati su pokazali da IL-17 nema uticaja na sposobnost PD-MMĆ da suprimiraju proliferaciju mitogenom stimuliranih T limfocita. Analizom genske ekspresije molekula povezanih sa imunomodulatornim delovanjem PD-MMĆ utvrđeno je da IL-17 nema uticaja na ekspresiju HLA-A gena, dok dovodi do smanjenja genske ekspresije HLA-G5 u PD-MMĆ. Takođe je pokazano da IL-17 indukuje povećanje genske ekspresije HLA-DR u PD-MMĆ, ali da nema uticaja na površinsku ekspresiju ovog molekula. Uz to, pokazan je stimulatorski efekat IL-17 na ekspresiju gena zaIDO-1 i IL-6 u PD-MMĆ.

Imajući u vidu predstavljene rezultate, može se zaključiti da PD-MMĆ predstavljaju dobar izvor MMĆ koje zadovoljavaju sve kriterijume za karakterizaciju ovih ćelija. Ispitivanja

uticaja IL-17 na funkcionalne osobine PD-MMĆ su pokazala da IL-17 inhibira migraciju i osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ, pri čemu efekte na osteogenu diferencijaciju ostvaruje putem aktivacije ERK1,2 i JNK MAPK. U kontekstu ispitivanja uticaja IL-17 na produkciju enzima uključenih u razgradnju ekstraćelijskog matriksa, utvrđeno je da IL-17 indukuje ekspresiju enzimski aktivne MMP-2 i uPA putem aktivacije ERK1,2 MAPK. Dobijeni podaci ispitivanja uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ ukazuju na potencijalne mehanizme delovanja IL-17 u razvoju paradontopatije i ističu kompleksnost biologije MMĆ i njihove interakcije sa faktorima mikrosredine postavljajući osnovu budućim istraživanjima u cilju pronalaženja novih modaliteta lečenja ovog široko rasprostranjenog inflamatornog oboljenja.

**KLJUČNE REČI:** Mezenhimske matične ćelije, periodoncijum, interleukin-17, osteogena diferencijacija, matriksne metaloproteinaze, urokinazni aktivator plazminogena, imunomodulacija.

**NAUČNA OBLAST:** BIOLOGIJA

**UŽA NAUČNA OBLAST:** IMUNOBIOLOGIJA

**UDK BROJ:**

# EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT MESENCHYMAL STEM CELLS

## SUMMARY

In the last few decades regenerative and modulatory properties of mesenchymal stem cells (MSCs) have gained the attention of scientists since their characteristics indicated the possibility of their use in regenerative medicine and cell therapy. Although MSCs isolated from various adult and neonatal tissues exhibit the potential of self-renewal and multipotent differentiation (towards cells of mesodermal, ectodermal and endodermal origin), many aspects concerning their functional characteristics are yet to be explored.

One of the recently discovered sources of MSCs is easily accessible tissue of periodontal ligament, obtained after tooth extraction for orthodontic reasons. Periodontal ligament tissue strengthens the root of the tooth in the alveolar bone. The regenerative potential of periodontal ligament MSCs (PDLSCs) is reflected in self-renewal and multipotent differentiation ability, as well as potency for the formation of tissues which support the teeth, including the periodontal ligament and cement. These features make the PDLSCs good candidates for use in the regeneration/reconstruction of supporting tissue of teeth in periodontal disease, a chronic inflammatory disease caused by bacterial plaque. The development of chronic periodontal disease includes the process of bone tissue remodeling governed by a number of factors, including osteoblasts and osteoclasts, which reciprocally interact with cellular and humoral compartments of the immune system, thus regulating inflammation, degradation and renewal of bone tissue. The role of the local microenvironment in the periodontal disease is one of the key factors in the context of periodontal ligament tissue response to persistent infection. The presence of T helper cells 17 (Th17) cells, important regulators of tissue destruction during inflammatory processes has been confirmed in periodontal lesions. Th17 cells produce proinflammatory cytokine interleukin (IL)-17. In the context of periodontal disease, as well as in other inflammatory diseases, IL-17 stimulates the activation and migration of neutrophils to the site of inflammation. Additionally, IL-17 directly stimulates differentiation of osteoclasts and contributes to the alveolar bone resorption. On the other hand, it is known that IL-17

regulates functional properties, such as proliferation and differentiation, of both murine and human MSCs, in a manner that depends on the type of host and tissue origin of MSCs.

Since there is not enough data about biological effects of IL-17 on functional properties of PDLSCs and mechanisms involved, the objectives of this thesis include the isolation and characterization of PDLSCs, the analyses of IL-17 effects on functional properties of these cells, as well as investigation of IL-17-initiated underlying mechanisms involved in regulation of PDLSCs properties. In order to meet the criteria of the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, characterization of PDLSCs isolated from healthy individuals has been performed by testing the ability of isolated cells to adhere to plastic surface, determining the expression of mesenchymal, hematopoietic, and embryonic stem cells markers as well as the potential of PDLSCs to differentiate into three cell lineages (osteogenic, adipogenic and chondrogenic) after cultivation in appropriate differentiation medium. In the second part of the study, we have examined the effects of IL-17 on functional properties of PDLSCs, including their proliferation, clonogenic capacity, migration and osteogenic differentiation. In the context of osteogenic differentiation, we have examined gene expression of markers for osteogenesis (alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (Ocn), Runt-related transcription factor 2 / Core binding factor 1 (RUNX2 / Cbfa1) in the PDLSCs cultured in osteogenic medium. In addition, we have investigated the participation of Mitogen Associated Protein Kinases (MAPK) signaling pathways in the IL-17-mediated effects on functional properties of PDLSCs. The third segment of the research has included the analyses of the IL-17 influence and its mechanisms of action on the expression and activity of enzymes involved in the degradation of extracellular matrix components, such are matrix metalloproteinases (MMP) and urokinase type plasminogen activator (uPA) in PDLSCs. In addition, we have investigated the involvement of MAPK signaling pathways in the IL-17-mediated expression of these enzymes in PDLSCs. In the last segment of our study, we have examined the effects of IL-17 on the immunomodulatory properties of PDLSCs by determining the potential of IL-17 to modulate effects of PDLSCs on spontaneous and mitogen-stimulated proliferation of peripheral blood T lymphocytes. Moreover, the effects of IL-17 on gene expression of molecules associated with PDLSCs immunomodulatory properties, such as Human Leukocyte Antigen (HLA)-A, HLA-DR, HLA-G5, IL-6 and Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) have been analyzed.

Results obtained in this thesis showed that PDLSCs have been successfully isolated from all human samples and that morphological and phenotypic characteristics of isolated cells are in agreement with the criteria of the International Society for Cellular Therapy. Isolated cells exhibited the basic characteristics of MSCs including adherence to plastic, the expression of specific MSCs markers (with absence of hematopoietic cells markers expression) and multipotent differentiation potential into cells of osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. In addition, our results have shown that the isolated PDLSCs express markers of embryonic stem cells, Nanog, Oct4, SOX-2 and SSEA4, as well as the receptor for IL-17.

Investigation of the effects of IL-17 on the functional properties of PDLSCs have shown that IL-17 leads to a slight decrease in the proliferation of these cells only after 24 hours of incubation, while it stimulates the clonogenic capacity of PDLSCs increasing the number of Colony Fibroblast forming Unit (CFU-F) colonies. Also, we have found that IL-17 inhibits the migration of PDLSCs and the osteogenic differentiation of these cells, reducing gene expression for ALP, RUNX2 / Cbfa1 and Ocn. In addition, we have shown that IL-17 activates all three classes of MAPK: p38, JNK and ERK1,2 in PDLSCs, and that the inhibitory effect of IL-17 on the osteogenic differentiation of PDLSCs is achieved through activation of ERK1,2 and /or JNK MAPK signaling pathways.

The results obtained in the next segment of research have shown that IL-17 induces enzymatic activity, the protein and the gene expression of MMP-2 and uPA in the PDLSCs, while having no effect on the expression of MMP-9 in these cells. In addition, our findings have indicated that the stimulatory effect of IL-17 on the expression of MMP-2 and uPA is mediated via ERK1,2 MAPK signaling pathway activation.

In the final segment of our investigation we have examined the effect of IL-17 on the immunomodulatory properties of PDLSCs. Obtained results have shown that IL-17 has no influence on the ability to PDLSCs to suppress the proliferation of mitogen-stimulated T lymphocytes. Analyses of gene expression of molecules associated with the immunomodulatory properties of the PDLSCs have shown that IL-17 has no effect on the expression of the HLA-A gene, while it decreases the gene expression of HLA-G in the PDLSCs. Also, it has been demonstrated that IL-17 induces an increase in gene expression of HLA-DR in the PDLSCs, while it has no impact on the surface expression of this molecule. In addition, our results have shown the stimulatory effect of IL-17 on the expression of IDO-1 and IL-6 genes in the PDLSCs.

Bearing in mind presented results, we can conclude that PDLSCs are a good source of MSCs that meet all the criteria for characterization of these cells. Analyses of the influence of IL-17 on the functional properties of PDLSCs have shown that IL-17 inhibits migration and osteogenic differentiation of PDLSCs, wherein the effects on osteogenic differentiation were achieved through activation of the ERK1,2 and JNK MAPKs. Investigations of the IL-17 effects on the production of enzymes involved in the degradation of extracellular matrix have demonstrated that IL-17 induces the expression of enzymatically active MMP-2 and uPA via ERK1,2 MAPK activation. Research data concerning the influence of IL-17 on the functional properties of PDLSCs point to the potential mechanisms of IL-17 action in the development of periodontal disease and highlight the complexity of MSCs biology and their interactions with the microenvironment factors laying the basis for future research aimed at finding the new modalities of treatment for this widespread inflammatory disease.

**KEY WORDS:** mesenchymal stem cells, periodontal ligament, interleukin-17, osteogenic differentiation, matrix metalloproteinases, urokinase plasminogen activator, immunomodulation

**SCIENTIFIC FELD:** BIOLOGY

**SPECIAL TOPICS:** IMMUNOBIOLOGY

**UDK NUMBER:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. MATIČNE ĆELIJE .....	1
1.1.1. Hematopoetske matične ćelije .....	3
1.1.2. Mezenhimske matične ćelije .....	6
1.1.2.1. Pojam, poreklo i karakterizacija MMĆ .....	6
1.1.2.2. Uloga MMĆ u homeostazi i reparaciji oštećenih tkiva .....	10
1.1.2.3. Imunomodulatorna svojstva MMĆ .....	11
1.1.2.4. MMĆ periodoncijuma .....	15
1.2. INTERLEUKIN 17 .....	19
1.2.1. Produkcija IL-17 .....	20
1.2.2. Signalni putevi aktivirani IL-17 .....	21
1.2.3. Biološki efekti IL-17 .....	24
1.3. PARODONTOPATIJA- pojam i progresija bolesti .....	27
1.3.1. Matriksne metaloproteinaze i urokinazni tip plazminogen aktivatora u parodontopatiji .....	31
1.3.2. Imunologija koštanog tkiva .....	33
1.3.3. Th17 imunski odgovor u parodontopatiji .....	36
<b>2. CILJEVI</b> .....	38
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	41
3.1. MATERIJAL .....	41
3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA .....	44
3.2.1. Izolacija i karakterizacija PD-MMĆ .....	44
3.2.2. Ispitivanje uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ .....	45
3.2.3. Ispitivanje uticaja IL-17 na ekspresiju MMP i uPA u PD-MMĆ .....	46
3.2.4. Ispitivanje uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMĆ .....	46
3.3. ĆELIJSKE KULTURE .....	48
3.3.1. Izolacija PD-MMĆ .....	48
3.3.2. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	48

3.4. ISPITIVANJE ĆELIJSKIH FUNKCIJA .....	49
3.4.1. Analiza proliferativnog potencijala PD-MMĆ .....	49
3.4.2. Analiza klonogenog potencijala PD-MMĆ .....	49
3.4.3. Analiza ćelijske migracije PD-MMĆ .....	49
3.4.4. Diferencijacija ćelija .....	50
3.4.4.1. Adipogena diferencijacija PD-MMĆ.....	50
3.4.4.2. Hondrogena diferencijacija PD-MMĆ .....	51
3.4.4.3. Osteogena diferencijacija PD-MMĆ .....	51
3.4.5. Analiza uticaja PD-MMĆ na proliferaciju monuklearnih ćelija periferne krvi.....	52
3.5. ANALIZA ĆELIJSKIH PROTEINA.....	53
3.5.1. Imunofluorescentno obeležavanje ćelija.....	53
3.5.1.1. Protočna citometrija.....	53
3.5.1.2. Indirektna imunofluorescenca .....	54
3.5.2. Western blot analiza.....	54
3.5.2.1. Izolacija membranskih i citosolnih proteina.....	54
3.5.2.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) .....	55
3.5.2.3. Imunoblot.....	55
3.5.2.4. Detekcija proteinskih traka.....	56
3.5.3. Analiza aktivnosti proteinaza metodom zimografije .....	56
3.6. ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE .....	57
3.6.1. Izolacija RNK .....	57
3.6.2. Reverzna transkripcija (RT).....	58
3.6.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR) .....	58
3.6.4. Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata.....	59
3.7. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA.....	59
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>61</b>
4.1. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA PD-MMĆ .....	61
4.1.1. Izolacija, kultivacija i imunofenotipska karakterizacija PD-MMĆ ....	61
4.1.2. Diferencijacija PD-MMĆ .....	64
4.1.3. Ekspresija receptora za IL-17 na PD-MMĆ .....	65
4.2. UTICAJ IL-17 NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA PD-MMĆ .....	67



4.2.1. Uticaj IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ.....	67
4.2.2. Uticaj IL-17 na klonogeni potencijal PD-MMĆ.....	68
4.2.3. Uticaj IL-17 na migraciju PD-MMĆ .....	69
4.2.4. Uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ .....	70
4.3. UNUTARĆELIJSKA SIGNALIZACIJA IL-17 U PD-MMĆ.....	73
4.4. ULOGA MAPK SIGNALNOG PUTA U IL-17 –INDUKOVANOJ INHIBICIJI MIGRACIJE PD-MMĆ .....	76
4.5. UČEŠĆE MAPK SIGNALNOG PUTA U INHIBICIJI OSTEOGENE DIFERENCIJACIJE PD-MMĆ INDUKOVANOJ IL-17 .....	78
4.6. UTICAJ IL-17 NA EKSPRESIJU MMP i uPA U PD-MMĆ.....	82
4.7. UČEŠĆE p38 I ERK1,2 MAPK U IL-17 INDUKOVANOJ EKSPRESIJI MMP i uPA U PD-MMĆ .....	87
4.8. UTICAJ IL-17 NA IMUNOMODULATORNA SVOJSTVA PD-MMĆ ...	91
5. DISKUSIJA.....	96
6. ZAKLJUČCI .....	110
7. LITERATURA.....	112

# 1. UVOD





## 1.1. MATIČNE ĆELIJE

Zahvaljujući svojoj sposobnosti proliferacije, diferencijacije i samoobnove, matične ćelije su uključene u osnovne biološke procese koji se odvijaju tokom čitavog života, uključujući rast, održavanje tkivne homeostaze i regeneraciju tkiva. One predstavljaju izvorne ćelije organizma sisara i postoje na svakom stepenu razvića od oplodene jajne ćelije do odraslog organizma.

Pojam matične ćelije (MĆ) uveo je u naučnu literaturu pobornik Darwinove teorije evolucije Ernst Haeckl 1868. godine (*Haeckl, 1868*) opisujući MĆ kao oplodenu jajnu ćeliju ili jednoćelijski organizam koji je zajednički predak svih višećelijskih organizama. Daljim istraživanjima MĆ svoj doprinos je dao Weissman (*Weissman, 1885*) podelivši ćelije na polne (od kojih dalje nastaju ostale ćelije organizma) i telesne, somatske. Inspirisani teorijom Weissman-a, Theodor Boveri i Valentin Hacker nastavili su istraživanja pokazavši da polne ćelije sadrže hromatin koji se u potpunosti prenosi na sledeću generaciju ćelija, kao i da se kod oplodjenih jajnih ćelija javljaju asimetrične deobe (*Boveri, 1892, Hacker, 1892*). Nakon ovih istraživanja, sve do početka šezdesetih godina 20. veka, MĆ nisu definisane kao posebne ćelije zbog nedostataka u eksperimentalnim protokolima za njihovu izolaciju i karakterizaciju, uslovljenih malom brojčanom zastupljenošću ovih ćelija u tkivima, kao i činjenicom da se morfološki ne mogu razlikovati od ostalih tkivno-specifičnih ćelija. Tek zahvaljujući razvoju brojnih *in vivo* i *in vitro* metoda kojima se dokazuju funkcije MĆ uključujući njihovu sposobnost samoobnove, proliferacije i diferencijacije, dobijena su saznanja o karakteristikama i biologiji ovih ćelija.

Danas se MĆ definišu kao nespecializovane ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja sopstvene populacije i mogućnost diferenciranja u veći broj specializovanih ćelija. Ove dve karakteristike razlikuju ih od drugih ćelija. Pored toga, u novije vreme, neki autori imaju stanovište da MĆ ne predstavljaju poseban tip ćelija, već zapravo stanje u koje može da dođe bilo koja ćelija, smatrajući da je plastičnost osnovna osobina matične ćelije (*Zipori, 2005*).

Na osnovu razvojnog stadijuma organizma iz kojeg su izolovane, MĆ se mogu klasifikovati na embrionalne, fetalne, neonatalne i adultne MĆ (*Katsumoto i sar., 2010*;



Hass i sar., 2011). Pored toga, na osnovu diferencijacionog potencijala u jednu ili više ćelijskih loza, MĆ se mogu podeliti na: totipotentne MĆ koje se mogu diferencirati u sve embrionske i ekstraembrionske tipove ćelija, odnosno u sva tkiva živog organizma (ovaj potencijal imaju blastomere koje nastaju u prvim deobama zigota); pluripotentne embrionalne MĆ (ćelije unutrašnje mase blastocista), potomci totipotentnih MĆ koji se mogu diferencirati u ćelije sva tri klicina lista (ektoderm, mezoderm i endoderm), ali ne i u ćelije placente; multipotentne MĆ- fetalne i adultne tkivno-specifične MĆ koje mogu da daju različite tipove ćelija, ali samo u okviru jednog klicinog lista (na primer matične ćelije hematopoeze, mezenhinskog tkiva, nervnog tkiva); i unipotentne MĆ koje zadržavaju sposobnost samoobnove, ali se mogu diferencirati u samo jedan tip ćelija (na primer mišićne MĆ ili MĆ kože).

Od MĆ u ranim fazama embrionalnog razvoja nastaje veliki broj zrelih, specijalizovanih ćelija koje grade tkiva i organe. Tokom razvoja i rasta organizma, MĆ deobama stvaraju rezervu novih MĆ koje omogućavaju stalnu regeneraciju oštećenih tkiva. U ranom periodu embrionalnog razvoja dolazi do simetričnih deoba ćelija kada MĆ daje dve identične kćerke ćelije, dok se kasnije u toku razvoja, kao i održavanja homeostaze odraslog organizma, MĆ dele asimetrično, gde tokom deobe nastaje jedna identična kćerka ćelija i druga usmerena ka diferencijaciji (Morrison i Kimble, 2006). Potrebe organizma utiču na opredeljivanje MĆ za diferencijaciju u određenom pravcu i stvaranje specijalizovanih zrelih ćelija *in vivo*, dok se odgovarajućom stimulacijom MĆ mogu indukovati na diferencijaciju i u eksperimentalnim uslovima. Na ovaj način omogućena su istraživanja u cilju primene MĆ u regeneraciji tkiva, kao i ćelijskoj i genskoj terapiji.

Najnovije veliko otkriće vezano za MĆ je otkriće nove vrste laboratorijski izvedenih MĆ, indukovanih pluripotentnih MĆ (od engl. *induced pluripotent stem cells*, iPS), dobijenih genetičkim “reprogramiranjem” funkcionalno zrelih ćelija (fibrociti miša) putem aktivacije samo 4 gena: Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4, kojom su zrele ćelije stekle osobine embrionalnih MĆ (Takahashi i Yamanaka, 2006). Ovi nalazi su ukazali da diferencijacija i sazrevanje nisu nepovratni procesi i postavili nove osnove za istraživanja u biologiji i terapijskoj primeni MĆ.

Pluripotentni potencijal embrionalnih MĆ ukazuje da one imaju najviše mogućnosti za potencijalnu primenu, ali etički razlozi i zakonski propisi, kao i komplikovane



procedure održavanja ovih ćelija u kulturi i teško kontrolisanje njihove diferencijacije te mogućnost stvaranja teratoma *in vivo*, uputili su istraživače na pronalaženje alternativnih izvora MĆ i prebacili fokus interesovanja na adultne MĆ.

Adultne multipotentne MĆ imaju sposobnost samoobnove i diferenciranja u ograničen broj ćelijskih tipova u okviru određenog organa ili tkiva gde učestvuju u održavanju tkivne homeostaze. S obzirom na ove funkcije adultnih MĆ jasno je da su prisutne u svim tkivima u kojima učestvuju u regulaciji strukturnih i funkcionalnih osobina tkiva u fiziološkim i patološkim stanjima. Multipotentnost adultnih MĆ, jednostavnost njihove izolacije i *ex vivo* ekspanzije čine ove ćelije najpristupačnijim izvorom MĆ sa širokim potencijalom terapijske primene. Najviše izučavane adultne matične ćelije su izolovane iz kostne srži. Ovo tkivo mezodermalnog porekla obezbeđuje funkcionalno jedinstvo kompleksnog hematopoetskog sistema ćelija sa sistemom stromalnih ćelija i ćelijskih produkata (molekuli ekstraćelijskog matriksa (od engl. *Extracellular matrix*, ECM), regulatorni faktori) i sadrži dva tipa multipotentnih MĆ: hematopoetske i mezenhimske MĆ.

### 1.1.1. Hematopoetske matične ćelije

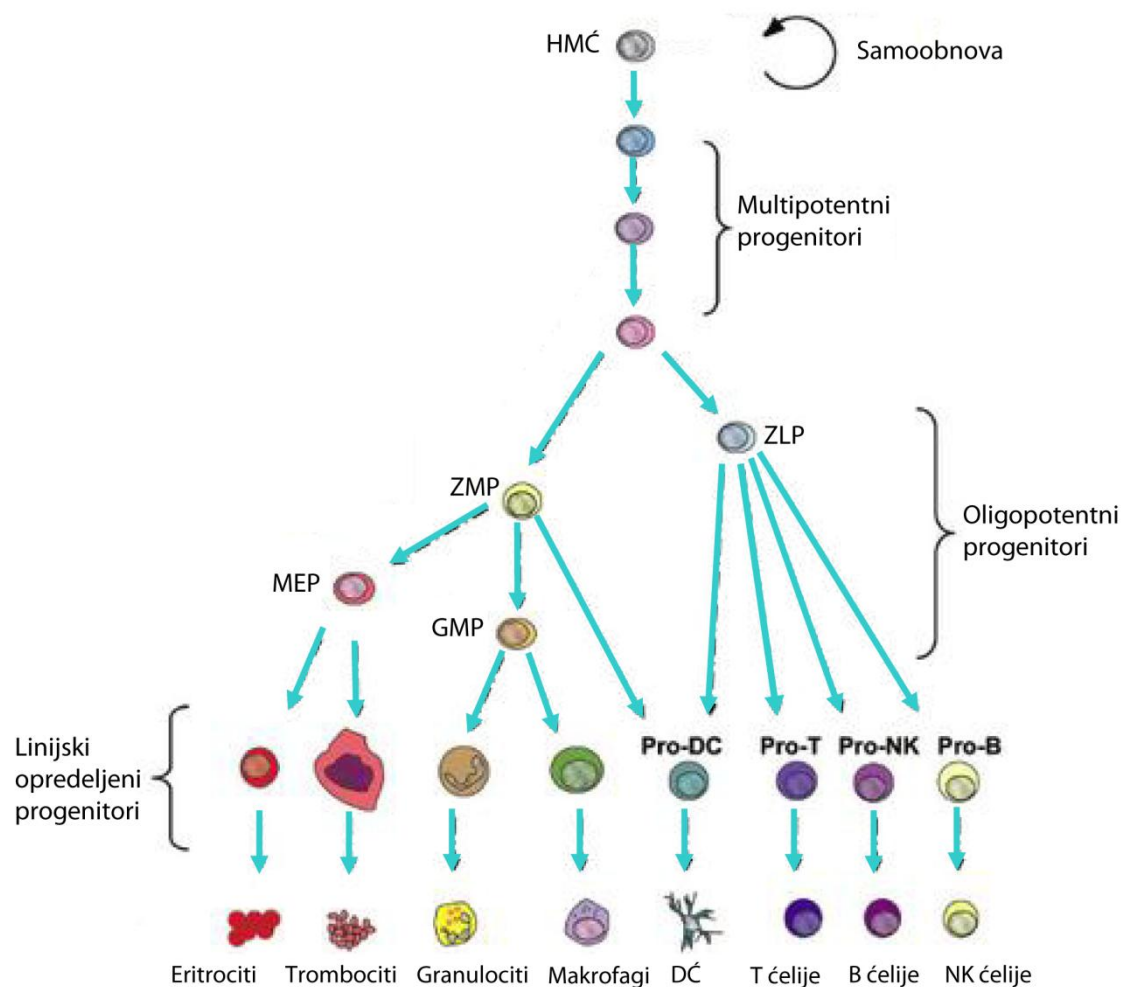
Adultne MĆ su prvobitno otkrivene u kontekstu hematopoeze, koja predstavlja proces stvaranja zrelih ćelija krvi, uključujući i ćelije imunskog sistema. Pionirska istraživanja u ovoj oblasti pokazala su da se brže oporavljaju i preživljavaju ozračeni miševi kojima su transplantirane ćelije kostne srži. U ovim eksperimentima Till i McCulloch (*Till i McCulloch 1961; Till i sar., 1964*) su pokazali da transplantirane ćelije u slezini letalno ozračenih miševa stvaraju kolonije zrelih hematopoetskih ćelija vidljive golim okom čije prisustvo je bilo dokaz da u kostnoj srži postoje ćelije sa sposobnošću diferencijacije u zrele ćelije krvi, hematopoetske matične ćelije (HMĆ). Naknadna istraživanja su potvrdila da ove ćelije imaju sposobnost samoobnove (*Becker i sar., 1963; Siminovitch i sar., 1963*).

Danas je poznato da se stvaranje zrelih ćelija krvi kod odraslog organizma odvija u kostnoj srži zahvaljujući prisustvu HMĆ. Ove ćelije su zastupljene u veoma malom broju, te se na  $10^4$ - $10^5$  ukupnih ćelija kostne srži može detektovati jedna HMĆ. Tokom složenog, hijerarhijski organizovanog procesa hematopoeze kontinuiranom



proliferacijom, diferencijacijom i sazrevanjem od malobrojne populacije primitivnih multipotentnih HMC nastaju hematopoetski progenitori, opredeljeni za više, dve ili samo jednu krvnu lozu, čijom daljom diferencijacijom nastaju morfološki prepoznatljivi prekursori koji na kraju sazrevaju u zrele ćelije krvi (*Petakov i sar., 1998; Petakov i sar., 2004*). Opređeljivanjem i diferencijacijom, HMC sukcesivno gube sposobnost samoobnavljanja i smanjuje im se potencijal za višelinijsku diferencijaciju, dok im se istovremeno povećava proliferativni kapacitet. Na ovaj način od malog broja HMC nastaje veliki broj zrelih ćelija krvi (*Bryder i sar., 2006; Morrison i Spradling., 2008*). Postepenom diferencijacijom i opredeljivanjem HMC u pravcu limfopoeze nastaju oligopotentni zajednički limfoidni progenitori (ZLP) od kojih nastaju ćelije imunskog sistema, dendritske ćelije (DC), B, T i prirodno ubilačke ćelije (NK, od engl. *Natural killer cells*), dok usmeravanjem u pravcu mijelopoeze nastaju zajednički mijeloidni progenitori (ZMP) koji svojom diferencijacijom daju eritrocite, trombocite, granulocite, makrofage, kao i DC (**Slika 1**) (*Bryder i sar., 2006*). Ovi procesi su kontrolisani brojnim faktorima rasta i citokinima prisutnim u mikrosredini kostne srži pri čemu je diferencijacija progenitorskih ćelija zavisna i od prisustva receptora za te citokine na samim ćelijama.

Kompleksnu mikrosredinu kostne srži u kojoj se nalaze HMC karakteriše arhitektura određena specifičnim tipovima ćelija (ćelije strome) i komponentama ECM. U ćelije strome, pored makrofaga hematopoetskog porekla, spadaju i stromalne ćelije mezenhimskog porekla uključujući fibroblaste, adipocite, osteoblaste, retikularne i endotelske ćelije koje vode poreklo od multipotentnih mezenhimskih MC (*Baksh i sar., 2004; Sheng i sar., 2015*). Stromalne ćelije luče citokine, kao i komponente ECM, koji zajedno čine kompleksan molekularni milje u kome se ostvaruju brojne interakcije hematopoetskih i stromalnih ćelija bitne za usmeravanje i regulaciju hematopoeze.



**Slika 1. Shematski prikaz organizacije procesa hematopoeze.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Bryder i sar., 2006.*

*ZMP-zajednički mijeloidni progenitori; ZLP-zajednički limfoidni progenitori; MEP-megakariocitni-eritrocitni progenitori; GMP-granulocitno-monocitni progenitori; pro-DC-progenitori dendritskih ćelija; pro-T-progenitori T ćelija; pro-NK- progenitori NK ćelija; pro-B- progenitori B ćelija; DC-dendritske ćelije; NK-od engl. Natural Killer cell.*



## 1.1.2. Mezenhimske matične ćelije

### 1.1.2.1. Pojam, poreklo i karakterizacija MMĆ

Mezenhimske matične ćelije (MMĆ) predstavljaju heterogenu populaciju (Phinney, 2012) multipotentnih adultnih matičnih ćelija izolovanih iz različitih tkiva organizma (kostne srži, masnog tkiva, zubne pulpe, periferne krvi i dr.) u kojima imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze.

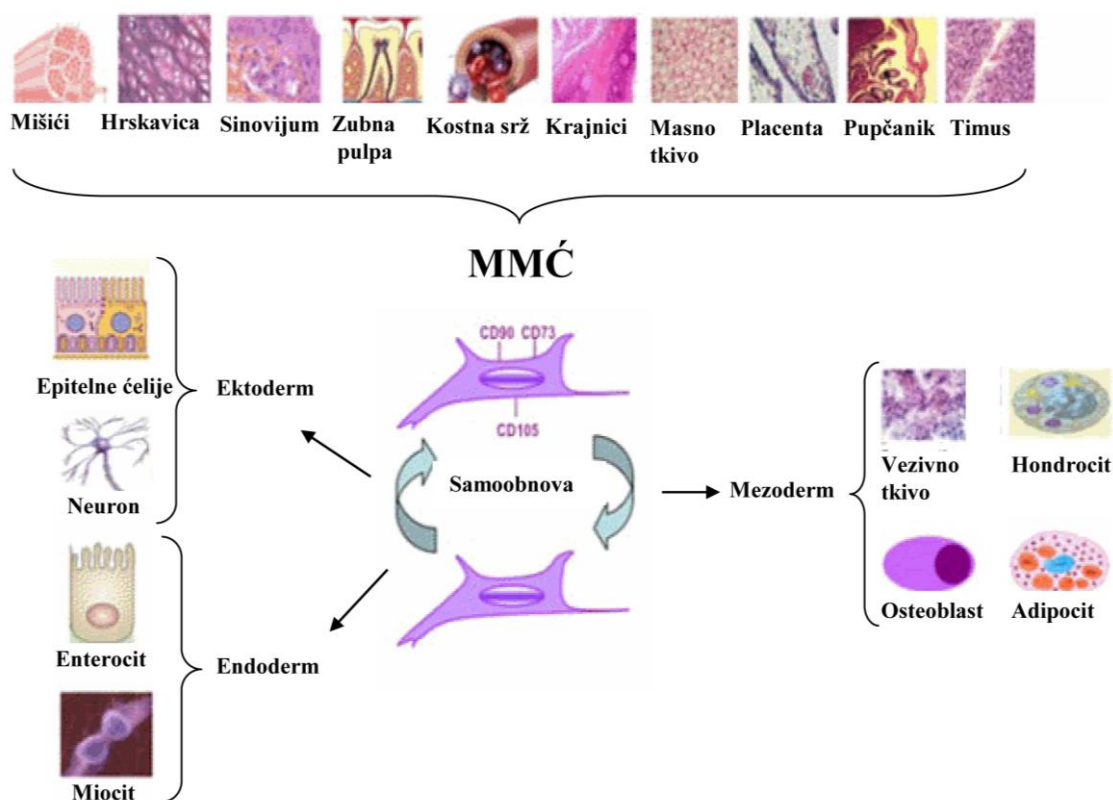
Postojanje multipotentnih prethodnika nehematopoetskih stromalnih ćelija kostne srži prvi je dokazao Friedenstein sa saradnicima tokom šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka (Friedenstein i sar., 1968; Friedenstein i sar., 1974; Friedenstein i sar., 1976) na osnovu kultivisanja pojedinačnih ćelija koje formiraju fibroblastne kolonije (od engl. *Colony Forming Unit-Fibroblastic*, CFU-F). U ovim istraživanjima utvrđena je adherentna, klonogena, nefagocitna i fibroblastna priroda stromalnih ćelija izolovanih iz kostne srži, kao i njihova sposobnost da se diferenciraju u ćelije koštanog tkiva. Dalja istraživanja su pokazala da se ove stromalne ćelije, transplantirane *in vivo*, mogu diferencirati u ćelije različitih vezivnih tkiva (osteoblaste, hondroblaste i adipocite), te su ih Owen i Friedenstein nazvali „osteogene matične ćelije“ ili „stromalne matične ćelije kostne srži“ (Owen i Friedenstein, 1988). Termin „mezenhimske matične ćelije“ je prvi upotrebio Caplan 1991. godine opisujući populaciju ćelija u adultnoj kostnoj srži koja se može izolovati, umnožiti u kulturi i stimulirati ka diferencijaciji u ćelije tkiva mezodermalnog porekla (Caplan, 1991). Međutim, prema današnjim saznanjima, MMĆ ne nastanjuju samo tkiva mezenhinskog porekla, a njihov potencijal za diferencijaciju prevazilazi tkiva mezodermalnog porekla, jer se, između ostalih, mogu diferencirati i u neurone, ektodermalnog porekla, kao i u ćelije pankreasa, endodermalnog porekla (Slika 2). Stoga, pojam „mezenhimske“, iako uveliko prihvaćen, ne odražava pravu prirodu MMĆ, pa se u literaturi mogu često pronaći i drugi nazivi - mezenhimske stromalne ćelije, multipotentne stromalne ćelije ili multipotentne mezenhimske matične ćelije (Prockop, 1997; Prockop, 2009; Bianco i sar., 2008). Iako ovi izrazi nisu pravi sinonimi u smislu definicije ili bioloških karakteristika ovih ćelija, svi oni označavaju istu kategoriju ćelija, koje se mogu izolovati i umnožiti *ex vivo* u određenim uslovima, pri čemu zadržavaju sposobnost diferencijacije u ćelije različitih vezivnih tkiva što





ukazuje na činjenicu da poseduju širok opseg potencijalne terapijske primene, posebno u regenerativnoj medicini (Ucelli i sar., 2008).

Postoje dokazi da su MMĆ do sada uspešno izolovane iz svakog tkiva iz koga je pokušana izolacija (Da Silva Meirelles i sar., 2006). Tako su ove ćelije izolovane iz različitih vezivnih tkiva, poput kostne srži, tkiva pupčanika, placente, adipoznog tkiva, zubne pulpe, potpornog tkiva zuba, periferne krvi, krvi pupčanika.



**Slika 2. Izvori i diferencijacioni potencijal mezenhimskih matičnih ćelija.**

Preuzeto i izmenjeno prema internet stranici <http://www.cancerlink.ru/enmesenchymalstem.html>

Kostna srž predstavlja najistraženiji izvor MMĆ iz kojeg su prvobitno i izolovane ove ćelije. Iako je transplantacija hematopoetskih i stromalnih MĆ kostne srži danas najčešće primenjivan vid ćelijske terapije u lečenju hematoloških oboljenja, zbog invazivnosti procedure izolacije, kao i malog prinosa MMĆ iz kostne srži i njihovog niskog proliferativnog kapaciteta, novija istraživanja su usmerena na alternativne izvore MMĆ.



Masno tkivo je pogodan izvor MMĆ za potrebe istraživanja, s obzirom da se iz male količine tkiva (dobijenog nakon liposukcije ili maksilofacijalnih intervencija) može dobiti dovoljan broj ćelija.

Vartonova sluz predstavlja želatinozno vezivno tkivo koje se nalazi između amniotskog epitela i krvnih sudova pupčanika. Ovo tkivo predstavlja izvor primitivnijih MMĆ koje pored mezenhimskih eksprimiraju i markere embrionalnih matičnih ćelija, poput Oct-1, Oct-4 i Nanog (*La Rocca i sar., 2009; Taghizadeh i sar., 2011*). Zbog njihove lake dostupnosti, dobrog prinosa, visoke sposobnosti ekspanzije, velikog diferencijacionog potencijala i genetske stabilnosti, ove MMĆ predstavljaju dobre kandidate za istraživanja u cilju primene u ćelijskoj terapiji i regenerativnoj medicini.

MMĆ je teško izolovati iz krvi pupčanika, imajući u vidu da su zastupljene u veoma malom broju u ovom tkivu za razliku od hematopoetskih MĆ. Međutim, nakon uspešne izolacije, pokazano je da ove MMĆ pokazuju veći stepen primitivnosti od ćelija izolovanih iz adultnih tkiva (*Kern i sar., 2006*).

Periferna krv predstavlja lako dostupan izvor MMĆ iz kojeg je, međutim, teško izolovati ove ćelije s obzirom da su malobrojne. Smatra se da ove MMĆ zapravo potiču iz kostne srži koje putem krvi migriraju na mesto regeneracije tkiva (*Valenti i sar., 2008*). Zbog teške izolacije, ove MMĆ nemaju veliki potencijal terapijske primene, ali se njihovo izučavanje smatra značajnim za ispitivanje mogućnosti mobilizacije MMĆ i naseljavanja mesta oštećenja.

MMĆ su uspešno izolovane i iz dentalnih tkiva - pulpe mlečnih zuba i periodoncijuma zuba odraslih osoba (*Gronthos i sar., 2000; Hung i sar., 2012*), tkiva koja se neprestano obnavljaju i u kojima je prisustvo matičnih ćelija neophodno. Zbog jednostavne - rutinske procedure izolacije, velikog potencijala za diferencijaciju, kao i visoke sposobnosti ekspanzije, MMĆ poreklom iz dentalnih tkiva predstavljaju značajan izvor MMĆ. Pored toga, MMĆ periodoncijuma karakteriše i sposobnost formiranja cementa, kao i tkiva sličnih periodoncijumu *in vivo*, što ih čini ćelijama jedinstvenih osobina (*Maeda i sar., 2011*).

Imajući u vidu mogućnosti izolovanja MMĆ iz velikog broja različitih tkiva, kao i njihov veliki potencijal za primenu u ćelijskoj terapiji, interesovanje za istraživanja specifičnih bioloških funkcija ovih ćelija iz dana u dan raste. Međutim, nedostatak jedinstvenog protokola za karakterizaciju MMĆ, kao i postojanje različitih protokola za



izolaciju i kultivaciju MMC iz različitih tkiva u mnogome otežavaju poređenje i tumačenje rezultata. Iako MMC poreklom iz različitih tkiva pokazuju velike sličnosti, među njima postoje značajne razlike u potencijalu proliferacije i funkcionalnim osobinama pod identičnim uslovima kultivisanja (*Kern i sar., 2006; Trivanović i sar., 2015*). Pored toga, treba imati u vidu i da MMC izolovane iz istog tkiva predstavljaju heterogenu populaciju ćelija u kojoj se nalaze ćelije različitog stepena zrelosti i potencijala za diferencijaciju.

Na osnovu tada dostupnih podataka u pokušaju da se uvedu jedinstvena pravila, Komitet za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju je 2006. godine predložio tri minimalna kriterijuma za definisanje i karakterizaciju MMC (*Dominici i sar., 2006*):

1. Adherentnost za plastiku u standardnim uslovima *in vitro* kultivacije ćelija;
2. Ekspresija specifičnih površinskih antigena: pozitivna ekspresija CD105 (endoglin), CD73 i CD90 ( $\geq 95\%$  populacije ćelija) uz minimalnu ekspresiju hematopoetskih markera: CD34- marker primitivnih hematopoetskih ćelija, CD45- panleukocitni marker, CD14 ili CD11b- markeri monocita i makrofaga, CD79 $\alpha$  ili CD19-markeri B limfocita i HLA-DR ( $\leq 2\%$  populacije ćelija);
3. Diferencijacija ćelija u najmanje tri ćelijske loze mezodermalnog porekla: osteogenu, hondrogenu i adipogenu u standardnim uslovima za *in vitro* diferencijaciju ćelijskih kultura.

Da bi ćelije bile okarakterisane kao MMC nijedan od gore navedenih kriterijuma ne može biti zastupljen samostalno, već je potrebno dokazati da ćelije ekspimiraju antigene MMC, kao i da poseduju sposobnost diferencijacije u bar tri ćelijske loze. Imajući u vidu heterogenu prirodu populacije izolovanih MMC Komitet je doneo preporuku da se iz naziva ovih ćelija izostavi termin „matične“, ne dovodeći pri tom u pitanje postojanje istinski matičnih ćelija u ovoj heterogenoj populaciji izolovanih adherentnih ćelija, predloživši upotrebu naziva „multipotentne mezenhimske stromalne ćelije“ koji jasno oslikava osobine ovih ćelija. Pri tome je dogovoreno da skraćenica MMC treba da ostane u upotrebi, s obzirom da je široko prihvaćena i dugo prisutna u naučnoj literaturi.



### 1.1.2.2. Uloga MMC u homeostazi i reparaciji oštećenih tkiva

S obzirom da su izvori izolacije MMC lako dostupni i da ove ćelije poseduju multipotentni potencijal diferencijacije u ćelije mezodermalnog, ali i ektodermalnog i endodermalnog porekla, MMC predstavljaju dobre kandidate za potencijalnu terapijsku primenu u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjeringu. Obnavljanje oštećenog tkiva predstavlja kompleksan proces koji uključuje akutnu inflamaciju, migraciju, proliferaciju, i diferencijaciju imunskih i matičnih ćelija, angiogenezu, kao i remodelovanje ekstraćelijskog matriksa (od engl. *extracellular matrix*, ECM) (Maxon i sar., 2012; DiMarino i sar., 2013). MMC imaju sposobnost da pod dejstvom faktora sekretovanih od strane obolelog tkiva putem krvi migriraju upravo do oštećenja gde ostvaruju terapijski efekat, a istovremeno isti faktori obezbeđuju i posebnu mikrosredinu za samoobnavljanje i održanje multipotentnog potencijala diferencijacije MMC (Chapel i sar., 2003). Nakon naseljavanja obolelog tkiva MMC počinju da luče brojne trofičke molekule kao što su glikoproteini ECM, citokini i faktori rasta (Ankrum i Karp, 2010). Angiogeneza, kao važan deo procesa regeneracije, stimulisan je sekretovanim faktorima MMC uključujući vaskularni endotelni faktor rasta (od engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), IGF-1 (od engl. *insulin like growth factor-1*), MCP-1 (od engl. *monocyte chemoattractant protein 1*), bFGF (od engl. *basic fibroblast growth factor*) i IL (Interleukin)-6 (Boomsma i Geenen, 2012). Trofički efekat MMC ispoljavaju i pomoću direktnog kontakta sa ćelijama tkiva u koje su se naselile, pri čemu tačni mehanizmi pomoću kojih se ovaj efekat ostvaruje nisu potpuno razjašnjeni (Plotnikov i sar., 2008). Dosadašnja saznanja ukazuju da se mobilisane MMC pod dejstvom lokalnih faktora mogu diferencirati u najmanje tri pravca:

- 1) tkivno specifične ćelije, potrebne za regeneraciju oštećenog tkiva, kao kod infarkta miokarda, gde se MMC mogu diferencirati u kardiomiocite, glatko-mišićne ćelije i endotelske ćelije (Gojo i sar., 2003; Psaltis i sar., 2008);
- 2) funkcionalne ćelije koje imaju ulogu stvaranja specijalne mikrosredine neophodne za obnovu tkiva (Petrie Aronin i Tuan, 2010);
- 3) regulatorne ćelije koje učestvuju u obnovi i regeneraciji tkiva sekrecijom citokina sa trofičkom i imunomodulatornom funkcijom (Ankrum i Karp, 2010).

U procesima diferencijacije MMC presudnu ulogu imaju regulatorni molekuli koji takođe inhibiraju fibrozu i apoptozu ćelija oštećenog tkiva. Međutim, faktori



mikrosredine i molekularni mehanizmi koji kontrolišu diferencijaciju MMĆ još uvek nisu razjašnjeni, kao ni specifični markeri pomoću kojih bi se mogla predvideti određena diferencijacija. Bez obzira na nerazjašnjenu prirodu interakcija MMĆ i oštećenog tkiva, njihov rezultat je smanjenje inflamacije, apoptoze i fibroze oštećenih tkiva, kao i stimulisanje tkivne regeneracije.

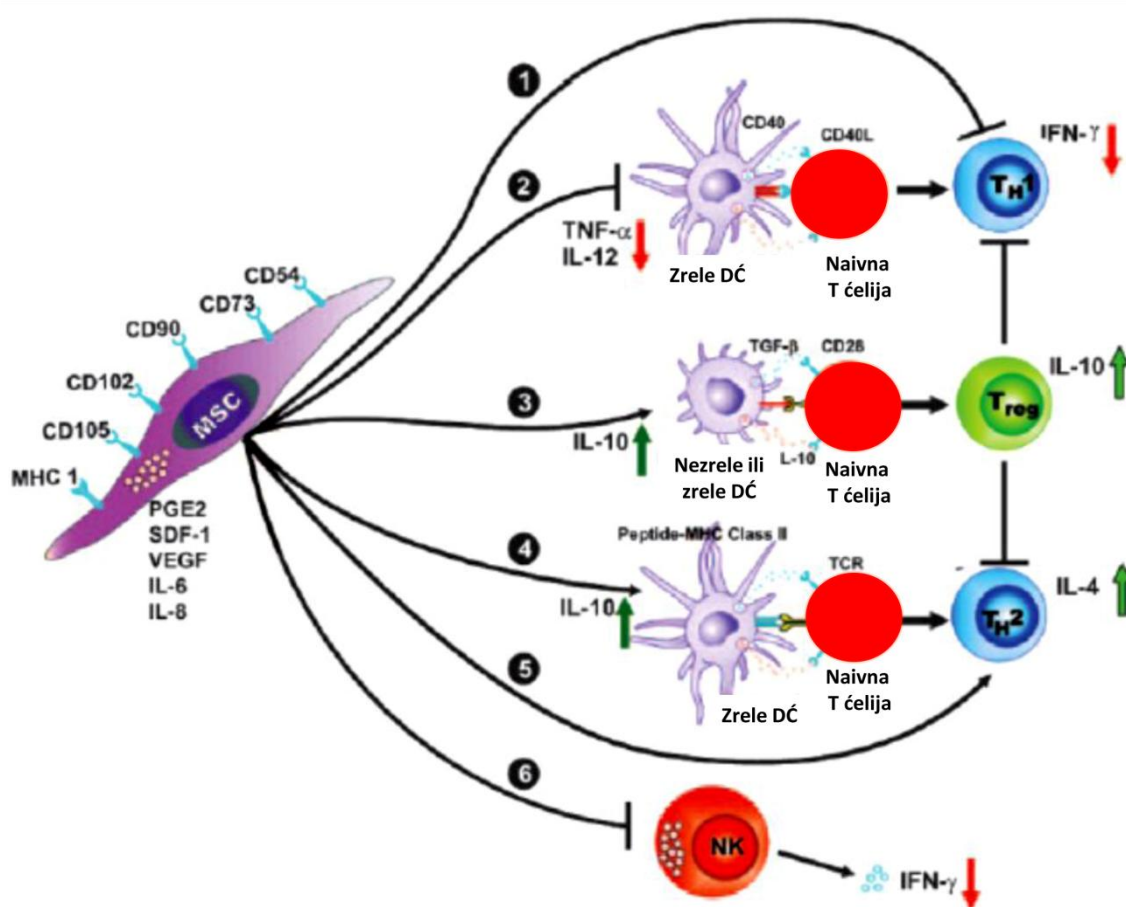
### 1.1.2.3. Imunomodulatorna svojstva MMĆ

Pored regenerativne uloge, MMĆ ispoljavaju antiinflamatorne i imunomodulatorne osobine neposrednim delovanjem na ćelije urođenog i adaptivnog imunskog sistema putem direktnih međućelijskih kontakata i/ili sekrecijom solubilnih medijatora (**Slika 3**). Međutim, tačni mehanizmi imunomodulatornog delovanja MMĆ nisu razjašnjeni. U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da MMĆ suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T (CD4<sup>+</sup> pomoćničkih (od engl. *T helper cells*, Th) i CD8<sup>+</sup> citotoksičnih T limfocita) i B limfocita (*Jones i sar., 2007*), DĆ i NK ćelija (*Klopp i sar., 2011*), istovremeno povećavajući produkciju regulatornih T-limfocita (Treg) (*Bergfeld i DeClerck, 2010*). Pored toga, utvrđeno je da MMĆ dovode i do modulacije mikrosredine u oštećenom tkivu štiteći ga oslobađanjem antiinflamatornih i antiapoptotičkih molekula (*Le Blanc i Rindgen, 2007*), te se može reći da MMĆ vršeći inhibiciju imunskog odgovora ispoljavaju i svoju regenerativnu ulogu.

U kontekstu imunomodulatornog potencijala MMĆ, njihovu važnu karakteristiku predstavlja nizak stepen ekspresije molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa (od engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC klase I i II, što za posledicu ima izostanak aktivacije i proliferacije T limfocita pokazan u *in vitro* testovima (*Le Blanc i Rindgen, 2007; Bassi i sar., 2011; Ma i sar., 2013*). Novija istraživanja su međutim pokazala da MMĆ mogu da eksprimiraju ove molekule kada su izložene dejstvu proinflamatornih citokina (*Ankrum i sar., 2014*). Pored toga, utvrđeno je da se inhibicija proliferacije B i T limfocita od strane MMĆ može (*Akiyama i sar., 2012*), ali i ne mora odvijati isključivo putem indukcije apoptoze ćelija, već da je to reverzibilan proces koji se ostvaruje putem zaustavljanja ćelijskog ciklusa limfocita u G1/G0 fazi čime se uspostavlja stanje funkcionalne neaktivnosti ovih ćelija, anergije (*Chen i sar., 2006; Glennie i sar., 2005*). Važnu ulogu u supresiji proliferacije kako T-limfocita, tako i B-



limfocita imaju solubilni faktori MMC koji uključuju humani leukocitni antigen G5 (HLA-G5), inducibilnu NO sintazu (iNOS), indolamin-2,3-dioksidenu (IDO-1), prostaglandin E2 (PGE-2), bFGF, TGF- $\beta$  (od engl. *Transforming GrowthFactor- $\beta$* ), IL-10, IL-1 $\beta$  i IL-6 (Haddad i Saldanha-Araujo, 2014; Yang i sar., 2009; Fan i sar., 2016). Delovanje ovih molekula, pre svega IDO-1, TGF- $\beta$  i PGE2, odražava se i na funkcije NK ćelija, indukujući inhibiciju njihove proliferacije, kao i promene u sekreciji citokina, uključujući inhibiciju produkcije INF- $\gamma$  (Figueroa i sar., 2012).



**Slika 3. Mehanizmi imunosupresivnog delovanja MMC.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Aggarwal i Pittenger, 2005.*

MMC interaguju sa ćelijama urođenog imunskog sistema (DC- putevi 2-4; NK ćelije - put 6), kao i sa adaptivnim imunskim sistemom (T ćelije - putevi 1 i 5). MMC inhibiraju sekreciju IFN- $\gamma$  od strane Th1 i NK ćelija, a povećavaju sekreciju IL-4 od strane Th2 ćelija, pomerajući balans od Th1 ka Th2.



S obzirom da MMĆ prvenstveno migriraju u oblasti zahvaćene inflamacijom zahvaljujući hemokinima, kao i faktorima koji regulišu ekspresiju hemokinskih receptora na MMĆ, a koje proizvodi tkivo zahvaćeno inflamacijom, u ispoljavanju imunomodulatornih funkcija MMĆ veoma značajan uticaj ima celokupna inflamatorna mikrosredina, zajedno sa ćelijskim komponentama i faktorima inflamacije. Danas je poznato da MMĆ u zavisnosti od faktora mikrosredine u kojoj se nalaze mogu imati imunostimulatorno ili imunosupresivno dejstvo (*Ma i sar., 2013*), te se sve češće govori da zavisno od faktora mikrosredine mogu imati proinflamatorni M1 i antiinflamatorni M2 fenotip (*Waterman i sar., 2012, Burr i sar., 2013*). Kada se nalaze u inflamatornoj sredini MMĆ se aktiviraju i usvajaju M2 imunosupresivni fenotip. Naime, imunosupresorski potencijal MMĆ nije konstitutivan, već zahteva aktivaciju MMĆ visokim koncentracijama proinflamatornih citokina, poput INF- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , od engl. *Tumor Necrosis Factor*), IL-1 $\alpha$  ili IL-1 $\beta$ , sekretovanih od strane ćelija imunskog sistema (*Krampera i sar., 2011*). Pokazano je da tretman proinflamatornim citokinima podstiče eksprimiranje adhezivnih molekula ICAM-1 i VCAM-1 (od engl. *intercellular adhesion molecules; vascular cell adhesion molecule 1*) na MMĆ putem kojih se ostvaruje povezivanje sa integrinima T limfocita LFA-1 (od engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*) i VLA-4 (od engl. *Very Late Antigen*). Takođe, nakon tretiranja MMĆ citokinom IFN- $\gamma$ , povećava se i sekrecija proinflamatornih hemokina, poput CXCL-10 i MCP-2, koji učestvuju u privlačenju i aktiviranju imunskih ćelija uključujući DC, T i NK ćelije i monocite (*Hoogdujin i sar., 2010*). MMĆ aktivirane proinflamatornim citokinima svoje dejstvo najvećim delom ispoljavaju putem povećane sekrecije solubilnih faktora uključujući IL-6, azot monooksid (od engl. *Nitric Oxide*, NO), PGE2 i različite faktore rasta (*Ghannam i sar., 2010*) koji suprimiraju proliferaciju T limfocita. Pored toga, pokazano je i da aktivacija različitih TLR (od engl. *Toll like receptors*) od strane infektivnih agenasa ili endogenih signala opasnosti može da utiče na stimulaciju ili inhibiciju imunosupresivnog potencijala MMĆ (*Romieu-Mourez i sar., 2009; DelaRosa i Lombardo, 2010*). Tako je utvrđeno da polarizacija MMĆ u antiinflamatorni fenotip M2 može biti indukovana i aktivacijom TLR3 na površini MMĆ. Pri tome, usled povećane produkcije TGF- $\beta$  od strane MMĆ fenotipa M2, favorizovano je stvaranje Treg ćelija. S druge strane, kada je nivo proinflamatornih citokina nizak, MMĆ mogu usvojiti inflamatorni fenotip M1 i



tako olakšati T ćelijski odgovor, sekrecijom hemokina koji se vezuju za receptore na T ćelijama i dovode efektorske limfocite na mesto inflamacije (*Bernardo i Fibbe, 2013*). Stimulacija TLR4 takođe polarizuje MMC u pravcu M1 fenotipa koje oslobađaju niže nivoe imunosupresivnih medijatora,IDO-1 i NO.

Poznato je da humane MMC inhibiraju Th1 odgovor i time produkciju inflamatornih citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , a da sa druge strane povećavaju sekreciju IL-3, IL-5, IL-10, IL-4,IL-13. Pretpostavlja se da MMC inhibiraju imunski odgovor preusmeravajući produkciju CD4<sup>+</sup> Th ćelija, sa proinflamatorne Th1 na Th2, odnosno sa Th17 na Treg ćelijsku subpopulaciju (*Ghannam i sar., 2010; Carrión i sar., 2011*). Osim toga, MMC modulišu funkcije DC čiji je krajni efekat podsticanje Th2 ćelijskog odgovora (**Slika 3**) (*Aggarwal i Pittenger, 2005*). Pored toga, i direktni međućelijski kontakti doprinose preusmeravanju tipa imunskog odgovora. U eksperimentima mešane limfocitne reakcije (MLR) pokazano je da MMC konstitutivno eksprimiraju IL-10, koji predstavlja važan molekul u regulaciji T-ćelijskog odgovora, s obzirom da promovise sazrevanje Treg. Pored IL-10, sličnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora ima i TGF- $\beta$ , čija je ekspresija od strane MMC takođe konstitutivna. U oba slučaja, utvrđeno je da je povećanje ekspresije ovih faktora izraženije pri direktnoj interakciji MMC i T-limfocita (*Engela i sar., 2012*). Istovremeno, ovi faktori deluju i na DC promovišući stanje tolerancije.

MMC mogu uticati na diferencijaciju, maturaciju, migraciju i antigensku prezentaciju DC održavajući ih u nezrelom stanju (*Nauta i sar., 2006; English i sar., 2008*). Sekrecijom solubilnih faktora, poput IL-6, M-CSF, PGE2, IL-10 i TGF- $\beta$ , MMC inhibiraju ekspresiju HLA-DR, CD80, CD86, CD1a, CD40, CD14 i CD83 antigena na površini DC čime se suprimira sazrevanje ovih ćelija. Menjajući set sekretovanih molekula DC (povećanjem produkcije IL-10 i smanjenjem produkcije IL-12, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$ ), kao i uticajem na njihovu diferencijaciju, MMC modifikuju i usmeravaju ukupan imunski odgovor (*Aggarwal i Pittenger, 2005*).

Sa druge strane, imunosupresivna priroda Treg čini ove ćelije pogodnim kandidatima za indukciju tolerancije pri transplantaciji, a naročito u kontekstu interakcija sa MMC, imajući u vidu da su biološki aktivni molekuli koji su odgovorni za tolerogenu i supresorsku funkciju Treg ujedno i učesnici u imunomodulaciji posredovanoj MMC (IL-10, PGE2, NO, IDO-1, TGF- $\beta$ , hem oksigenaza HO-1). Da je prisustvo MMC





važno za održanje tolerancije dokazuje i podatak da Treg gube svoj supresorski kapacitet u odsustvu MMĆ što je pokazano na modelu transplantacije srca kod pacova i miševa (Eggenhofer i sar., 2011; Engela i sar., 2012). Takođe, pokazano je da je nastanak Treg zavisan od solubilnih faktora MMĆ, pri čemu presudnu ulogu ima TGF- $\beta$ 1, konstitutivno sekretovan od strane MMĆ. U istoj studiji u kojoj su ispitivana dejstva MMĆ kostne srži, utvrđeno je da MMĆ promovišu preživljavanje monocita indukujući diferencijaciju ka makrofagima M2 fenotipa koji eksprimiraju CD206 i CD163, a sekretuju velike količine IL-10 i CCL-18 (Melief i sar., 2013). Međutim, solubilni faktori MMĆ koji posreduju u ovim procesima još uvek nisu poznati.

Zbog prethodno pomenutih osobina MMĆ, aktuelna su istraživanja potencijalne primene MMĆ u cilju poboljšanja prihvatanja transplantiranih hematopoetskih ćelija, kao i ubrzanja rekonstitucije hematopoetskog sistema, s obzirom na njihovu funkciju u podržavanju hematopoeze gde je uloga MMĆ za sada najbolje proučena. Sa druge strane, ove ćelije predstavljaju i važan izvor za potencijalnu prevenciju odbacivanja transplantata, kao i drugih disfunkcionalnosti imunskog sistema gde je imunomodulacija osnova lečenja. Mogućnost korišćenja transplantacije MMĆ ispitivana je do sada u terapiji oboljenja kalem protiv domaćina (od engl. *Graft-Versus-Host-Disease*, GvHD), kao i nekoliko autoimunskih bolesti, uključujući diabetes tipa 1 (Florina i sar., 2009), reumatoidni artritis (Bouffi i sar., 2009), sistemski lupus eritematosus (Zhang i sar., 2010) i multiplu sklerozu (Martino i sar., 2010). Ipak, uspostavljanje bezbednih ćelijskih terapija zahteva podjednako pažljivo razmatranje i poznavanje svih komponenti međućelijskih interakcija, naročito u *in vivo* uslovima.

#### **1.1.2.4. MMĆ periodoncijuma**

Periodoncijum je jedan od novije otkrivenih i izučavanih izvora MMĆ koji je posebno interesantan zbog lake dostupnosti i rutinskih procedura kojima se ćelije mogu dobiti (Maeda i sar., 2011; Iwata i sar., 2010). Glavna uloga ovog vezivnog tkivaje da učvrsti koren zuba u alveolarnu kost. Periodoncijum čine različita kolagena vlakna, heterogena populacija ćelija, nervna vlakna, krvni sudovi i različite nekolagene komponente ECM. Od ćelija u tkivu periodoncijuma najzastupljeniji su fibroblasti, a pored njih prisutne su i nediferencirane MMĆ periodoncijuma (PD-MMĆ), kao i epitelne ćelije (Maeda i sar.,



2011). PD-MMĆ predstavljaju heterogenu populaciju ćelija koje morfoloijom podsećaju na fibroblaste i koje ispoljavaju sve karakteristike adultnih MMĆ, poput sposobnosti samoobnove i diferencijacije u osteoblaste, hondroците, adipocite, neurone i hepatocite (Seo i sar., 2004; Kawanabe i sar., 2010). Pored toga, PD-MMĆ ispoljavaju jedinstvenu karakteristiku da mogu da formiraju tkivo slično periodoncijumu, kao i mineralizovano vezivno tkivo koje prekriva dentin u predelu anatomskog korena zuba – cement. Naime, pokazano je da su ove ćelije kultivisane na nosaču izgrađenom od hidroksiapatita sposobne da nakon transplantacije imunokompromitovanim miševima formiraju *in vivo* vezivno tkivo sastavljeno od snopova vlakana sličnih tkivu periodoncijuma (Seo i sar., 2004).

Iako periodoncijum nastaje od ćelija nervne kreste koje migriraju tokom embrionalnog razvoja (Chai i sar., 2000), PD-MMĆ izolovane iz periodoncijuma odraslih osoba su po glavnim karakteristikama sličnije MMĆ nego ćelijama neuroektodermalnog porekla (Kaku i sar., 2012). Osim toga, PD-MMĆ se nalaze u perivaskularnom zidu periodoncijuma i morfološki, kao i po svom diferencijacionom potencijalu i sposobnosti da u *in vitro* uslovima formiraju kapilarima slične strukture, podsećaju na pericite (Iwasaki i sar., 2013). S obzirom da i sami periciti poseduju sposobnost diferencijacije u ćelije osteogene i hondrogene loze po čemu su slični MMĆ (Wong i sar., 2015), poreklo PD-MMĆ još uvek nije jasno definisano.

U ovom trenutku ne postoji marker karakterističan samo za PD-MMĆ (Zhu i sar., 2015) tako da je potrebno naglasiti da ove ćelije eksprimiraju površinske markere MMĆ - CD44H, CD105, CD90 (Liu i sar., 2014) i CD73 (Feng i sar., 2010), kao i embrionalne markere - Oct-4, SSEA-1 i SSEA-4 (Trubiani i sar., 2010), dok u isto vreme ne eksprimiraju markere hematopoetskih ćelija CD45, CD34, i CD14 ili CD11b, CD79a, CD19 i HLA klase II (Zhu i sar., 2013).

Imajući u vidu da PD-MMĆ ne proizvode samo komponente ECM vezivnog tkiva, već eksprimiraju i markere karakteristične za osteogenu diferencijaciju, uključujući Runx-2 (od engl. *Runt-related transcription factor 2*) takođe poznat i kao Cbfa1 (od engl. *Core binding factor 1*), osteokalcin (Ocn), BSP (od engl. *Bone Sialoprotein*) i osteopontin (Maeda i sar., 2011), može se reći da PD-MMĆ aktivno učestvuju u formiranju tkiva alveolarne kosti. Pokazano je da kolagenski nosači, koji se koriste u tkivnom inženjeringu, stimulišu PD-MMĆ da proliferišu i formiraju vretenaste strukture



i tkivo slično periodoncijumu *in vitro* (Luan i sar., 2009). Osim toga, PD-MMĆ sintetišu aktivator osteoklastogeneze RANKL (od engl. *Receptor Activator of NF-kappa B ligand*), kao i njegov inhibitor osteoprotegerin (OPG) (Wada i sar., 2001; Hasegawa i sar., 2002), utičući tako na metabolizam kostiju.

U sklopu izučavanja funkcionalnih osobina PD-MMĆ rađena su istraživanja u kojima su upoređivane ćelije poreklom iz mlečnih i stalnih zuba. U nekim od ovih istraživanja pokazano je da PD-MMĆ poreklom iz mlečnih zuba imaju veći indeks proliferacije, potencijal adipogene i osteogene diferencijacije nego PD-MMĆ izolovane iz periodoncijuma stalnih zuba (Silverio i sar., 2010; Ji i sar., 2013). Druga grupa autora međutim tvrdi suprotno, odnosno da nema značajnih razlika u proliferaciji, ekspresiji MMĆ markera, kao ni u potencijalu diferencijacije između ovih ćelija (Song i sar., 2012). Ovakva oprečna zapažanja zahtevaju potvrdu u budućim istraživanjima.

Inflamacija takođe utiče na regenerativnu sposobnost PD-MMĆ. Nedavno je pokazano da PD-MMĆ poreklom iz pacijenata sa parodontopatijom ekspimiraju Stro-1 i CD146, kao i da ispoljavaju potencijal osteogene diferencijacije kada se transplantiraju na mesta oštećenja alveolarne kosti miša (Hung i sar., 2012, Ronay i sar., 2014). Takođe, istraživanja na PD-MMĆ poreklom iz inflamacijom zahvaćenih tkiva su pokazala da ove ćelije imaju veći indeks proliferacije i migracije, ali i manju sposobnost osteogene diferencijacije nego ćelije zdravih donora (Liu i sar., 2011). Na primer, potvrđeno je da LPS poreklom od *Porphyromonas gingivalis* (jedan od najvećih uzročnika hronične parodontopatije) značajno inhibira osteogenu diferencijaciju i promovise ekspresiju proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8) u humanim PD-MMĆ (Kato i sar., 2014). Ipak, efekti patogenih mikroorganizama na PD-MMĆ do sada su velikim delom neistraženi.

Pored navedenih karakteristika, PD-MMĆ ispoljavaju imunomodulatorne osobine uporedive sa MMĆ izolovanim iz kostne srži (Wada i sar., 2009). Slično MMĆ izolovanim iz kostne srži, humane PD-MMĆ inhibiraju proliferaciju MNC periferne krvi stimulisanu mitogenom (Kim i sar., 2010, Wada i sar., 2009). Takođe je pokazano je da je ovaj proces posredovan solubilnim faktorima poput TGF- $\beta$ 1, HGF (od engl. *hepatocyte growth factor*) iIDO-1, za koje je poznato da ih indukuje IFN- $\gamma$  (Wada i sar., 2009). Zanimljivo je da i nakon indukcije osteogene diferencijacije PD-MMĆ, ove ćelije zadržavaju sposobnost da inhibiraju proliferaciju T ćelija (Tang i sar., 2014).



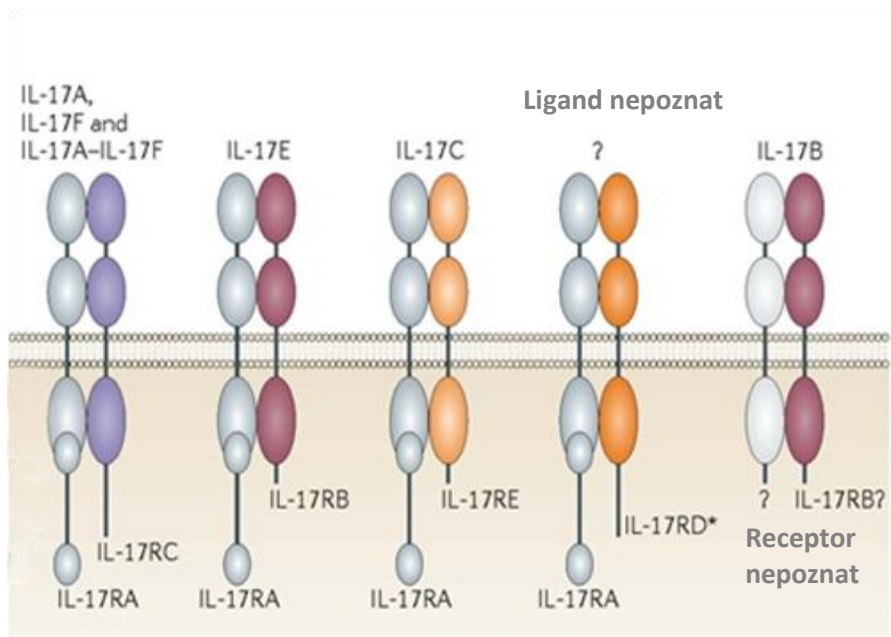
Niska imunogenost i imunosupresivni efekti PD-MMĆ na proliferaciju MNC navode na mogućnost primene alogenih PD-MMĆ u regeneraciji periodoncijuma. I zaista, pokazano je da alogene PD-MMĆ testirane na modelu ovce (*Mrozik i sar., 2013*) i svinje (*Ding i sar., 2010*), ispoljavaju iste terapijske efekte kao autologne PD-MMĆ. Dodatno, u kontekstu korišćenja PD-MMĆ u regeneraciji oštećenog tkiva periodoncijuma, pokazano je da ove ćelije nakon odmrzavanja krioprezerviranih tkiva periodoncijuma i izolacije ćelija zadržavaju karakteristike PD-MMĆ kao što su: ekspresija STRO-1, multipotentni potencijal diferencijacije, kao i stvaranje tkiva sličnog cementu (*Feng i sar., 2010*).

Iako najnovija saznanja o funkcionalnim svojstvima PD-MMĆ otvaraju nove poglede na ćelijsku terapiju, potencijalna klinička primena PD-MMĆ podrazumeva sagledavanje kako pozitivnih, tako i negativnih osobina ovih ćelija. Kao što je već navedeno, ne postoji standardni kriterijum za identifikaciju PD-MMĆ, već se za njihovu karakterizaciju primenjuju kriterijumi identifikacije MMĆ. Takođe, treba imati u vidu starost donora PD-MMĆ, s obzirom da je pokazano da ćelije mladih donora imaju veći kapacitet regeneracije od ćelija izolovanih iz starijih donora (*Zheng i sar., 2009*). Sa druge strane, heterogenost populacije PD-MMĆ dalja istraživanja usmerava na izučavanje sudbine ovih ćelija nakon transplantacije. Pored toga, pošto je za izolaciju tkiva periodoncijuma neophodna ekstrakcija zuba, praktični problem izolacije PD-MMĆ u terapijske svrhe se javlja kod pacijenata kojima nije potrebna ova intervencija iz ortodontskih razloga. U cilju olakšavanja istraživanja različitih funkcija i molekularnih mehanizama uključenih u regulaciju bioloških odgovora PD-MMĆ, danas su razvijene metode stvaranja ćelijskih linija različitog porekla (mišje, humane, svinjske). Tako su uspostavljene humane ćelijske linije primarnih PD-MMĆ koje su imortalizovane transfekcijom gena za *Simian virus 40-T antigen (SV40T-Ag)* i *hTERT* (od engl. *human telomerase reverse transcriptase*), neizmenjenih osnovnih karakteristika, za koje je pokazano da u *in vivo* uslovima imaju sposobnost formiranja struktura sličnih periodoncijumu (*Fujii i sar., 2008*). Ove osobine čine dobijene ćelijske linije pogodnim modelima za izučavanje uticaja različitih faktora na funkcionalna svojstva PD-MMĆ, kao i molekularnih mehanizama koji leže u osnovi njihovog delovanja.



## 1.2. INTERLEUKIN 17

Familija IL-17 citokina i njihovih receptora je prva ligand/receptor familija koja je identifikovana bez poznavanja biološke aktivnosti njenih članova, a na osnovu homologije sa sekvencama iz ustanovljenih DNK biblioteka. Naime, 1993. godine Rouvier i saradnici su klonirali gen za IL-17 iz DNK biblioteke hibridoma dobijenog fuzijom citotoksične T ćelije miša i T ćelije limfoma pacova. Pošto se prvo mislilo da je ovaj gen poreklom iz mišjeg citotoksičnog T limfocita nazvali su ga CTLA-8 (od engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 8*). Kada je potvrđeno da je novootkriveni gen poreklom iz T ćelije pacova autori su primetili u 3' regionu informacione RNK (iRNK) veliki broj AU-bogatih ponovaka karakterističnih za iRNK različitih faktora rasta, citokina i onkogeni, kao i da je ovaj gen pokazivao preko 50% homologije sa proteinom koji je kodiran ORF13 genom T-ćelijskog virusa *Herpesvirus saimiri* (Rouvier i sar., 1993). Nakon dalje karakterizacije i otkrivanja njegovog specifičnog receptora, Yao i saradnici su 1995. godine novi protein sa utvrđenim specifičnim karakteristikama u odnosu na druge citokinske porodice imenovali kao IL-17, a njegov receptor kao IL-17 receptor (IL-17R) (Yao i sar., 1995<sup>a</sup>; Yao i sar., 1995<sup>b</sup>). Sekvenciranjem genoma čoveka i drugih kičmenjaka, kao i metodama bioinformatike, do danas je otkriveno da porodica IL-17 citokina broji šest srodnih citokina (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) i pet njima odgovarajućih receptora (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE) (**Slika 4**) (Gaffen i sar., 2009; Gaffen i sar., 2014). Danas se IL-17A smatra prvootkrivenim članom jedinstvene receptor/ligand familije IL-17 proteina.



**Slika 4. Shematski prikaz IL-17 citokina i njihovih receptora.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Gaffen i sar., 2014.*

*IL-17 porodica citokina do danas broji šest citokina i pet receptora.*

### 1.2.1. Produkcija IL-17

Nakon otkrića IL-17, sledeći izazov koji se nametnuo istraživačima podrazumevao je definisanje podtipa T limfocita koje proizvode IL-17. Do tada je pretpostavljano da postoje dva tipa pomoćničkih T limfocita i to na osnovu profila citokina koje oslobađaju: Th1 i Th2 ćelije (Mosmann i sar., 1986). Međutim, Th ćelije koje proizvode IL-17 se nisu mogle uklopiti ni u jedan od dva pomenuta ćelijska podtipa. Dodatnim istraživanjima utvrđeno je da zaista postoji jedinstvena populacija T limfocita, označena kao Th-17 ćelije, koje pored IL-17, proizvode i TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-21, IL-22 i IL-26 (Harrington i sar., 2005; Park i sar., 2005; Chung i sar., 2006; Korn i sar., 2007). Novija istraživanja su pokazala da ove ćelije takođe proizvode i faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF, od engl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), što je doprinelo razumevanju značaja Th17 ćelija u inicijaciji inflamatornih patoloških procesa (Codarri i sar., 2011). Otkriće Th17 ćelija je potvrdilo kompleksnost međusobnih odnosa različitih podtipova T limfocita, uključujući međusobnu supresiju, kao i prelazak jednog tipa T limfocita u drugi (plastičnost) (Zhu i Paul, 2010).



U novijim istraživanjima je potvrđeno da osim Th17 ćelija postoje i drugi izvori IL-17, pretežno među efektorskim imunskim ćelijama, kao što su CD8<sup>+</sup> T limfociti,  $\gamma\delta$  T limfociti, NK ćelije, NKT ćelije, ćelije induktori limfoidnog tkiva (LTi), kao i makrofagi i granulociti (Cua i Tato, 2010; Reynolds i sar., 2010). Takođe neke članove IL-17 familije proizvode i neimunske ćelije, kao što su mišićne ćelije, adipociti i neuroni (Gaffen 2014). S obzirom na široku rasprostranjenost receptora za IL-17, utvrđeno je da ključne ćelije koje reaguju na stimulaciju ovim citokinom uglavnom ne pripadaju ćelijama imunskog sistema, već su to pretežno epitelne ćelije, stromalne, mezenhimske ćelije (fibroblasti, miofibroblasti, osteoblasti, hondrociti) i keratinociti (Gaffen i sar., 2009; Toy i sar., 2006).

Sledeća faza u istraživanjima populacije Th17 ćelija bila je posvećena izučavanju faktora koji regulišu diferencijaciju Th17 limfocita i produkciju IL-17, u okviru koje je utvrđeno da je IL-23 ključni faktor diferencijacije ove linije, kao i regulator produkcije IL-17 od strane memorijskih T limfocita (Aggarwal i sar., 2003). IL-23 je novootkriveni citokin koji deli zajedničke karakteristike sa IL-12, uključujući zajedničku subjedinicu p40, kao i IL-12R $\beta$ 1 subjedinicu receptora. U novijim istraživanjima je pokazano da je IL-23 odgovoran za preživljavanje i stabilnost Th17 ćelija, dok su za diferencijaciju ovih ćelija ključni IL-6 i TGF- $\beta$  (Bettelli i sar., 2006; Veldhoen i sar., 2006). Osim ovih citokina, pozitivni regulatori produkcije IL-17 su i IL-1, IL-21, dok u negativne regulatore spadaju IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-25 i IL-27 (O'Shea i sar., 2009).

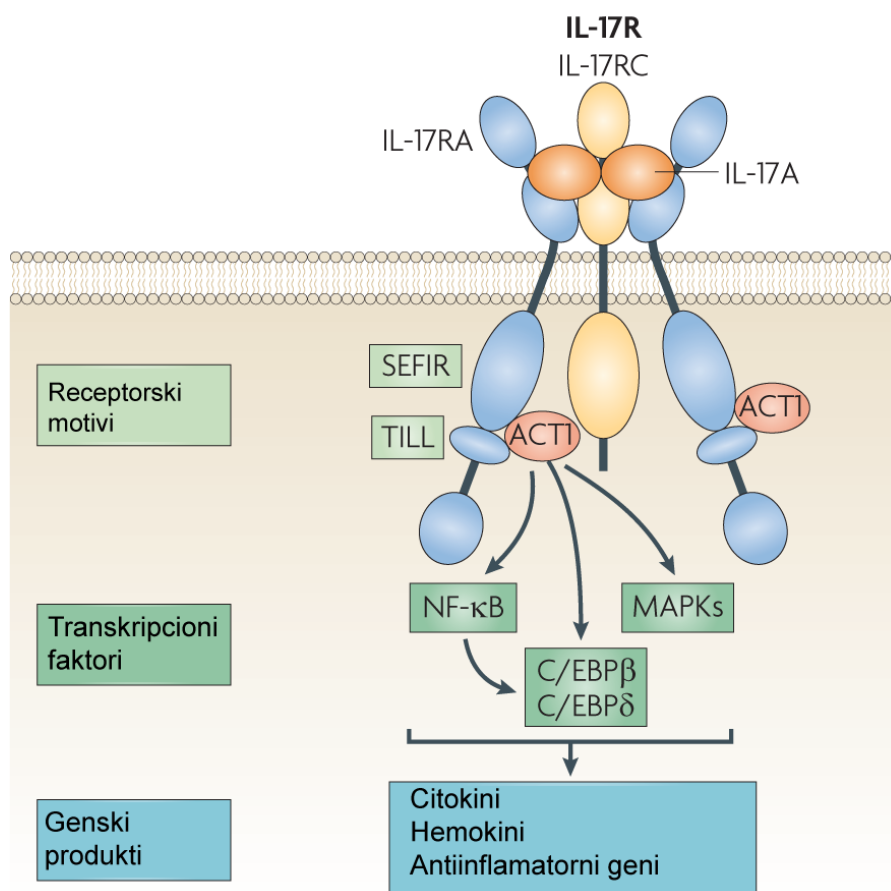
### **1.2.2. Signalni putevi aktivirani IL-17**

Do sad je najbolje proučen prvootkriveni član familije IL-17A (najčešće nazivan IL-17). Na osnovu dosadašnjih saznanja pretpostavlja se da IL-17 citokini predstavljaju disulfidnim vezama povezane homodimere, a da IL-17A i IL-17F mogu da formiraju i heterodimere. Humani gen za IL-17A lociran je na hromozomu 2q31 i kodira polipeptid sastavljen od 155 aminokiselina, dok funkcionalna forma IL-17 predstavlja homodimer koji nastaje zahvaljujući formiranju intermolekulskih veza između cisteinskih ostataka u proteinu (Fossiez i sar., 1996). U okviru familije IL-17 citokina najveću homologiju pokazuju IL-17A i IL-17F i oba citokina zahtevaju i IL-17RA i IL-17RC za signalizaciju (Ely i sar., 2009).



Dosadašnja saznanja ukazuju da nijedan od 5 receptora familije IL-17 nema sličnosti sa bilo kojim poznatim receptorima (**Slika 4**). Najproučeniji receptorski kompleks do danas je kompleks koji vezuje IL-17A, a on je sastavljen od dve IL-17RA i jedne IL-17RC subjedinice (**Slika 5**). Subjedinice ovog kompleksa se sastoje od ekstracelularnih i intracelularnih domena. Ekstracelularni domeni su sačinjeni od dva fibronektinu tipa III slična domena (FN1 i FN2) (*Kramer i sar., 2007*), a dugi citoplazmatski domeni su glavna karakteristika po kojoj se ovi receptori razlikuju od drugih receptora. Na osnovu bioinformatičkih analiza utvrđeno je da se u okviru citoplazmatskih domena familije IL-17R nalaze konzervisani motivi homologa TIR (*Toll-IL-1 Receptor*) domenu nazvani SEFIR domeni (od engl. *Similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17 receptors*) (*Novatchkova i sar., 2003*). Na C-terminalnom kraju SEFIR domena nalazi se *TIR-like loop* (TILL) motiv jedinstven za IL-17RA, kao i C terminalni C/EBP $\beta$  aktivacioni domen (CBAD, od engl. *C-terminal C/EBP $\beta$ -activation domain*) čijom se fosforilacijom pokreće signalna kaskada od strane IL-17 u ćelijama (*Gaffen i sar., 2009*). Po aktivaciji IL-17R, za SEFIR i TILL domen ovog receptorskog kompleksa vezuje se aktivator 1 NF- $\kappa$ B (Act1, od engl. *Nf- $\kappa$ B activator 1*) koji dalje regrutuje faktor povezan sa TNF receptorom, TRAF6 (od engl. *TNF-Receptor-Associated Factor*) i ostale posrednike signalne kaskade IL-17R (*Gaffen i sar., 2009; Gaffen i sar., 2014; Krstić i sar., 2015<sup>a</sup>*). Pokrenuta signalna kaskada IL-17R sledstveno dovodi do aktivacije NF $\kappa$ B i članova familije transkripcionih faktora koji se vezuju za CCAAT sekvencu pojačivača gena C/EBP (eng. *CCAAT enhancer-binding protein*) koji kontrolišu ekspresiju ciljnih gena za različite citokine, hemokine i inflamatorne faktore (**Slika 5**). Pored toga, IL-17 aktivira i druge signalne molekule poput sve tri klase mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK, od engl. *Mitogen-activated protein kinase*): p38, ERK1/2 (od engl. *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*) i JNK (od engl. *c-Jun N-terminalkinases*), a u pojedinim biološkim funkcijama pokazano je i da IL-17 aktivira JAK/STAT (od engl. *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) signalne puteve transdukcije (*Subramanian i sar., 1999; Rahman i sar., 2006; Gaffen i sar., 2009*). Koji će signalni put biti pokrenut zavisi kako od tipa ćelije, tako i od specifične mikrosredine u kojoj se ćelija nalazi.





**Slika 5. IL-17R i signalni putevi indukovani IL-17.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Gaffen, 2009.*

*IL-17R predstavlja heterodimer koji se sastoji od dve IL-17RA i jedne IL-17RC subjedinice. Vezivanje IL-17 pokreće signalizaciju posredovanu SEFIR domenom citoplazmatskog domena IL-17R. Aktivacijom adaptorskih proteina (ACT1, TAK1, TRAF3 i TRAF6) koji se vezuju za receptorske motive IL-17R pokreće se aktivacija nishodnih signalnih molekula i transkripcionih faktora.*



### 1.2.3. Biološki efekti IL-17

Kao deo stečenog imunskog odgovora IL-17 ostvaruje različite biološke funkcije, pri čemu njegov efekat zavisi od tipa ćelija i mikrosredine u kojoj deluje. Ovaj citokin često svoje efekte ne ispoljava samostalno, već u kombinaciji sa drugim faktorima, pa je tako utvrđeno da IL-17 ima aditivno dejstvo sa  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  i IL-1 (Fossiez i sar., 1996; Chabaud i sar., 2001), dok IL-10, IL-13,  $\text{TGF-}\beta$  i PGE2 ispoljavaju antagonističko dejstvo sa IL-17 (Chabaud i sar., 2001). Zbog ove uloge modulatora aktivnosti drugih faktora, IL-17 je često nazivan i „citokinom za fino podešavanje” (Katz i sar., 2001).

IL-17 deluje preko svog, široko rasprostranjenog receptora, koji se može naći na površini fibroblasta, B i T limfocita, mononuklearnih ćelija, stromalnih ćelija kostne srži, epitelnih i endotelskih ćelija (Lohr i sar., 2009). IL-17 je pretežno proinflamatorni citokin, kojistimuliše produkciju različitih inflamatornih medijatora i ima važnu ulogu u regulaciji ekspanzije i hemotakse neutrofila u odbrani domaćina od ekstracelularnih bakterija i gljivica, ali i u razvoju različitih autoimunskih i inflamatornih oboljenja. Krajnji efekat signalnih puteva pokrenutih IL-17 je sinteza mnogobrojnih hemokina (CXCL1, CXCL2, IL-8, CCL2, CCL7, CCL20 i CKSCL1), citokina ( $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12), i faktora rasta (faktor stimulacije rasta granulocitnih kolonija (G-CSF), GM-CSF, faktor rasta MĆ (SCF)), kao i proteina akutne faze, antimikrobnih peptida i određenih enzima poput matriksnih metaloproteinaza (MMP3, MMP13) (Gaffen i sar., 2008; Xu i Cao, 2010). *In vivo* istraživanja su pokazala da IL-17 snažno stimuliše produkciju neutrofila regulacijom ekspresije G-CSF, i G-CSF receptora, kao i njihovo regrutovanje posredstvom regulacije ekspresije CXC hemokina. Takođe, i putem indukcije sinteze GM-CSF, IL-17 utiče na ekspanziju granulocita i makrofaga koji učestvuju u inflamaciji tkiva. Zajedno, svi ovi produkti aktivnosti IL-17 određuju tok infiltracije neutrofila i inflamacije čime definišu proinflamatorni karakter delovanja ovog citokina (Dong, 2008).

Zaštitna uloga IL-17 u odbrani domaćina od patogenih bakterija pokazana je i u *in vivo* istraživanjima u kojima je praćena osetljivost miševa koji ne ekspimiraju receptor za IL-17R na bakteriju *Klebsiella pneumoniae* u poređenju sa normalnim miševima kao kontrolnom grupom (Ye i sar., 2001). Nakon intranazalne infekcije, miševi deficijentni za IL-17R imali su povećan broj bakterija u plućima i jetri, a ukupni stepen preživljavanja životinja bio je smanjen. Povećana osetljivost na *K. pneumoniae* miševa



deficijentnih za IL-17R bila je direktno povezana sa odloženim regrutovanjem neutrofila i redukovanom ekspresijom G-CSF i inflamatornog makrofagnog proteina-2 (MIP-2, od engl. *macrophage-inflammatory protein-2*) u plućima nakon infekcije. Pored toga, pokazano je da je nivo određenih antimikrobnih supstanci, kao što su beta-defenzini, mucini i S100 proteini, koji se smatraju prirodnim antibioticima u plućima, koži i crevima, značajno povećan delovanjem IL-17 na epitelne ćelije što obezbeđuje zaštitu od širokog spektra mikroorganizama (Xu i Cao, 2010).

Osim u inflamaciji, naša i istraživanja drugih autora su pokazala da IL-17 učestvuje u regulaciji hematopoeze, utičući na proliferaciju i diferencijaciju HMC i progenitorskih ćelija kako granulocitno-monocitne loze, tako i eritrocitne loze (Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2009; Krstić i sar., 2012). Prva istraživanja uloge IL-17 u procesu hematopoeze su pokazala njegovu značajnu ulogu u procesu granulopoeze (Fossiez i sar., 1996; Schwarzenberger i sar., 1998) kada je u *in vitro* istraživanjima utvrđeno da IL-17 izaziva proliferaciju CD34+ ćelija, kao i njihovu diferencijaciju u granulocite, ali samo u prisustvu fibroblasta koji su pod uticajem IL-17 produkovali hematopoetske citokine G-CSF i IL-6. Ovi nalazi su u kasnijim istraživanjima potvrđeni i na *in vivo* modelima (Schwarzenberger i sar., 2000; Jovčić i sar., 2004; Jovčić i sar., 2007). Kada govorimo o uticaju IL-17 na eritroidne progenitore, takođe je pokazano u *in vitro* i *in vivo* uslovima da ovaj citokin svoje dejstvo ostvaruje indirektno, tj. indukcijom produkcije sekundarnih medijatora, poput IL-6, eritropoetina i NO. Pri tome, značajno je pomenuti da efekti IL-17 na hematopoetske ćelije ne zavise samo od mikrosredine i lozne pripadnosti ćelija, već i od njihovog stepena diferentovanosti. Naime, u našim istraživanjima je pokazano da IL-17 na opredeljene matične ćelije eritropoeze kostne srži miša deluje dvojako: stimuliše rast primitivnijih eritroidnih progenitora (Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2009), dok inhibira rast zrelijih eritroidnih progenitora (Bugarski i sar., 2004; Jovčić i sar., 2004). Pored toga, utvrđeno je da efekat IL-17 na hematopoetske progenitore zavisi i od toga da li je stanje organizma konstitutivno ili izmenjeno, kao npr. nakon zračenja ili infekcije (Jovčić i sar., 2001; Bugarski i sar., 2006).

Novija istraživanja su pokazala da IL-17 ispoljava različite efekte i na MMC budući da je pokazano da ovaj citokin značajno utiče na proliferaciju i diferencijaciju mišjih i humanih MMC. Konkretno, pokazano je da IL-17 stimuliše proliferaciju mišjih MMC



izolovanih iz kostne srži, kao i osteogenu diferencijaciju humanih MMĆ kostne srži, dok, s druge strane, inhibira adipogenu diferencijaciju ovih ćelija (*Huang i sar., 2006; Huang i sar., 2009; Shin i sar., 2009*), ukazujući na značaj IL-17 u održanju homeostaze koštanog tkiva. Dosadašnji literaturni podaci su ukazali da se uticaj IL-17 na diferencijaciju MMĆ razlikuje u zavisnosti od vrste domaćina i tkiva iz kojeg su izolovane ćelije. Tako je pokazano da IL-17 dovodi do inhibicije miogene diferencijacije ćelijske linije mišjih multipotentnih mioblasta C2C12 preusmeravajući njihovu diferencijaciju u pravcu osteogeneze (*Kocić i sar., 2012*). Takođe, na istim ćelijama je pokazano da IL-17 dovodi do aktivacije transkripcionog faktora adipogene diferencijacije PPAR $\gamma$  i sledstveno njihove diferencijacije u adipocite (*Lee i sar., 2011*).

Pored uloge u diferencijaciji MMĆ, takođe je pokazano i da je IL-17 uključen u procese migracije i mobilizacije MMĆ. Huang i saradnici su objavili da IL-17 *in vitro* stimuliše migraciju humanih MMĆ izolovanih iz kostne srži (*Huang i sar., 2009*). Štaviše, naša grupa je pokazala da IL-17 indukuje ekspresiju urokinaznog tipa aktivatora plazminogena (uPA od engl. *urokinase-type Plasminogen Activator*) u humanim MMĆ izolovanim iz periferne krvi, povećavajući njihovu adheziju za endotel i transendotelsku migraciju, što je ukazalo na moguću ulogu IL-17 u mobilizaciji i regrutovanju MMĆ u oštećena tkiva (*Krstić i sar., 2015<sup>a</sup>*).

Dosadašnji nalazi o uticaju IL-17 na različite funkcije MMĆ i drugih ćelija ukazuju da su efekti ovog citokina mnogobrojni i raznovrsni, kao i da zavise od primenjenog eksperimentalnog modela. Ipak, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti sagledali efekti, mehanizmi, kao i značaj delovanja IL-17, kao važnog faktora inflamatorne mikrosredine, na različite funkcionalne osobine MMĆ.



### 1.3. PARODONTOPATIJA- POJAM I PROGRESIJA BOLESTI

Milioni ljudi pate od parodontopatije, hroničnog progresivnog inflamatornog oboljenja tkiva parodontijuma uzrokovanog bakterijama zubnog plaka, koje karakteriše upala desni i gubitak parodontijuma što posledično dovodi do nepovratnih promena i gubitka zuba. Parodontijum je specijalizovano vezivno tkivo koje okružuje koren zuba i ima ulogu u pričvršćivanju zuba za kost vilice, amortizovanju mehaničkog pritiska koji se javlja tokom žvakanja i govora, ali i u formiranju i resorpciji koštanog tkiva. U sastav parodontijuma ulaze desni i periodoncijum, kao meka tkiva, kao i dva čvrsta tkiva: alveolarna kost i cement (gled) koji prekriva koren zuba (*Maeda i sar., 2011*).

Usna duplja predstavlja početni deo digestivnog sistema gde se vrši mehanička obrada hrane i započinje njena hemijska digestija. S obzirom na njenu ulogu, ovaj organ je neprestano izložen mnogobrojnim antigenima, pa tako i aktivnostima imunskog sistema. Ukupno zdravlje usne duplje zavisi od integriteta svih prirodnih barijera koje normalno blokiraju delovanje mikroorganizama (sluznica, saliva, sulkusna tečnost i komponente ćelijske i humoralne imunosti lokalizovane u okviru oralnog limfnog tkiva) (*Cawson, 2000; Hajishengallis, 2014; Hajishengallis, 2015*).

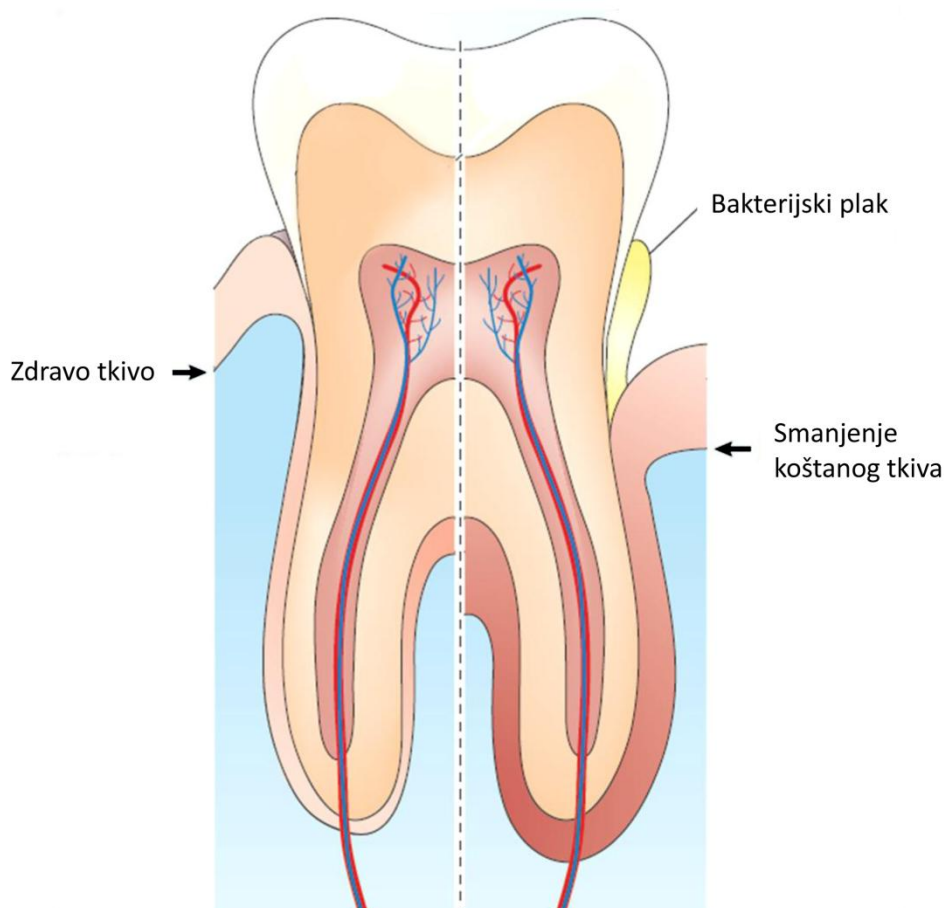
Posebno izražena odlika usne duplje je i prisustvo bakterijskog biofilma (plaka), organizovanog skupa velikog broja različitih mikroorganizama, koji se formira na površini zuba. Vrlo složena flora formiranog plaka uključuje prisustvo oko  $2,5 \times 10^7$  aerobnih bakterija/mg plaka (Gram-pozitivni koke i bacili, od kojih je najbrojniji *Streptococcus sanguis*) i oko  $4,6 \times 10^7$  anaerobnih bakterija/mg plaka (*Veilonella, Actinomyces, Fusobacteria*). Sastojci plaka, pre svega lipopolisaharidi (LPS) i dekstrani, nakon prolaska kroz epitel značajno podstiču aktivnost imunskog sistema. Iz ovih razloga je neželjenim uticajima mikroba najizloženija veza između desni i zuba, odnosno spoljni epitel desni koji putem periodoncijuma komunicira sa koštanim tkivom vilice (*Cawson, 2000*).

Patogene Gram negativne bakterije predstavljaju primarni etiološki faktor koji dovodi do oboljenja potpornog tkiva zuba stimulišući inflamatornu reakciju. Bakterije plaka izazivaju upalu desni (gingivitis) koja može da pređe u hroničnu upalu označenu kao parodontopatija. Ukoliko se ne leči, upala napreduje do stadijuma destruktivne parodontopatije što je posredovano brojnim imunološkim mehanizmima, a posledice su oštećenje parodontijuma, gubitak potpornog koštanog tkiva, stvaranje " džepova "



između zuba, pa i gubitak zuba (**Slika 6**) (Cawson, 2000; Hajishengallis 2014; Hajishengallis; 2015).

Uzroci parodontopatije još uvek nisu u potpunosti poznati, iako je ovo veoma rasprostranjeno oboljenje zuba i zauzima drugo mesto po zastupljenosti oboljenja zuba u ljudskoj populaciji, odmah nakon karijesa. Pretpostavlja se da je destrukcija parodontalnog tkiva posledica preterane aktivacije inflamatornog odgovora domaćina na bakterijsku infekciju koja dovodi do povišenog nivoa sekrecije proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17), matriksnih metaloproteinaza (MMP, od engl. *matrix metalloproteinase*) i PGE-2, istovremeno indukujući smanjenu produkciju IL-10, TGF- $\beta$  i tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza. Prema ovom konceptu, jasno je da balans produkovanih citokina reguliše održanje homeostaze koštanog tkiva, odnosno njegovu destrukciju (Benedeto i sar., 2013; Kayal i sar., 2013).



**Slika 6. Shematski prikaz zdravog i obolelog parodontalnog tkiva.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Darveau i sar., 2010.*

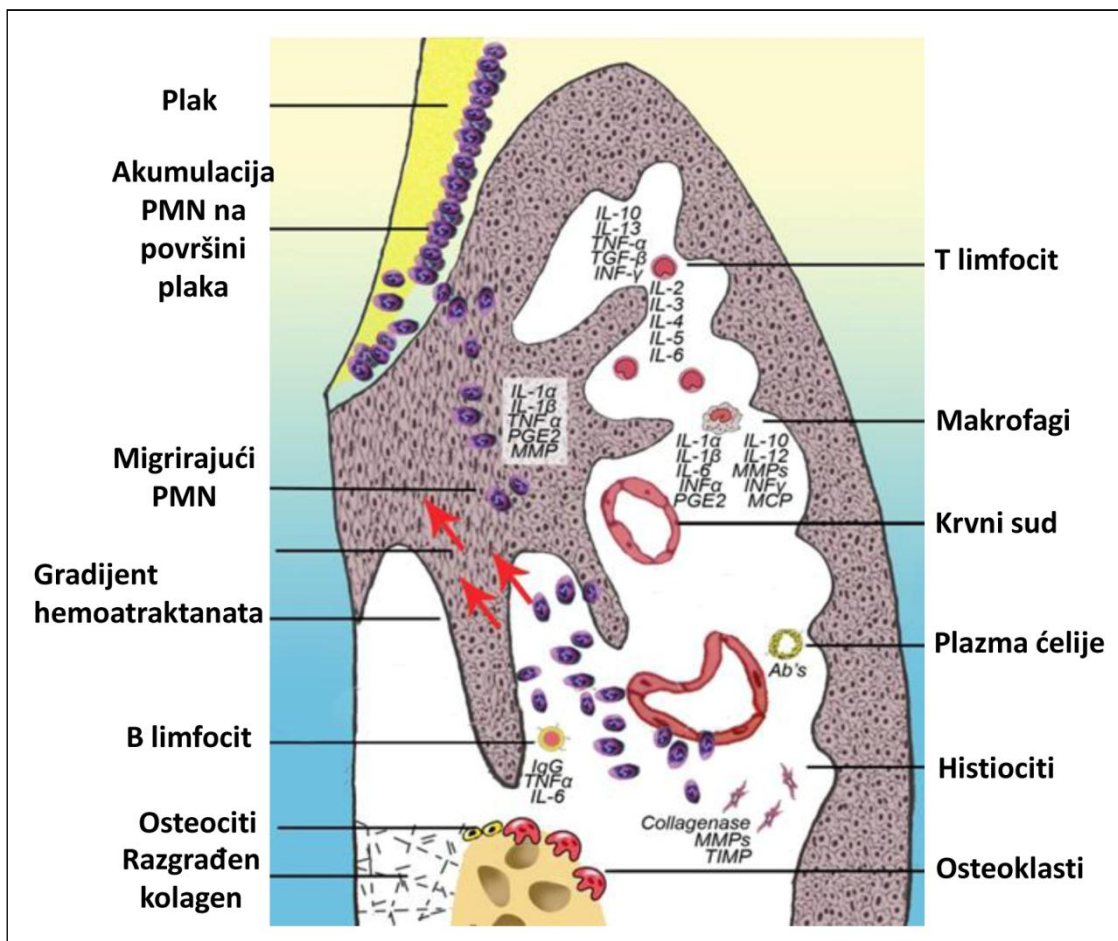


Histopatološke i ultrastrukturne promene koje se uočavaju na uzorcima dobijenim iz animalnih modela ove bolesti upućuju na četiri faze u razvoju bolesti desni (gingive) i periodoncijuma: početnu, ranu, uspostavljenu i uznapređovalu bolest. Početna reakcija podrazumeva upalni odgovor 2-4 dana nakon stvaranja plaka. Tada je inflamacija ograničena na sulkus gingive i obližnji spojni epitel i vezivno tkivo. Čelije epitela u ovoj fazi luče proinflamatorne medijatore kao što je IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1, ali i MMP koje učestvuju u razgradnji ECM. Posledično dolazi do dilatacije krvnih sudova gingive i stvaranja eksudata koji sadrži komponente komplementa, fibrin i granulocite. Pri tome komponente komplementa C3 i C5 deluju kao hemoatraktanti, privlačeći granulocite na mesto odgovora. Klinički, ova faza se odlikuje blagim marginalnim gingivitisom. Sledeća faza rane inflamacije, razvija se 4-7 dana nakon nakupljanja plaka kada dolazi do infiltracije limfocita. Većina infiltriranih limfocita pripada T ćelijama, dok je manji broj B limfocita i makrofaga. Ovi procesi praćeni su i degradacijom ECM u blizini limfocita kao posledicom disbalansa u produkciji hemokina i proteaza, kao i njihovih aktivatora i inhibitora od strane rezidentnih i regrutovanih ćelija imunskog sistema, zbog čega dolazi do lokalnog gubitka kolagena (*Garlet i sar., 2006*). Takođe, limfociti iz cirkulacije mogu dospeti u područje gingive zahvaćeno upalom gde luče različite citokine, poput TNF- $\alpha$ , IL-6 ali i MIF (od engl. *macrophage migration inhibitory factor*), čime se leukociti zadržavaju na mestu inflamacije uključujući makrofage koji amplifikuju inflamatornu reakciju lučenjem IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, PGE2 (prostaglandin E2) (*Cawson, 2000*). Bolest se uspostavlja 2-3 nedelje nakon stvaranja plaka i karakteriše se infiltracijom plazma ćelija koje pretežno luče IgG, kao i T limfocitima senzibilisanim antigenima bakterija plaka (**Slika 7**). Uspostavljeno žarište može se održati godinama, što znači da se odlikuje hroničnom, ali uspešnom odbrambenom reakcijom. Ovo stanje prelazi u uznapređovalu fazu kada ta reakcija poprimi obeležja destruktivnog imunopatološkog procesa (*Cawson, 2000*).

Još uvek nije poznato koji činioci uslovljavaju prelaz od uspostavljene ka uznapređovaloj fazi zapaljenja. Postoje dva stava o uzrocima napredovanja bolesti: 1) imunski uzroci i 2) bakterijski uzroci (kandidati su *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, i spirohete). Odlike uznapređovale faze zapaljenja predstavlja stvaranje džepova, ulceracija epitela džepova, destrukcija kolagena parodoncijuma i resorpcija alveolarne kosti. Takođe, prisutna je gusta



infiltracija plazma ćelija, limfocita i makrofaga, dok sulkusna tečnost sadrži veliku količinu IgG, IgA, IgM, komponenti komplementa i pretežno granulocite.



### Slika 7. Mehanizam formiranja i napredovanja parodontalne lezije.

Preuzeto i izmenjeno prema internet stranici <http://periobasics.com/wp-content/uploads/2013/05/Periodontal-pocket-formation.jpg>.

Početa lezija nastaje u odgovoru na aktivnost rezidentnih leukocita i endotelskih ćelija na bakterijski biofilm (plak). U ovoj fazi, nema znakova kliničkog zapaljenja, ali se promene u tkivima mogu uočiti histološki. PMN (polimorfonuklearni leukociti) napuštaju krvne sudove i migriraju i nakupljaju se na mestu inflamacije. Rane promene prati i pojava makrofaga, limfocita, plazma ćelija i mastocita. Sledeća faza uspostavljene lezije se smatra periodom tranzicije sa urođenog ka stečenom imunskom odgovoru. Makrofagi, plazma ćelije, T i B limfociti zajedno sa medijatorima zapaljenja su dominantni, a protok krvi je oslabljen. Poslednja faza podrazumeva nastanak naprednih lezija, praćen aktivacijom osteoklasta i nepovratnim gubitkom koštane mase.





S obzirom na složenost i težinu poremećaja imunskog odgovora, na efikasnost terapije ovog oboljenja značajno utiče ukupni zdravstveni status individue. Tako je pokazano da se kod osoba lečenih imunosupresivnim lekovima, poput bolesnika sa presađenim organima, ređe razvija parodontopatija, što može biti posledica antiinflamatornog, ali i imunosupresivnog delovanja primenjenih lekova (steroida). Sa druge strane, ovaj patološki proces može pospešiti razvoj ozbiljnijih bolesti, poput kardiovaskularnih oboljenja, hronične opstruktivne bolesti pluća, kao i dijabetesa, što su česte posledice parodontopatije (*Silva i sar., 2012*).

### **1.3.1. Matriksne metaloproteinaze i urokinazni tip plazminogen aktivatora u parodontopatiji**

U ranim fazama parodontopatije nakon infekcije i narušavanja epitelne barijere, prve ćelije koje se susreću sa mikroorganizmima, fibroblasti gingive i periodoncijuma, oslobađaju citokine i hemoatraktante koji su važni regulatori inflamatornog procesa, kao i faktore koji direktno učestvuju u metabolizmu koštanog tkiva (od engl. *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand*, RANKL). Takođe, ove ćelije sekretuju i molekule koji učestvuju u migraciji ćelija i razgradnji ECM, poput MMP, uPA i laminina, čime se omogućavaju dalji procesi infiltracije leukocita, i time odbrane od patogena, ali koji mogu da dovedu i do oštećenja tkiva (*Bodet i sar., 2007*).

Matriksne metaloproteinaze predstavljaju familiju vanćelijskih proteinaza koje učestvuju u remodelovanju tkiva, kako u normalnim, tako i u patološkim uslovima. Ovi enzimi imaju važnu ulogu u migraciji ćelija, kao i regulaciji enzimske obrade proteina matriksa, citokina, faktora rasta i adhezivnih molekula. Familija MMP broji više od 20 cink i kalcijum-zavisnih endopeptidaza sličnih funkcionalnih domena koje su prvobitno dobijale nazive prema supstratu na koji deluju na osnovu čega su podeljene na: kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), želatinaze (MMP-2, MMP-9), stromelizine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilizine (MMP-7, MMP-26), membranski tip MMP (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) i elastaze makrofaga (MMP12). Danas se primenjuje numerološki sistem naziva na osnovu redosleda otkrića (*Sekhon, 2010*).

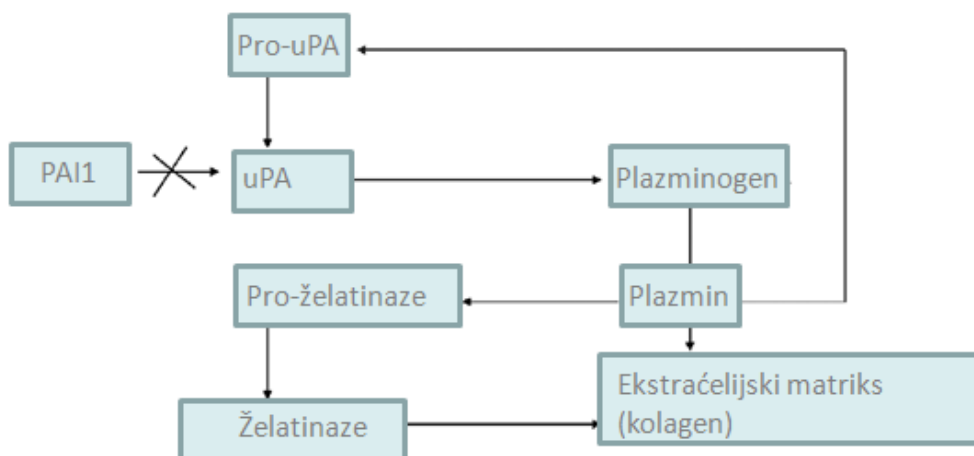
Povećana ekspresija MMP povezana je sa mnogim patološkim stanjima. U normalnim, fiziološkim uslovima konstitutivna ekspresija i enzimska aktivnost MMP je



niska zahvaljujući strogoj regulaciji na transkripcionom, posttranskripcionom nivou, kao i na nivou proteina putem aktivacije latentnih proenzima i inhibicije dejstvom endogenih tkivnih inhibitora (*Sternlicht i Werb, 2001*). U aktivaciji latentnih proenzima MMP mogu da učestvuju drugi članovi MMP familije ili uPA.

Urokinazni aktivator plazminogena, uPA, pripada sistemu aktivacije plazminogena, kompleksnoj enzimskoj kaskadi u kojoj pojedinačne komponente aktiviraju i deaktiviraju glavni produkt kaskade, plazmin. Ovaj sistem se sastoji iz serinske proteaze uPA, receptora za uPA (uPAR), kao i dva serinska inhibitora uPA, PAI1 i PAI2 (**Slika 8**). Glavna aktivnost uPA sistema je konvertovanje plazminogena u plazmin koji dalje razgrađuje ECM aktiviranjem latentnih MMP i faktora rasta (*Wyganowska-Świątkowska i sar., 2014*).

S obzirom da je poznato da je kolagen jedna od glavnih komponenti ECM, kako mekih, tako i čvrstih dentalnih tkiva, uloga kolagenaza (MMP-1, MMP-8) i želatinaza (MMP-2 i MMP-9) u procesima koji dovode do razgradnje ECM tkiva periodoncijuma i progresije resorpcije alveolarne kosti u parodontopatiji je veoma bitna (*Ryan i Golub, 2000*). Pored granulocita, osteoblasta i osteoklasta, želatinaze proizvode i ćelije gingive i periodoncijuma (*Ejeil i sar., 2003*). Takođe, pokazano je prisustvo MMP u parodontalnim lezijama (*Birkedal-Hansen, 1993*), kao i njihov povećan nivo u gingivalnom tkivu i sulkusnoj tečnosti pacijenata obolelih od parodontopatije (*Ejeil i sar., 2003; Pozo i sar., 2005; Rai i sar., 2008*). U procesu resorpcije kosti poznato je da osteoblasti luče želatinaze koje razgrađuju nemineralizovani organski matriks kosti. S druge strane, mesto razgradnje ECM hemotaktički privlači osteoklaste koji nastavljaju ciklični proces resorpcije koštanog tkiva (*Ryan i Golub, 2000*). U obolelom tkivu parodontoncijuma je takođe potvrđena i povećana ekspresija uPA i PAI1 (*Deppe i sar., 2010*), dok je daljim istraživanjima utvrđeno da plazmin sistem deluje i na razvoj parodontopatije direktno, ali i indirektno aktivacijom latentnih formi MMP (*Bodet i sar., 2007; Lam i sar., 2015*).



**Slika 8. Sistem aktivacije plazminogena.**

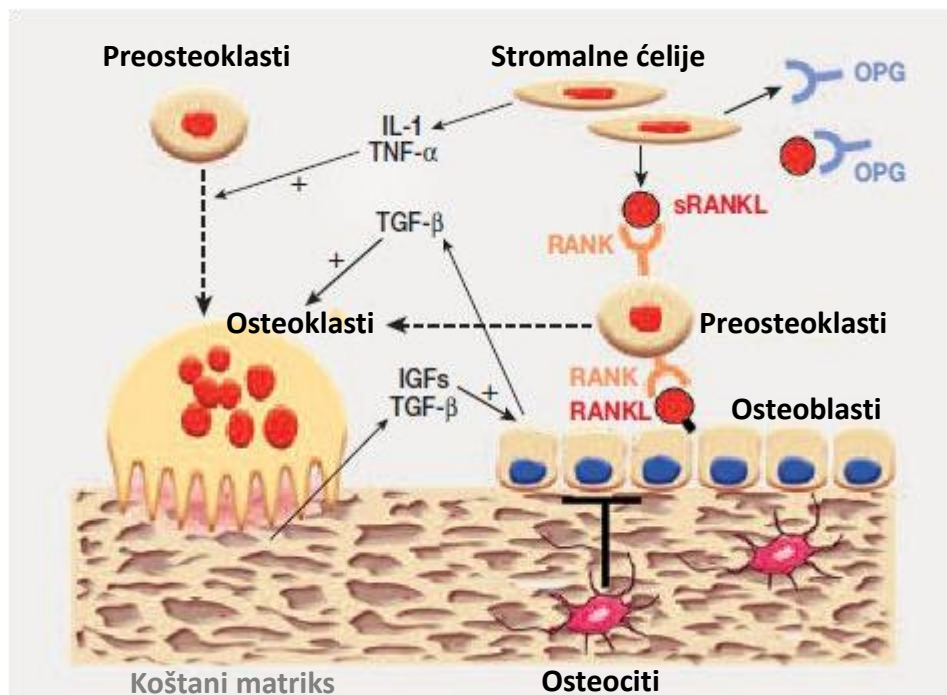
*Preuzeto i izmenjeno prema Wyganowska-Świątkowska i sar., 2014.*

*uPA sistem konvertuje plazminogen u plazmin koji dalje razgrađuje ekstraćelijski matiks aktivacijom MMP i uPA.*

### 1.3.2. Imunologija koštanog tkiva

Kako je krajnji stadijum parodontopatije razaranje koštanog tkiva vilice, poznavanje mehanizama odnosa imunskog i koštanog tkiva predstavlja osnovu razumevanja ovog široko rasprostranjenog oboljenja.

U fiziološkim okolnostima, skeletni sistem obezbeđuje potporu, mobilnost i mehaničku zaštitu vitalnih organa, a predstavlja i rezervoar minerala poput kalcijuma i fosfata. U cilju obavljanja ovih složenih funkcija, koštano tkivo se neprestano nalazi u dinamičkoj ravnoteži koju karakterišu kontinuirani procesi razgradnje (posredovane osteoklastima) i taloženja (posredovanog osteoblastima) potpornog materijala. Ovaj biološki proces, označen kao remodelovanje koštanog tkiva odvija se simultano, tako što osteoblasti produkuju ključne faktore za diferencijaciju osteoklasta, dok osteoklasti nakon degradacije kosti oslobađaju faktore koji stimulišu aktivnost osteoblasta (**Slika 9**) (Jones i sar., 2011).



**Slika 9. Interakcije osteoblasta i osteoklasta tokom remodelovanja koštanog tkiva.**

*Preuzeto i izmenjeno prema Marie i sar., 2002.*

*Remodelovanje koštanog tkiva odvija se simultano. Osteoblasti proizvode ključne faktore za diferencijaciju osteoklasta ( $TGF-\beta$ ,  $IL-1$ ,  $TNF-\alpha$ ), dok osteoklasti nakon degradacije kosti oslobađaju faktore koji stimulišu aktivnost osteoblasta ( $IGF-1$ ,  $TGF-\beta$ ).*

Osteoklasti su ćelije mijeloidnog porekla, čija je diferencijacija regulisana prisustvom citokina RANKL, i koji adheriraju za površinu kostiju gde sekretuju kiseline i proteolitičke enzime (matriksne metaloproteinaze i katepsine) u cilju razgradnje neorganskih i organskih komponenata kosti. Nakon resorpcije, osteoblasti (ćelije mezenhinskog porekla) migriraju na razgrađeno mesto gde započinju proces formiranja novog koštanog tkiva putem sekrecije komponenti ECM uključujući kolagene, kao i proteine nekolagenog tipa (Jones i sar., 2011).

Vezivanje RANKL za svoj RANK receptor i sledstvena signalizacija predstavljaju ključan molekulski mehanizam u regulaciji odnosa osteoblasta i osteoklasta. Citokin RANKL pripada TNF familiji citokina kojeg mogu proizvoditi različiti tipovi aktiviranih ćelija uključujući osteoblaste, fibroblaste i T ćelije. Aktivacija RANK receptora na mononuklearnim prekursorima osteoklasta pokreće kaskadu događaja preko NF $\kappa$ B signalnog puta čiji je krajnji rezultat stvaranje višejedarne ćelije, nastale ćelijskom fuzijom, koja poseduje mehanizme neophodne za vezivanje za kost, sekreciju kiselina i proteolizu. Sa druge strane, diferencijacija osteoklasta inhibirana je



osteoprotegerinom (OPG), proteinom koga u normalnim okolnostima sekretuju osteoblasti, rezidentni fibroblasti i endotelske ćelije, a koji vezujući se za RANKL sprečava aktivaciju RANK receptora. Takođe, pokazano je i da MMC sekretuju OPG čime doprinose supresiji osteoklastogeneze. Ravnoteža između ekspresije RANKL i OPG je od suštinskog značaja za održanje ukupnog statusa koštanog tkiva, dok je aberantna produkcija RANKL prisutna u patološkim stanjima poput parodontopatije (Jones i sar., 2011).

Komponente i urođenog i stečenog imunskog odgovora imaju veliki uticaj na ključne faze procesa osteoklastogeneze, modulirajući odnos između osteoblasta i osteoklasta, čime doprinose ukupnom stanju koštanog tkiva. Naime, pored osteoblasta, sposobnost da produkuju RANKL imaju i pojedini tipovi imunskih ćelija uključujući monocite, neutrofile, DČ, T i B limfocite koji na taj način mogu da indukuju diferencijaciju osteoklasta. Osim toga, ove ćelije luče i brojne proinflamatorne citokine koji doprinose oštećenju koštanog tkiva delujući kako direktno na osteoklaste i osteoblaste, tako i indirektno potencirajući efekte RANK-RANKL signalizacije (Baker-LePain i sar., 2011; Zhao i sar., 2011). Među proinflamatornim citokinima potvrđeno je da TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-15 i IL-17 indukuju aktivaciju i sazrevanje osteoklasta, kao i da deluju na produkciju RANKL od strane osteoblasta, dok s druge strane IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$  inhibiraju osteoklastogenezu blokirajući RANK-RANKL signalizaciju direktno ili indirektno (Caetano-Lopes i sar., 2009). Pored toga, pokazano je i da RANKL utiče na stvaranje B limfocita stimulišući proliferaciju njihovih prekursora (Walsh i sar., 2006), ali i da B limfociti imaju potencijal da promovišu osteoklastogenezu (Datta i sar., 2008). Suprotno, pokazano je i da Th1 i Th2 ćelije inhibiraju osteoklastogenezu produkcijom inhibitornih citokina, IFN- $\gamma$  i IL-4 (Wang i sar., 2013). Dodatno, u novijim istraživanjima je pokazano da i Th17 ćelije imaju potencijal da indukuju osteoklastogenezu i to direktno produkujući RANKL i indirektno produkcijom IL-17. Konkretno, pokazano je da IL-17 s jedne strane indukuje produkciju RANKL od strane osteoblasta i sinovijalnih fibroblasta (Wang i sar., 2013), dok s druge strane amplifikuje inflamatorni odgovor stimulacijom produkcije inflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1) (Okamoto i Takayanagi, 2011). Takođe, poslednjih godina je pokazano da Treg inhibitorno deluju na osteoklastogenezu i resorpciju koštanog tkiva (Wang i sar., 2013). Do danas ne postoji jedinstven stav o



mehanizmu inhibicije osteoklastogeneze od strane Treg, ali se ipak zna da su citokini koje luče ove ćelije, uključujući  $TGF\beta$ , IL-10 i IL-4, glavni faktori koji učestvuju u ovom procesu (Zaiss i sar., 2007; Kim i sar., 2007; Kelchtermans i sar., 2009; Luo i sar., 2011). Međutim, kako bi se razjasnili mehanizmi delovanja Treg na osteoklastima posredovanu resorpciju koštanog tkiva u inflamatornoj mikrosredini neophodno je sprovesti dodatna ispitivanja.

### 1.3.3. Th17 imunski odgovor u parodontopatiji

Subpopulacije pomoćničkih T-ćelija putem svojih produkata ostvaruju različite efekte u remodelovanju koštanog tkiva i zajedno učestvuju u modulaciji i usmeravanju procesa osteoklastogeneze.

Danas se smatra da rani inflamatorni odgovor u parodontopatiji inicira aktivaciju efektorskih  $CD4^+$  T ćelija, za kojom se pretpostavlja da sledi indukcija Th17 i Treg imunskog odgovora koji mogu doprineti hroničnom stadijumu ovog oboljenja (Kobayashi i sar., 2011; Wang i sar., 2013). Međutim, neophodna su dodatna istraživanja da bi se jasnije definisala uloga Th17 i Treg ćelija u inflamaciji parodontcijuma. Poznato je da aktivirane Th1 ćelije sekretuju velike količine  $IFN-\gamma$  koji ima inhibitorno dejstvo na osteoklastogenezu i to tako što na nezrelim osteoklastima dovodi do degradacije adapterskog protein RANK receptora i tako inhibira signalizaciju pokrenutu vezivanjem RANKL za RANK. Sa druge strane, odlika Th1 imunskog odgovora je i produkcija  $TNF\alpha$ , citokina koji značajno stimuliše diferencijaciju monocita u osteoklaste delujući sinergistički sa RANKL, a takođe kao proinflamatorni citokin podstiče zapaljenski proces oštećujući vezivno i koštano tkivo (Azuma i sar., 2000). Međutim, iako inhibiraju diferencijaciju osteoklasta, Th1 ćelije doprinose napredovanju parodontopatije i to zajedno sa Th17 ćelijskom subpopulacijom sa kojom predstavljaju osnovne izvore RANKL proteina u parodontalnom zapaljenju. Th17 ćelije putem povećanja nivoa ekspresije RANKL direktno podstiču diferencijaciju osteoklasta, pri čemu je ovaj efekat posredovan IL-17 i može (Takayanagi, 2007) i ne mora biti zavisian od prisustva osteoblasta (Yago i sar., 2009). Šta više, prisustvo Th17 ćelija (Cardoso i sar., 2009), kao i prisustvo IL-17, u parodontalnim lezijama i serumu i sulkusnoj tečnosti gingive pacijenata obolelih od parodontopatije (Takahashi i sar., 2005; Shaker i Ghallab, 2012; Schenkein i sar., 2010; Vernal i sar., 2005), dodatno



ukazuje na činjenicu da su ove ćelije direktno uključene u imunski odgovor organizma u ovom oboljenju. Nezavisno od dejstva IL-17, sposobnost Th17 ćelija da produkuju IL-6 i regulišu produkciju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  može imati za posledicu povećanje ekspresije MMP i RANKL, odnosno stimulaciju osteoklastogeneze, iako je ekspresija MMP pod dejstvom IL-17 znatno manja u odnosu na ekspresiju koja se uspostavlja tokom urođenog imunskog odgovora (*Beklen i sar., 2007*). Imajući u vidu ove nalaze, smatra se da Th17 ćelije promovišu razvoj parodontopatije aktiviranjem susednih ćelija i produkcijom inflamatornih medijatora, stvarajući na taj način povoljne uslove za amplifikaciju inflamatorne reakcije i stimulaciju osteoklastogeneze što vodi resorpciji koštanog tkiva i pogoršanju same bolesti (*Adamopoulos i Bowman, 2008*). S druge strane, protektivna uloga IL-17 u parodontopatiji posredovana regrutovanjem neutrofila ka mestu inflamacije u gingivalnom tkivu do sada je pokazana na životinjskim modelima (*Cheng i sar., 2014*). Ovi rezultati ukazuju da su biološki efekti IL-17 kompleksni i da zavise od mikrosredine u kojoj deluje, te im je teško pridati samo protektivnu ili destruktivnu funkciju u parodontopatiji (*Yu i sar., 2007; Eskin i sar., 2011; Settem i sar., 2013*).

## 2. CILJEVI





Zahvaljujući jedinstvenim karakteristikama, kao i višestrukoj ulozi adultnih mezenhimskih matičnih ćelija (MMC) u regeneraciji tkiva, imunomodulaciji i regulaciji hematopoeze, tokom poslednjih decenija ostvareni su značajni rezultati na polju istraživanja biologije i terapijske primene ovih ćelija. Ipak, ova oblast je suočena sa brojnim izazovima poput identifikacije i karakterizacije MMC, kao i kontrole njihovih funkcija, što ih istovremeno čini izuzetno zanimljivim za istraživanje, ali još uvek ne i bezbednim za kliničku primenu. Uprkos obećavajućim nalazima, uloga MMC na polju regeneracije tkiva i organa nije u potpunosti razjašnjena.

Parodontopatija predstavlja hronično inflamatorno oboljenje parodontijuma, potpornog tkiva zuba, uzrokovano bakterijama zubnog plaka, u kojem uloga lokalne mikrosredine predstavlja jedan od ključnih faktora u kontekstu odgovora organizma na perzistentnu infekciju. U okviru lokalne mikrosredine parodontijuma nalaze se i MMC periodoncijuma (PD-MMC) na čiji regenerativni potencijal su ukazala istraživanja u kojima je pokazana sposobnost samoobnove i multipotentne diferencijacije ovih ćelija, kao i njihov potencijal da formiraju tkiva slična potpornom tkivu zuba, uključujući periodoncijum i cement (*Seo i sar., 2004; Racz i sar., 2014*).

U osnovi razvoja hronične parodontopatije nalazi se veliki broj faktora čiji se štetni efekti tokom vremena amplifikuju, što pogoršava stanje obolelog tkiva. Iako je jasno da imunski sistem direktno kontroliše remodelovanje koštanog tkiva, efekat je dvosmeran, odnosno potvrđeno je da osteoblasti i osteoklasti recipročno regulišu imunski odgovor, a poznavanjem ovih interakcija mogu se uspostaviti jedinstvene strategije u cilju kontrole procesa inflamacije i degradacije koštanog tkiva u različitim oboljenjima. U okviru stečenog imunskog odgovora, Th17 ćelije se smatraju značajnim regulatorima tkivnog razaranja u toku zapaljenskih procesa, važnim za razvoj hroničnih inflamatornih oboljenja što čini ove ćelije i njihov karakteristični citokin IL-17, glavnom metom tretmana u terapiji ovih oboljenja. IL-17 je jedan od važnih faktora mikrosredine parodontijuma u parodontopatiji, s obzirom na pokazano prisustvo Th17 ćelijske populacije kao najznačajnijeg izvora IL-17 u oštećenom tkivu parodontijuma (*Cardoso i sar., 2009; Cheng i sar., 2014*). Pokazano je da Th17 ćelije direktno podstiču diferencijaciju osteoklasta, pri čemu je ovaj efekat posredovan IL-17. Kao proinflamatorni citokin, IL-17 ima značajan uticaj u parodontopatiji, jer, kao i u

mnogim oboljenjima ovog tipa, stimuliše proces privlačenja neutrofila na mesto inflamacije što doprinosi napredovanju zapaljenja (*Gaffen i sar., 2008*). Pored toga, naša i istraživanja drugih autora, ukazala su na sposobnost IL-17 da reguliše proliferaciju i diferencijaciju pojedinih tipova MMC čoveka i miša (*Mojsilović i sar., 2015*), pri čemu je pokazano da se njegovi efekti na ove ćelije razlikuju zavisno od vrste domaćina i tkivnog porekla MMC. Ipak, uprkos opsežnim istraživanjima poslednjih godina, biološki efekti, mehanizmi i značaj delovanja IL-17 kao proinflamatornog citokina na funkcionalne osobine PD-MMC još uvek nisu dovoljno istraženi.

Imajući u vidu iznete činjenice, a radi dobijanja podataka koji doprinose razjašnjavanju uticaja IL-17 na osobine PD-MMC bitne za regulaciju njihovog regenerativnog i imunomodulatornog potencijala, postavljeni su sledeći:

#### **Ciljevi istraživanja:**

- 1) Izolacija i karakterizacija MMC iz tkiva periodoncijuma zdravih osoba.
- 2) Ispitivanje uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva, uključujući proliferaciju, klonogeni kapacitet, migraciju i osteogenu diferencijaciju PD-MMC.
- 3) Ispitivanje uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na ekspresiju enzimski aktivnih matriksnih metaloproteinaza i urokinaze u PD-MMC.
- 4) Ispitivanje uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMC.

Kako bi se postigli navedeni ciljevi, istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom su se odvijala u sledećim pravcima:

#### **Izolacija i karakterizacija PD-MMC:**

- Prema kriterijumima Komiteta za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*) karakterizacija PD-MMC izolovanih iz zdravih osoba izvedena je ispitivanjem sledećih karakteristika:
  - sposobnosti adhezije PD-MMC za plastiku,
  - ekspresije markera mezenhimskih ćelija i odsustva ekspresije markera hematopoetskih ćelija,

- sposobnosti PD-MMĆ da se diferenciraju u tri ćelijske loze (osteogenu, adipogenu i hondrogenu) nakon kultivacije u odgovarajućim diferencijacionim medijumima;
- Dodatno je analizirana ekspresija markera embrionalnih MĆ u PD-MMĆ.

#### **Ispitivanje uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ.**

- Određivanjem delovanja IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ,
- Određivanjem delovanja IL-17 na klonogeni kapacitet PD-MMĆ,
- Analizom delovanja IL-17 na migraciju PD-MMĆ,
- Analizom delovanja IL-17 na osteogenu diferencijaciju i ekspresiju gena za markere osteogeneze (ALP, Ocn, RUNX2/Cbfa1) u PD-MMĆ kultivisanim u osteogenom diferencijacionom medijumu,
- Analizom efekata IL-17 na aktivaciju MAPK signalnih puteva u PD-MMĆ,
- Analizom učešća MAPK signalnih puteva u delovanju IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ primenom odgovarajućih farmakoloških inhibitora.

#### **Ispitivanje uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na ekspresiju enzimski aktivnih matriksnih metaloproteinaza i urokinaze u PD-MMĆ.**

- Određivanjem efekata IL-17 na enzimsku aktivnost, kao i ekspresiju proteina i gena za matriksne metaloproteinaze i urokinazu u PD-MMĆ,
- Analizom učešća MAPK signalnih puteva u delovanju IL-17 na ekspresiju matriksnih metaloproteinaza i urokinaze u PD-MMĆ primenom odgovarajućih farmakoloških inhibitora.

#### **Ispitivanje uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMĆ.**

- Određivanjem delovanja IL-17 na potencijal PD-MMĆ da modulišu spontanu i mitogenom-stimulisanu proliferaciju T limfocita periferne krvi,
- Određivanjem delovanja IL-17 na gensku ekspresiju molekula povezanih sa imunomodulatornim delovanjem PD-MMĆ, uključujući HLA-A, HLA-DR, HLA-G5, IL-6 iIDO-1.

# 3. MATERIJAL I METODE





### 3.1. MATERIJAL

Ćelije su kultivisane u standardnom medijumu za kultivaciju koji se sastojao iz: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle' Medium*, Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, SAD) sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS, *Fetal Bovine Serum*, Capricorn Scientific, Germany), 100 U/ml penicilina (Capricorn Scientific) i 100 U/ml streptomicina (Capricorn Scientific) i 10mM Hepes-om (Sigma-Aldrich).

Ćelije su ispirane u izotoničnom rastvoru fosfatnog pufera za ćelijske kulture (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, PAA Laboratories).

Pufer za lizu eritrocita pH 7,2-7,4 sastojao se iz 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  i 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  u PBS-u.

Pufer za lizu ćelija u cilju izolacije membranskih i citosolnih proteina (RIPA, *Radioimmunoprecipitation buffer*) sastojao se iz 1% NP-40, 0.1% SDS, NaCl 150 mM, 1mM EDTA (od engl. *etylenediaminetetraacetic acid*), 50 mM NaF, i 1% natrijum deoksiholata u PBS-u.

Za analizu ekspresije proteina korišćen je alkalni rastvor puferovan Trisom (TBS, *Tris Buffered Saline*, Serva, Nemačka).

Podaci o korišćenim antitelima, citokinima i ostalim reagensima nalaze se u **Tabelama 1, 2 i 3.**



**Tabela 1. Podaci o korišćenim antitelima.** PE-fikoeritrin (*phycoerithrin*), FITC-fluorescein izotiocijanat. Primena: protočna citometrija (FlowCy - *Flow cytometry*), imunofluorescentno obeležavanje (IF), Western blot (WB).

<b>Primarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Primena</b>
anti-humano CD45-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD11b-konjugovano FITC	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD105-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano Glycophorin/CD235a-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD90-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD34-/R-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano HLA-DR-konjugovano FITC	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD44-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti-humano CD73-konjugovano PE	miš	R&D Systems, SAD	FlowCy
anti CD29-konjugovano PE	miš	Invitrogen, SAD	FlowCy
anti CD3-konjugovano PE	miš	Thermo Scientific, SAD	FlowCy
anti IL-17R	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	IF
anti pERK1,2	zec	R&D systems, SAD	WB
anti ERK1,2	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	WB
anti pp38	zec	R&D systems, SAD	WB
anti p38	zec	R&D systems, SAD	WB
anti pJNK	zec	R&D systems, SAD	WB
anti JNK	zec	R&D systems, SAD	WB
anti uPA	zec	RnD Systems, SAD	WB
anti MMP2 (MMP2/8B4)	miš	Pierce, SAD	WB
anti Nanog	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FlowCy, IF
anti SSEA4	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FlowCy, IF
anti Sox-2	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FlowCy, IF
anti Oct-4	zec	Cell Signaling Technology, SAD	FlowCy, IF
anti $\alpha$ Tubulin	miš	Pierce, SAD	WB



**Tabela 2. Podaci o korišćenim sekundarnim antitelima i izotipskim kontrolama.**  
HRP- peroksidaza rena (*Horse Raddish Peroxidase*), TRITC-tetrametilrodamin-5-(6)-  
izotiocijanat.

<b>Sekundarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Primena</b>
anti-zečje-konjugovano HRP	koza	RnD Systems, SAD	WB
anti-mišje-konjugovano HRP	koza	Sigma-Aldrich, SAD	WB
anti-mišje-konjugovano TRITC	koza	Sigma-Aldrich, SAD	IF
anti-zečje-konjugovano FITC	koza	Sigma-Aldrich, SAD	IF , FlowCy
anti-mišje-konjugovano FITC	koza	BD Biosciences	FlowCy
<b>Izotipske kontrole</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Primena</b>
IgG1-konjugovano PE	miš	Invitrogen, SAD	FlowCy
IgG1-konjugovano FITC	miš	Invitrogen, SAD	FlowCy
IgG2A-konjugovano PE	miš	RnD Systems, SAD	FlowCy

**Tabela 3. Podaci o korišćenim reagensima.**

<b>Reagensi</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Dejstvo</b>
humani rekombinantni IL-17	RnD Systems, SAD	citokin
SB203580	Tocris Bioscience, SAD	inhibitor p38
PD98059	Tocris Bioscience, SAD	inhibitor MEK1,2/ERK1,2
SP600125	Tocris Bioscience, SAD	inhibitor JNK
Mitomycin C	Applichem, Nemačka	citostatik
Fitohemaglutinin (PHA)	INEP, Srbija	mitogen
Anizomicin	Sigma-Aldrich, SAD	aktivator p38 i JNK MAPK

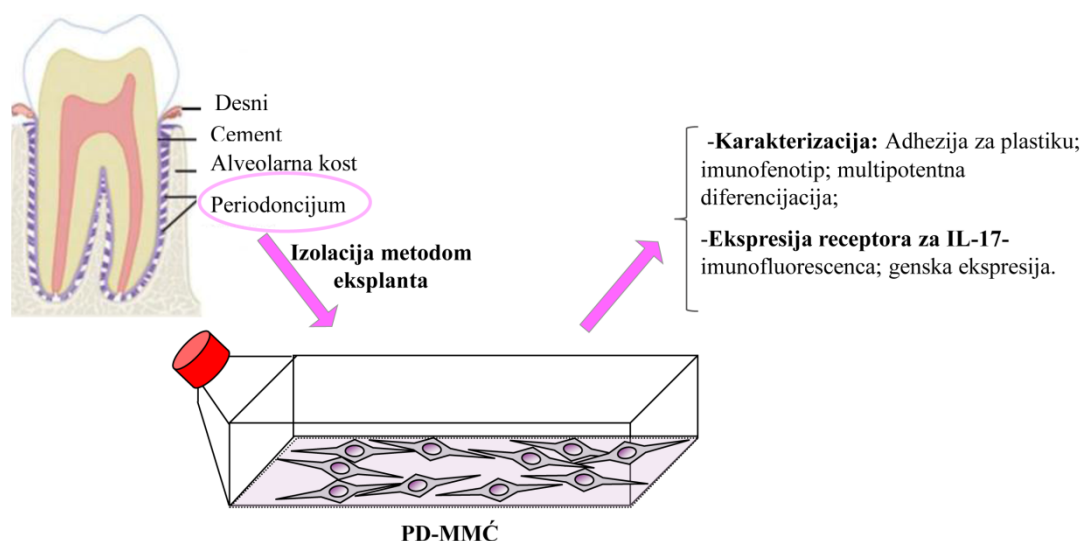


## 3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA

### 3.2.1. Izolacija i karakterizacija PD-MMĆ

Prvi korak istraživanja nakon izolacije PD-MMĆ zdravih donora bila je njihova karakterizacija na osnovu kriterijuma preporučenih od strane Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*) koji podrazumevaju utvrđivanje: sposobnosti adhezije za plastiku, imunofenotipa i potencijala za diferencijaciju (**Slika 10**). Metodom protočne citometrije praćen je nivo ekspresije površinskih markera karakterističnih za mezenhimske matične ćelije: CD44H, CD90, CD105, CD73 i CD29, kao i nivo ekspresije hematopoetskih površinskih markera kao što su: CD34, CD45, CD235a, CD11b i HLA-DR. Ovom metodom, kao i metodom indirektnog imunofluorescentnog bojenja, analiziran je i nivo ekspresije markera embrionalnih matičnih ćelija, uključujući transkripcione faktore Nanog, Oct-4 i Sox-2, kao i membranski antigen specifičan za embrionalne ćelije SSEA4. Ispitivanje multipotentnog potencijala diferencijacije je vršeno indukcijom osteogene, hondrogene i adipogene diferencijacije.

Da bismo utvrdili da li IL-17 deluje na funkcionalna svojstva PD-MMĆ prvo je potvrđena ekspresija receptora za IL-17 u ovim ćelijama na proteinskom i genskom nivou.



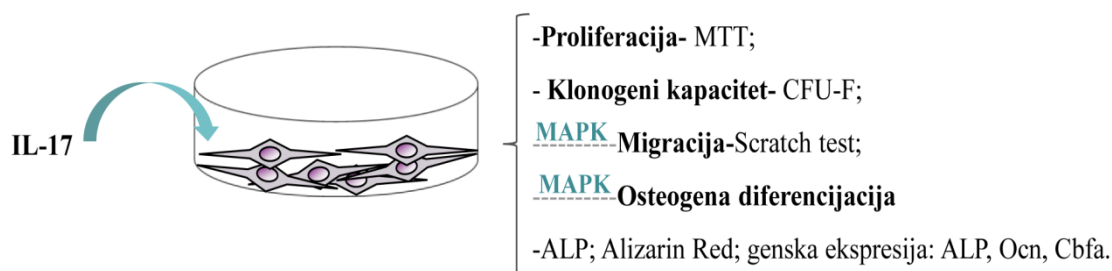
**Slika 10. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za izolaciju i karakterizaciju PD-MMĆ.**





### 3.2.2. Ispitivanje uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ

Da bi se ispitao uticaj IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ analiziran je efekat rastućih koncentracija IL-17 (0, 50 i 100 ng/ml) nakon odgovarajućih termina inkubacije na različite funkcije PD-MMĆ, uključujući njihovu proliferaciju, klonogeni potencijal, migraciju i osteogenu diferencijaciju (**Slika 11**). Uticaj IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ ispitivan je MTT testom, na klonogeni kapacitet pomoću CFU-F testa, a na migraciju *scratch* esejom. U cilju indukovanja osteogene diferencijacije, PD-MMĆ su kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju 7 i 21 dana u odsustvu ili prisustvu IL-17, nakon čega je praćena aktivnost alkalne fosfataze (ALP), kao i deponovanje kalcijuma. Takođe je nakon 7 dana inkubacije analizirana ekspresija gena karakterističnih za osteogenu diferencijaciju, poput ALP, Osteokalcina (Ocn) i Runx2/Cbfa1. U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama delovanja IL-17, Western blot analizom je ispitivana aktivacija p38, ERK1,2 i JNK MAPK signalnih puteva u PD-MMĆ tretiranim sa IL-17. Pored toga, za ispitivanje mehanizama delovanja IL-17 na migraciju i osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ korišćeni su inhibitori MAPK signalnih puteva: za p38 (SB203580), za ERK1,2 (PD98059) i za JNK (SP600125).



**Slika 11. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ.**



### 3.2.3. Ispitivanje uticaja IL-17 na ekspresiju MMP i uPA u PD-MMĆ

U cilju ispitivanja uloge IL-17 u remodeliranju ECM tkiva periodoncijuma metodom zimografije je analizirana enzimaska aktivnost MMP i uPA 24h nakon tretmana PD-MMĆ različitim koncentracijama IL-17 (0, 50 i 100 ng/ml) (Slika 12). Ekspresija MMP i uPA proteina u ovim ćelijama određena je Western blot analizom, dok je ekspresija gena za ove molekule analizirana RT-PCR metodom. Dodatno je metodom RT-PCR ispitan efekat IL-17 na ekspresiju gena za membranski tip MMP, MT1-MMP, kao i gena za inhibitor uPA, PAI-1, u PD-MMĆ. U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama delovanja IL-17 na ekspresiju MMP i uPA u PD-MMĆ korišćeni su inhibitori za p38 (SB203580) i ERK1,2 MAPK signalizaciju (PD98059).



**Slika 12. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje uticaja IL-17 na ekspresiju enzima koji učestvuju u remodelovanju ECM.**

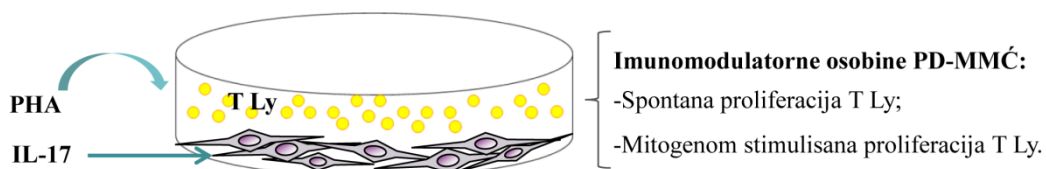
### 3.2.4. Ispitivanje uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMĆ

Kako bi se ispitaio uticaj IL-17 na imunomodulatorna svojstva PD-MMĆ, ćelije su tokom 3 dana inkubirane sa različitim koncentracijama IL-17 (0, 50 i 100 ng/ml) nakon čega su kultivisane u direktnom kontaktu sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNC) zdravih donora u odsustvu ili prisustvu mitogena fitohemaglutinina (PHA, *phytohemagglutinin*) kao stimulatora proliferacije (Slika 12). Step en proliferacije T limfocita (T Ly) u populaciji ukupnih MNC određen je upotrebom 5(6)-karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estera (CFSE, *5-6-carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester*), kao i anti-CD3 antitela za obeležavanje T limfocita, i merenjem fluorescence na protočnom citometru.

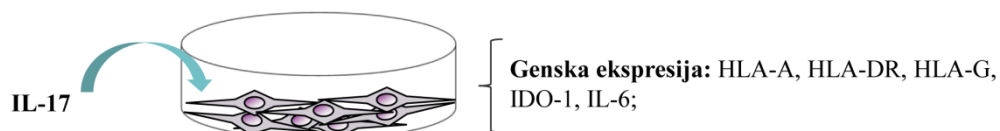


Pored toga, u cilju utvrđivanja mehanizama delovanja IL-17 na imunomodulatorni potencijal PD-MMC metodom RT-PCR analiziran je uticaj IL-17 na ekspresiju gena (na nivou iRNK) za imunomodulatorne molekule (HLA-DR, HLA-A, HLA-G,IDO-1, IL-6) 24h nakon tretiranja PD-MMC različitim koncentracijama IL-17 (0, 50 i 100 ng/ml).

1. Uticaj PD-MMC na proliferaciju T Ly periferne krvi u kokulturi



2. Ekspresija gena za imunomodulatorne molekule



**Slika 13. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje uticaja IL-17 na imunomodulatorna svojstva PD-MMC.**



## ĆELIJSKE KULTURE

### 3.3.1. Izolacija PD-MMĆ

Nakon dobijanja saglasnosti Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, uz pismeni pristanak četiri odrasla zdrava pacijenta Odeljenja oralne hirurgije Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kojima su umnjaci uklonjeni iz ortodontskih razloga, uzorci tkiva periodoncijuma su pažljivo odstranjeni sa površine korena zuba. PD-MMĆ su iz tkiva periodoncijuma izolovane metodom tkivnog eksplanta. Tkivo periodoncijuma je usitnjeno na komade površine 2-3 mm<sup>2</sup> koji su zasejani u flask površine 25cm<sup>2</sup> sa standardnim medijumom za kultivaciju ćelija. Ova primarna ćelijska kultura je inkubirana na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Medijum je menjan svaka 2-3 dana i tom prilikom su uklanjane neadherentne ćelije, a PD-MMĆ su izdvajane na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku. Nakon dostizanja stadijuma subkonfluentnosti (oko 80% flaska je bilo prekriveno ćelijama), ćelije su ispirane PBS-om i odlepljivane pomoću 0,25% tripsina u 1mM EDTA (etilendiaminotetraacetat) (PAA Laboratories) na 37°C u toku 10 min. Ove ćelije su označene kao nulta pasaža (P0), dok su kasnije pasaže redno imenovane. Nakon određivanja broja vijabilnih ćelija korišćenjem 0.4% rastvora tripan plavog (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) ćelije su ponovo zasejavane u standardnom medijumu u koncentraciji 1x10<sup>4</sup> ćelija/cm<sup>2</sup> za sledeću pasažu. Za sve eksperimente su korišćene ćelije od 2. do 6. pasaže i svi eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

### 3.3.2. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije su izolovane iz periferne krvi dobrovoljnih zdravih davalaca, uz potpisan informisani pristanak. Puna krv je razblažena u odnosu 1:1 sa RPMI-1640 medijumom (Sigma-Aldrich), nakon čega je naneta na gradijent za izolovanje mononuklearnih ćelija gustine 1,077 g/ml (*Lymphocyte Separation Medium 1077*, PAA Laboratories). Nakon centrifugiranja 30 minuta na 400 × g na sobnoj temperaturi bez kočnice MNĆ su pažljivo sakupljane iz interfaznog sloja i isprane od gradijenta centrifugiranjem 10 minuta na 800 × g. Nakon dva ispiranja ćelije su resuspendovane u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija, a njihova koncentracija je određena brojanjem u Türk rastvoru (NRK, Srbija).



## ISPITIVANJE ĆELIJSKIH FUNKCIJA

### 3.4.1. Analiza proliferativnog potencijala PD-MMĆ

Stepen proliferacije PD-MMĆ analiziran je MTT testom. Ćelije zasejane u standardnom medijumu u koncentraciji  $5 \times 10^3$  ćelija/otvoru ploče sa 96 otvora inkubirane su bez ili sa IL-17 (50 ili 100 ng/ml) 24, 48, 72 i 96 h u standardnim uslovima kultivacije. Nakon odgovarajućih inkubacija u eksperimentalne uzorke je dodavan reagens MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 0,5 mg/ml. Po isteku 2-3 h inkubacije na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%, formirani tamni kristali formazana su rastvarani u dimetilsulfoksidu (DMSO) ili alternativno, dodavanjem 10% SDS u 0,01 N HCl, nakon čega je očitavana apsorbance na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Labsystem Multiskan PLUS).

### 3.4.2. Analiza klonogenog potencijala PD-MMĆ

Klonogeni kapacitet PD-MMĆ je ispitivan pomoću CFU-F (*colony forming unit fibroblast*) testa tako što su ćelije zasejavane u koncentraciji od 500 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u standardnom medijumu i inkubirane bez ili sa IL-17 (50 ili 100 ng/ml) u duplikatu tokom 14 dana na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 100% vlažnosti. Nakon inkubacije, ćelije su ispirane PBS-om, fiksirane 5 minuta hladnim metanolom i bojene 0,3% kristal-violet bojom 15 minuta, a potom ispirane destilovanom vodom. Prilikom brojanja kolonija pod inverznim mikroskopom, jednom kolonijom je podrazumevana grupacija od 50 i više ćelija.

### 3.4.3. Analiza ćelijske migracije PD-MMĆ

Sposobnost migracije ćelija ispitivana je *in vitro Scratch* testom. Ćelije su zasejavane u ploče sa 24 otvora u standardnom medijumu i inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Po dostizanju konfluentnosti, vrhom nastavka pipete



je povučena ravna linija u vidu ogrebotine po sredini otvora kako bi se napravio prostor bez ćelija. Potom su ćelije ispirane PBS-om i inkubirane narednih 24h sa rastućim koncentracijama IL-17 (0, 50, 100 ng/ml). Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane hladnim metanolom i bojene 0,3% kristal-violet bojom. Procenat ćelija koje su migrirale u polje ogrebotine analiziran je na svetlosnom mikroskopu i kvantifikovan korišćenjem Tscratch programa (Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich, Švajcarska).

#### **3.4.4. Diferencijacija ćelija**

Kapacitet za diferencijaciju PD-MMĆ je određivan nakon zasejavanja ćelija u ploče sa 24 otvora u koncentraciji od  $10 \times 10^3$  po otvoru i kultivacije u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija na  $37^\circ\text{C}$  u atmosferi sa  $5\% \text{CO}_2$  i relativnom vlažnošću 100%. Nakon dostizanja subkonfluentnosti standardni medijum je zamenjivan specifičnim medijumima za indukciju diferencijacije MMĆ u smeru ćelija adipogene, hondrogene i osteogene loze. Ćelije kultivisane samo u standardnom medijumu su predstavljale kontrolu.

##### **3.4.4.1. Adipogena diferencijacija PD-MMĆ**

U cilju indukovanja adipogene diferencijacije ćelije su nakon dostizanja subkonfluentnosti inkubirane u adipogenom medijumu koji se sastojao od standardnog medijuma za kultivaciju ćelija sa dodatkom  $100 \mu\text{g/ml}$  izobutil-metilksantina (IBMX, Sigma-Aldrich),  $1 \mu\text{M}$  deksametazona i  $10 \mu\text{g/ml}$  insulina (Actrapid, Novonordisc, Bagsvaerd, Danska). PD-MMĆ su kultivisane u ovom medijumu tokom 3 nedelje na  $37^\circ\text{C}$  u atmosferi sa  $5\% \text{CO}_2$  i relativnom vlažnošću 100%, uz zamenu medijuma na svaka 3 dana. Adipogena diferencijacija je potvrđivana prisustvom unutarćelijskih lipidnih kapljica nakon bojenja ćelija *Oil Red O* bojom (Merck, Darmstadt, Nemačka) analizom na svetlosnom mikroskopu.



#### 3.4.4.2. Hondrogena diferencijacija PD-MMĆ

Indukcija hondrogene diferencijacije je postizana kultivacijom PD-MMĆ u hondrogenom medijumu koji se sastojao od standardnog medijuma za kultivaciju ćelija sa dodatkom 5 ng/ml TGF- $\beta$  (RnD), 200  $\mu$ M fosfata askorbinske kiseline i 10 nM deksametazona. Medijum je zamenjivan na svaka 3 dana tokom inkubacije koja je trajala 21 dan na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Nakon inkubacije, hondrogena diferencijacija je potvrđena na osnovu stepena obojenosti glikozaminoglikana *Safranin O* bojom (Merck, Darmstadt, Nemačka) analizom na svetlosnom mikroskopu.

#### 3.4.4.3. Osteogena diferencijacija PD-MMĆ

Kako bi bila indukovana osteogena diferencijacija, PD-MMĆ su inkubirane u osteogenom medijumu koji se sastojao od standardnog medijuma za kultivaciju ćelija obogaćenog sa 10 nM deksametazona (Applichem), 200  $\mu$ M fosfata askorbinske kiseline (Galenika, Srbija) i 10 mM  $\beta$ -glicerofosfata (Sigma-Aldrich). Ćelije su inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%, uz zamenu medijuma svaki treći dan. Nakon 7 dana inkubacije, u svrhu analize osteogene diferencijacije, detektovana je aktivnost alkalne fosfataze (ALP). Ćelije su fiksirane formalin/etanolom (1:9) u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi, a potom im je dodavan hromogen za alkalnu fosfatazu, BCIP/NBT (5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat/nitro plavi tetrazolijum) (Sigma-Aldrich). Reakcija je zaustavljena sa 10 mM NaF u PBS-u, a aktivnost alkalne fosfataze u ćelijama analizirana je na svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Nemačka). Pored toga, osteogena diferencijacija je potvrđena i nakon 21. dana inkubacije u osteogenom medijumu, analizom depozita kalcijuma i ekstraćelijske mineralizacije bojenjem *Alizarin Red* bojom (Riedel de Haen, Hanover, Germany). Ćelije su fotografisane svetlosnim mikroskopom, a jačina vizuelizovane boje je određivana denzitometrijskom analizom pomoću programa NIH-Image J software.



### 3.4.5. Analiza uticaja PD-MMĆ na proliferaciju monuklearnih ćelija periferne krvi

Uticaj PD-MMĆ na mitogenom indukovanu proliferaciju alogenih MNC je ispitivan korišćenjem inkorporacije CFSE u žive ćelije. Ova boja nakon pasivne difuzije u ćeliju i delovanja intracelularnih esteraza daje fluorescentni karboksifluorescein sukcinimidil estar koji reaguje sa intracelularnim aminima i formira fluorescentne konjugate koji ostaju u ćeliji. Analiza ćelijske proliferacije upotrebom ove boje se zasniva na smanjenju intenziteta fluorescence nakon svake ćelijske deobe zbog jednake distribucije boje na ćerke ćelije. Da bi se ispitaio uticaj PD-MMĆ na proliferaciju MNC periferne krvi najpre su PD-MMĆ zasejane u koncentraciji od  $5 \times 10^4$  po otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija i inkubirane tokom 72 h bez ili sa IL-17 (50 i 100ng/ml) na 37 °C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Nakon inkubacije, PD-MMĆ ćelije su inaktivisane mitomicinom C (25 µg/ml) (Applichem) 30 minuta na 37 °C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Za obeležavanje MNC sa CFSE je korišćeno  $10 \times 10^6$  ćelija koje su resuspendovane u 4ml PBS-a i inkubirane sa CFSE (5 µM) tokom 10 minuta na temperaturi 37 °C u mraku. Reakcija je prekidana dodavanjem 4 puta veće zapremine ledeno hladnog PBS-a i inkubiranjem 5 minuta na hladnom. Ovako obeležene MNC ( $5 \times 10^5$  ćelija/otvoru) dodavane su na PD-MMĆ u svežem standardnom medijumu sa ili bez PHA (2.5µg/ml) (INEP, Zemun, Srbija). Nakon pet dana ko-kultivacije ćelije su prebacivane u epruvete i istaložene centrifugiranjem. Istaložene ćelije su isprane dva puta u PBS-u sa 0.5% BSA i direktno bojene anti-CD3 antitelom konjugovanim PE. Nivo proliferacije MNC, odnosno CD3+ T limfocita, analiziran je pomoću protočnog citometra CyFlow CL (Partec, Munster, Germany) na osnovu nivoa CFSE fluorescence. Ćelije koje imaju niži intenzitet fluorescence odgovaraju ćelijama koje su proliferisale, dok ćelije koje imaju visok intenzitet fluorescence odgovaraju ćelijama koje nisu proliferisale. Za izračunavanje indeksa deobe korišćen je protokol za analizu proliferacije ćelija (*Parish i Warren, 2002*). Indeks deobe predstavlja prosečan broj deoba svih ćelija iz početne populacije. Za određivanje nespecifične fluorescence su korišćene neobeležene MNC.





## 3.5. ANALIZA ĆELIJSKIH PROTEINA

### 3.5.1. Imunofluorescentno obeležavanje ćelija

Kako bi se imunofenotipski okarakterisale izolovane ćelije analizirana je ekspresija karakterističnih markera MMĆ upotrebom testova direktne i indirektno fluorescencije, a rezultati su očitavani metodom protočne citometrije, kao i na fluorescentnom mikroskopu.

#### 3.5.1.1. Protočna citometrija

Ćelije su zasejavane u ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u koncentraciji  $3 \times 10^4$ /otvoru i inkubirane u standardnom medijumu na  $37^\circ\text{C}$  u atmosferi sa 5%  $\text{CO}_2$  i relativnom vlažnošću od 100%. Nakon dostizanja konfluentnosti ćelije su odlepljivane sa 1mM EDTA i ispirane hladnim PBS-om sa 0,5% BSA. Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela izvršeno je inkubacijom ćelija u PBS-0,5% BSA tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za analizu ekspresije površinskih markera PD-MMĆ izdvojeni su alikvoti od po  $2 \times 10^5$  ćelija koje su obeležavane primarnim monoklonskim mišjim anti-humanim antitelima za CD44H, CD90, CD105, CD73, CD29, CD34, CD45, CD235a, HLA-DR, CD11b i SSEA4 konjugovanim fluorescentnim markerima PE ili FITC (**Tabela 1**) 30 minuta u mraku, a kao izotipske kontrole korišćena su antitela prikazana u **Tabeli 2**.

Za analizu ekspresije endogenih proteina, specifičnih markera embrionalnih matičnih ćelija, PD-MMĆ su nakon odlepljivanja fiksirane formaldehidom i permeabilizovane inkubacijom u 90% metanolu na ledu tokom 30 minuta. Ćelije su podeljene u alikvote od po  $1 \times 10^5$  ćelija i nakon blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela inkubacijom u PBS-0,5% BSA obeležavane primarnim antitelima za Nanog i SOX2 (**Tabela 1.**) tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, višak antitela ispiran je dva puta sa PBS-BSA 0,5%, a ćelije su dalje inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim FITC (**Tabela 2.**). Izotipske kontrole su korišćene da bi se odredio nivo nespecifičnog vezivanja antitela (**Tabela 2.**). Nakon inkubacije sa odgovarajućim antitelima ćelije su isprane sa PBS-0,5% BSA (od engl.



*Bovine Serum Albumin*) i resuspendovane u 1 ml PBS-a. Rezultati su očitavani na CytoFlow CL (Partec, Münster, Nemačka).

### **3.5.1.2. Indirektna imunofluorescenca**

Za imunofluorescentno obeležavanje PD-MMĆ su zasejavane na staklene ljuspice u koncentraciji od  $5 \times 10^4$  i kultivisane pri standardnim uslovima kultivacije preko noći kako bi adherirale za podlogu. Nakon inkubacije, PD-MMĆ su ispirane sa PBS-om i fiksirane 4% paraformaldehidom. Za detekciju unutarćelijskih proteina, embrionalnih marker antigena (Nanog, Oct4 i Sox2), PD-MMĆ su permeabilizovane sa 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) u PBS-u tokom 5 minuta. Kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela, uzorci su inkubirani 30 minuta sa rastvorom 1% BSA u PBS-u. Nakon toga, ćelije su inkubirane 1 h sa odgovarajućim primarnim antitelima za IL-17R, SSEA-4, Nanog, Oct-4 i Sox2 (**Tabela 1.**), a zatim sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (**Tabela 2.**) konjugovanim fluorescentnom bojom tokom 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Ćelijska jedra su obojena sa 1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich) boje. Nakon bojenja, ljuspice su ispirane sa PBS-om i destilovanom vodom i prenete na predmetna stakla na koja je prethodno nanet DPX medijum za montiranje. PD-MMĆ su analizirane i fotografisane pomoću imunofluorescentnog mikroskopa (Olympus).

### **3.5.2. Western blot analiza**

#### **3.5.2.1. Izolacija membranskih i citosolnih proteina**

Za izolaciju ćelijskih proteina PD-MMĆ su zasejavane u ploče sa 6 otvora u standardnom medijumu i kultivisane pri standardnim uslovima kultivacije do dostizanja subkonfluentnosti. Nakon odgovarajućih eksperimentalnih tretmana PD-MMĆ izolovani su citosolni i membranski-vezani proteini primenom pufera za lizu ćelija (RIPA pufer) koji se sastojao od 0.5% TritonX, 1% NP-40, 0.1% SDS, NaCl 150 mM, 1mM EDTA, 50 mM NaF, i 1% natrijum deoksiholata u PBS-u. Puferu su neposredno



pre liziranja PD-MMĆ dodavani inhibitori fosfataza i proteaza: Na-ortovanadat (200 mM), koktel inhibitora proteaza (Fermentas, SAD), PMSF (100 mM) i E-ACA (1 M) po mililitru pufera. Nakon 30 minuta inkubacije u 200 µl pufera za liziranje na ledu uz povremeno mešanje ćelijski lizati su sakupljeni i centrifugirani 15 minuta na 10000 x g na temperaturi od 4°C. Lizati (supernatanti) su čuvani na -20°C do upotrebe. Koncentracija proteina u ćelijskim lizatima je određivana upotrebom komercijalnog BCA testa (Serva Electrophoresis, Nemačka).

### 3.5.2.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Ćelijski lizati (po 15 µg proteina) su pomešani sa puferom za pripremu uzoraka (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerola, 0,2 M DTT, 0,02% bromfenol plavo, pH 6,8) u jednakim količinama, i prokuvani 5 minuta u ključaloj vodi. Nakon kuvanja uzorci su nanošeni na 4% akrilamidni gel za nanošenje i 10% gel za razdvajanje debljine 1,5 mm i razdvajani Na-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) u redukujućim uslovima pri konstantnoj struji od 150 mA tokom 2 h. Nakon toga, polusuvim elektrotransferom pri struji jačine 100 mA u toku 1 h i 30 min, razdvojeni proteini na gelovima su prenošeni na nitroceluloznu membranu čija je veličina pore 0,45 µm (Applichem).

### 3.5.2.3 Imunoblot

Nakon transfera, membrane su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa 3% BSA u 0,5% rastvoru Tween-20 (Sigma-Aldrich) u TBS-u (TBS-Tween) kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje proteina za membranu. Potom su membrane inkubirane sa odgovarajućim razblaženjima primarnog antitela u 1% BSA u TBS-Tween-u preko noći na 4°C. Nakon ispiranja TBS-Tween-om membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom konjugovanim enzimom HRP u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Ponovno ispiranje membrana je izvršeno rastvorom TBS-Tween dva puta u trajanju od 10 minuta, a na kraju samo sa TBS-om u trajanju od 5 minuta.



#### 3.5.2.4. Detekcija proteinskih traka

Detekcija antitelima obeleženih proteina je izvršena pomoću reagensa za hemiluminiscenciju koji sadrži supstrat enzima peroksidaze - luminol (Serva Electrophoresis, GmbH). Vizuelizacija proteinskih traka je analizirana na autoradiografskom filmu (Santa Cruz Biotechnology), a molekulska masa detektovanih proteina određivana je upoređivanjem sa proteinskim markerom (Page Ruler plus Prestained Protein Ladder, Pierce). Densitometrija proteinskih traka je izvršena uz pomoć programa Total Lab v1.1 software (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska).

#### 3.5.3. Analiza aktivnosti proteinaza metodom zimografije

Za ispitivanje aktivnosti enzima odgovornih za razgradnju ECM, MMP i uPA, korišćena je metoda zimografije (*Santibáñez i sar., 1999, Frankowski i sar., 2012*). Nakon dostizanja konfluentnosti, ćelije zasejavane u ploču za kulturu tkiva sa 6 mesta su tretirane prema odgovarajućim eksperimentalnim uslovima. Nakon perioda inkubacije od 24 h, pokupljeni su kondicionirani medijumi i zamrzavani na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Uzorci su razblaživani pet puta standardnim medijumom za kultivaciju ćelija bez seruma i zatim mešani sa jednakim količinama neredukujućeg pufera za uzorkovanje (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0.02% bromfenol plavo, pH 6,8). Nakon pripremanja uzoraka proteini su razdvojeni elektroforezom na 10% SDS-akrilamidnom gelu u neredukujućim uslovima. S obzirom da se metoda zasniva na sposobnosti želatinaza (MMP) da razlažu želatin (denaturisani kolagen), u gel je dodavan želatin u koncentraciji 1 mg/ml.

Nakon elektroforeze, u slučaju analize aktivnosti MMP, gelovi su ispirani sa 2% Triton X-100, a zatim inkubirani sa puferom za razvijanje (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> u destilovanoj vodi) preko noći na  $37^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaciji, gelovi su bojani rastvorom Komasi plavog (0,25% Coomassie Blue R, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) 30 min, i odbojavani sa 20% metanola i 10% sirćetne kiseline. Aktivnost MMP je detektovana u vidu providnih traka na plavim gelovima.



U slučaju analize aktivnosti uPA gelovi su nakon ispiranja destilovanom vodom nanošeni na podlogu sastavljenu od 1% agaroze, 0,5% kazeina, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 mM CaCl<sub>2</sub> i 2 µg/ml plazminogena i inkubirani preko noći na 37° u vlažnoj atmosferi. Aktivnost uPA je određivana pojavom providnih traka na mlečno belom gelu.

U oba slučaja, denzitometrijskom analizom je izvršena kvantifikacija dobijenih traka pomoću programa Total Lab v1.11 software (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska), a na osnovu upoređivanja sa specifičnim proteinskim markerom.

### 3.6. ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE

Specifična genska ekspresija je određivana nakon izolovanja informacione RNK (iRNK) iz ćelija i dobijanja komplementarne DNK (cDNK).

#### 3.6.1. Izolacija RNK

U cilju liziranja, ćelije su nakon određenog tretmana inkubirane 5 minuta u Trizol-u (Invitrogen) na sobnoj temperaturi. Ćelijski lizat je prenošen u tubice zapremine 1,5 ml i na njih je nanošeno po 200 µl hloroforma. Nakon snažnog mućkanja u trajanju od 15 sekundi usledilo je centrifugiranje na 4°C u trajanju od 15 minuta na 12000 x g. Homogenat se nakon centrifugiranja razdvajao u tri faze: donju, crvenu fenol-hloroform fazu koja sadrži proteine, belu interfazu u kojoj se nalazi DNK i gornju vodenu fazu koja sadrži RNK. Vodena faza je prenošena u novu tubicu u koju je zatim dodavano 500 µl izopropanola i ponovljeno je centrifugiranje na 12000 x g u trajanju od 20 min na 4°C. Po centrifugiranju RNK se mogla videti u vidu belog taloga na dnu tubice. Supernatanti su odlivani, a talozi resuspendovani u 75% etanolu i centrifugirani 5 min na 4°C na 7500 x g. Nakon odlivanja supernatanta talozi RNK su dobro osušeni na vazduhu i resuspendovani u 10-15 µl vode bez nukleaza. Nakon određivanja koncentracije RNK pomoću spektrofotometra, uzorci su čuvani na -70°C.



### 3.6.2. Reverzna transkripcija (RT)

Ukupna RNK prevedena je u komplementarnu DNK upotrebom oligo dT prajmera koji omogućava reverznu transkripciju samo iRNK. Reverzna transkripcija je vršena korišćenjem komercijalnog kita za reverznu transkripciju (RevertAid™ Hminus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Life Science) prema uputstvu proizvođača. Ukratko: 2 µg RNK, 1 µl oligo dT prajmera i vode bez nukleaza do ukupne zapremine od 12,5 µl inkubirani su na 65°C u trajanju od 5 minuta, a potom im je dodavan osnovni miks koji se sastojao od: RevertAid reverzne transkriptaze, smeše dezoksiribonukleotida (dNTP miks) i inhibitora ribonukleaze u puferu za reverznu transkripciju. Ovakva smeša zapremine 20 µl inkubirana je 60 minuta na 42°C, a zatim 10 min na 70°C u termobloku aparata Mastercycler personal (Eppendorf, Nemačka). Koncentracija cDNK je određivana pomoću spektrofotometra.

### 3.6.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)

Reakcija lančanog umnožavanja (PCR od engl. *Polymerase Chain Reaction*) izvedena je korišćenjem prajmera za željeni gen (**Tabela 4.**) i to prema sledećem osnovnom programu:

1. Faza inicijacije koja traje 5 min, na 94°C
2. Faza denaturacije koja traje 45 sekundi, na 94°C
3. Faza vezivanja prajmera koja traje 30 sekundi, na 52°C
4. Faza elongacije koja traje 90 sekundi, 72°C
5. Faza finalne elongacije koja traje 10 minuta, na 72°C

Temperatura vezivanja prajmera, kao i broj ciklusa lančanih reakcija je korigovan u zavisnosti od prajmera koji je korišćen i nivoa ekspresije gena. Sekvence prajmera i temperature za vezivanje prajmera prikazane su u **Tabeli 4.** Za PCR je korišćeno 2 µl svakog uzorka cDNK, 2 µl odgovarajućih prajmera, 12 µl vode bez nukleaza i 10 µl glavne smeše koja sadrži Taq DNK polimerazu, dezoksiribonukleotide i pufer za PCR



sa  $MgCl_2$  (Fermentas). Nivoi ekspresije amplifikovanog gena gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) su korišćeni kao kontrola količine cDNK u svakom uzorku.

#### **3.6.4. Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata**

Nakon reakcije lančanog umnožavanja uzorci su razdvajani na 1.5% agaraznom gelu (Lonza) sa 0,01% etidijum-bromida (Invitrogen) u Tris-acetatnom-EDTA puferu (TAE, Serva) na 100 V i 400 mA (Biorad). PCR produkti su vizuelizovani osvetljavanjem gela UV svetlošću. Pozicija i broj baznih parova (b.p.) dobijenog produkta određivana je na osnovu markera koji u sebi sadrži boju i fragmente 100-1000 b.p. Intenzitet vizuelizovanog signala je denzitometrijski analiziran pomoću programa TotalLab v1.11 software (Amersham). Relativna ekspresija iRNK za specifične gene određivana je kao odnos optičkih gustina traka dobijenih za ispitivan gen i konstitutivno eksprimiran gen za GAPDH (od engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) u istom uzorku.

### **3.7. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA**

Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri ponovljena nezavisna eksperimenta. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti  $\pm$  standardna greška (SE). Za poređenje srednjih vrednosti je korišćen Student-ov t test. Statistička značajnost je prihvaćena za \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

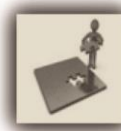


**Tabela 4. Prajmeri korišćeni za RT-PCR; F-forward prajmer, R- reverse prajmer, bp – bazni par.**

<b>Gen</b>	<b>5'-3' sekvenca</b>	<b>Veličina produkta (bp)</b>	<b>Temp. vezivanja prajmera(°C)</b>
<b>uPA</b>	F: GCAGGAACCCAGACAACCG	251	50
	R:GACCCAGGTAGACGATGTAG		
<b>PAI 1</b>	F: CCACTTCTTCAGGCTGTTCC	525	55
	R: GCAGTTCAGGATGTCGTAG		
<b>MMP-2</b>	F: GGCCCTGTCACTCCTGAGAT	213	50
	R: GGCATCCAGTTATCGGGGA		
<b>MT1-MMP</b>	F: CCCTATGCCTACATCCGTGA	570	52
	R: TCCATCCATCACTTGGTTAT		
<b>MMP-9</b>	F: GAGACCGGTGAGCTGGATAG	467	54
	R: TCGAAGATGAAGGGGAAGTG		
<b>HLA-A</b>	F: GACGACACGCAGTTCGTGC	331	49
	R: CATGTCCGCCGCGTCCAA		
<b>HLA-G5</b>	F:GGAAGAGGAGACACGGAACA	771	47
	R:CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT		
<b>HLA-DR</b>	F: CGAGTTCCTATCTGAATCCTG	644	52
	R: GTTCTGCTGCATTGCTTTTGC		
<b>IDO-1</b>	F: ATCACCATGGCATATGTGTGGG	239	50
	R:GTGAAACACTTGAAGGGCTTTCTC		
<b>IL-6</b>	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAG	626	53
	R:AGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
<b>IL17 R</b>	F: GCTTCACCCTGTGGAACGAATC	329	55
	R: GGAGATGCCCCGTGATGAACCA		
<b>ALP</b>	F: CCCAAAGGCTTCTTCTTG	300	55
	R: CTGGTAGTTGTTGTGAGC		
<b>RUNX2/Cbfa 1</b>	F: ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC	261	55
	R:CCAAAAGAAGTTTTGCTGACATGG		
<b>Osetocalcin</b>	F: TCACACTCCTCGCCCTATTGG	300	57
	R: GGGCAAGGGGAAGAGGAAAGA		
<b>Nanog</b>	F: CTCCATGAACATGCAACCTG	209	55
	R: CTCGCTGATTAGGCTCCAAC		
<b>Oct4A</b>	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	270	55
	R: GTGAAGTGAGGGCTCCATA		
<b>Oct4B</b>	F: TATGGGAGCCCTCACTTAC	194	55
	R: CAAAAACCCTGGCACAAACT		
<b>Sox2</b>	F: ATGGGTTCCGGTGGTCAAGT	126	50
	R: GGCGCCGTGGGAGATACATG		
<b>GADPH</b>	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	52
	R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA		



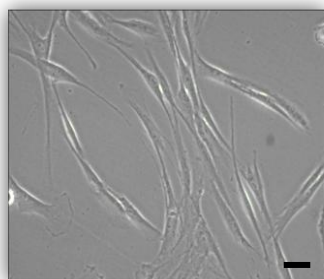
# 4. REZULTATI



## 4.1. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA PD-MMĆ

### 4.1.1. Izolacija, kultivacija i imunofenotipska karakterizacija PD-MMĆ

Metodom eksplanta PD-MMĆ su izolovane iz tkiva periodoncijuma dobijenog nakon ekstrakcije zdravih umnjaka. Nakon 5 dana kultivacije u kulturama ćelija svih ispitivanih donora uočene su adherentne ćelije koje su morfološki slične fibroblastima. Ubrzo nakon toga, adherentne ćelije su formirale pojedinačne kolonije koje su se nakon 14 dana kultivacije spajale dostižući 80-90% pokrivenosti površine flaska, što je bio dovoljan uslov za prvu pasažu ćelija. U narednim pasažama ćelije su zadržale fibroblastima sličan vretenast oblik, a za razliku od nulte pasaže umnožavale su se uniformno u jednom sloju bez formiranja pojedinačnih kolonija.

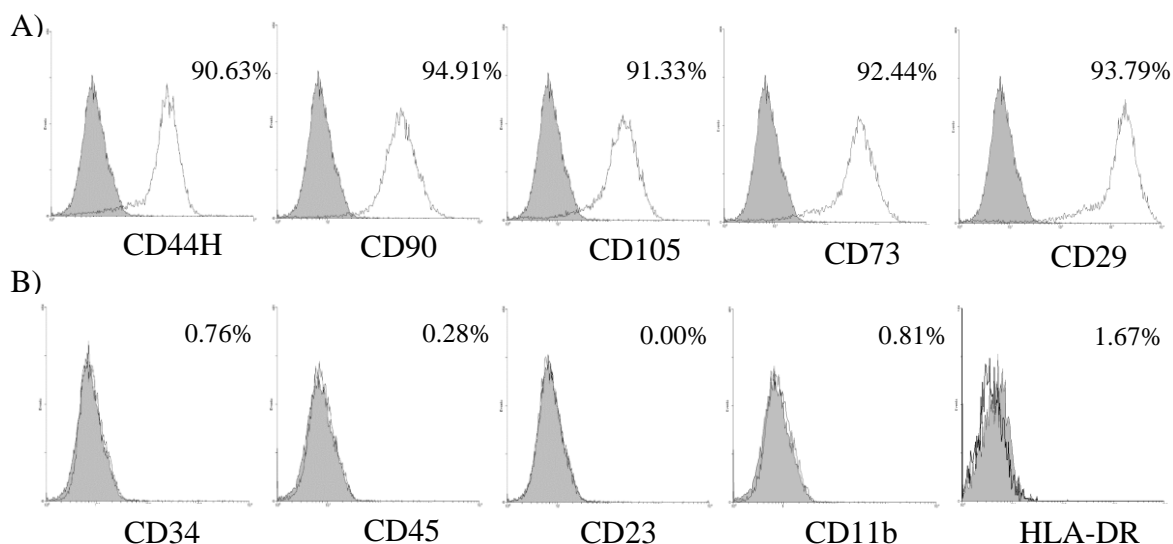


**Slika 14. Morfologija PD-MMĆ.**

*PD-MMĆ izolovane iz periodoncijuma zdrave osobe. Vrednost razmera je 50µm.*

U svrhu karakterizacije izolovanih ćelija, metodom protočne citometrije analizirana je ekspresija površinskih markera na PD-MMĆ od treće do šeste pasaže. Imunofenotipska karakterizacija MMĆ jedan je od tri minimalna kriterijuma predložena od strane Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju u cilju definisanja mezenhimske prirode ovih ćelija izolovanih iz različitih tkiva različitim laboratorijskim protokolima. Dobijeni rezultati, prikazani na **Slici 15**, potvrdili su pozitivnu ekspresiju markera karakterističnih za MMĆ na izolovanim ćelijama, dok je u isto vreme pokazano odsustvo markera karakterističnih za hematopoetske i imunske ćelije. Naime, ustanovljeno je da preko 90% PD-MMĆ ispoljava markere MMĆ (CD44, CD90, CD105, CD73 i CD29), dok manje od 1% eksprimira markere hematopoetskih ćelija (CD34, CD45, CD235a, CD11b), uz ekspresiju HLA-DR, markera antigen

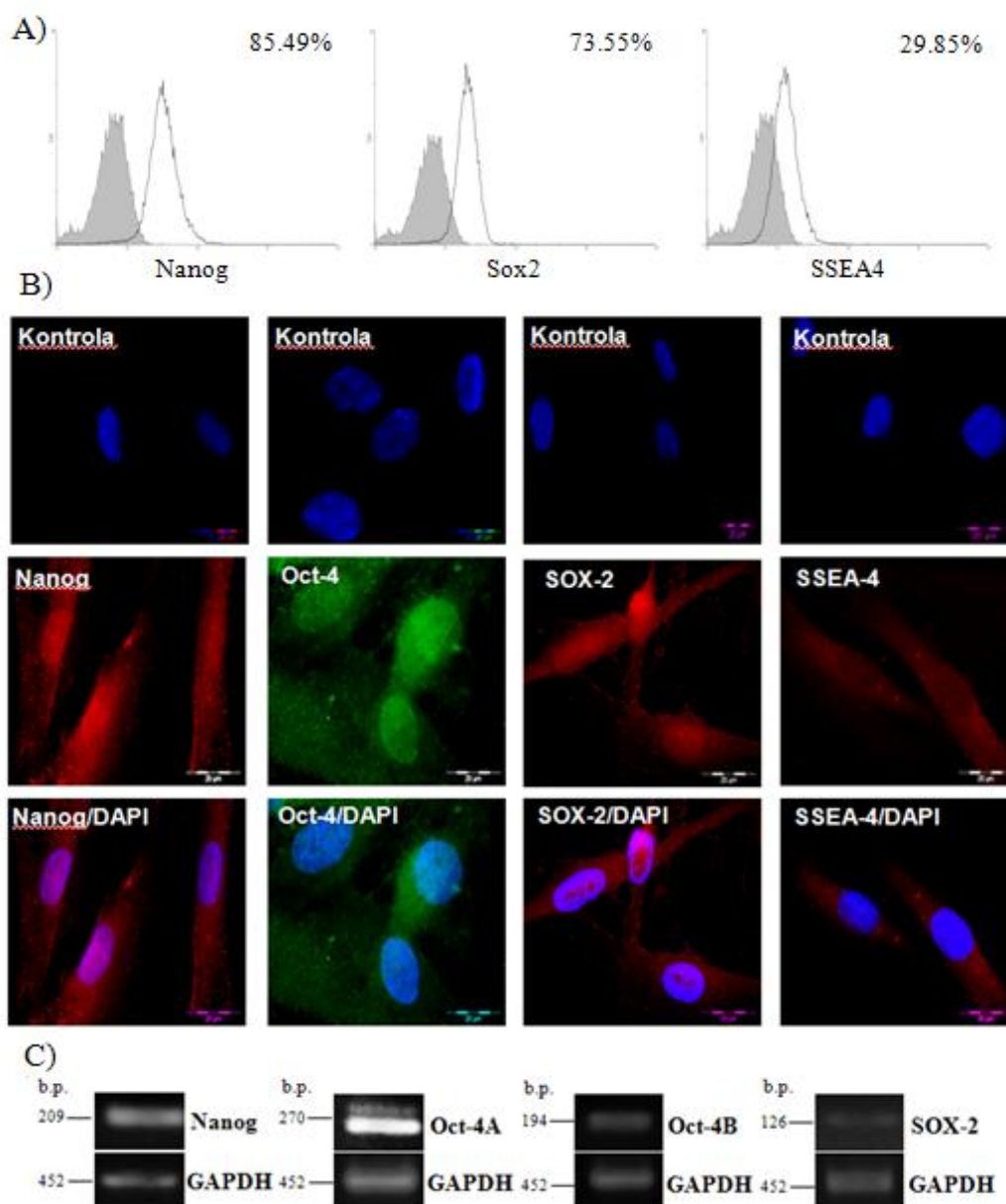
prezentujućih ćelija, na manje od 2% ćelija. Slični rezultati su dobijeni za sva četiri ispitivana donora.



**Slika 15. Imunofenotipska karakterizacija PD-MMĆ određena protočnom citometrijom.**

Na reprezentativnim histogramima predstavljena je ekspresija (A) mezenhimskih antigena (neobojeni deo) i (B) hematopoetskih antigena u poređenju sa izotipskim kontrolama (sivo obojeno).

Dodatno je analizirana ekspresija markera embrionalnih MĆ (EMĆ) na PD-MMĆ: unutarćelijskih transkripcionih faktora, Nanog, Oct-4 i Sox2, kao i membranskog SSEA4. Rezultati su pokazali da veliki procenat PD-MMĆ eksprimira ove markere (Slika 16A). Naime, analizom na protočnom citometru utvrđeno je da kod sva četiri ispitivana donora preko 70% PD-MMĆ eksprimira Nanog i Sox2, dok je oko 30% ćelija SSEA4 pozitivno. Dobijeni nalazi su ukazali da izolovana ćelijska populacija sadrži visok procenat primitivnih multipotentnih MMĆ. Ekspresija markera pluripotentnosti Nanog, Oct4A, Sox2 i SSEA-4 potvrđena je i imunofluorescentnim obeležavanjem (Slika 16B). Pri tome je uočena predominantna lokalizacija Nanog transkripcionog faktora u nukleusu. Slično tome, pokazano je da su Oct-4 i SOX-2 lokalizovani u većoj meri u nukleusu, dok je njihova blaga ekspresija detektovana i u citoplazmi. Takođe je ovom metodom potvrđena i ekspresija površinskog markera pluripotentnosti SSEA-4 na PD-MMĆ. Dodatno je RT-PCR metodom pokazana ekspresija Nanog, Oct-4A, Oct4-B i SOX-2 u ovim ćelijama i na genskom nivou (Slika 16C).



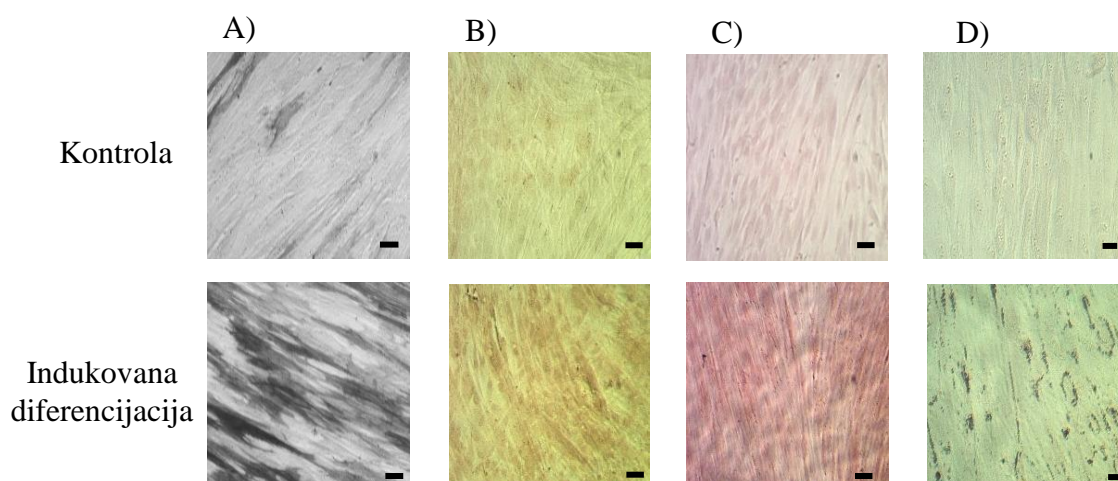
**Slika 16. Ekspresija markera embrionalnih matičnih ćelija u PD-MMĆ.**

(A) Ekspresija embrionalnih marker-antigena (Nanog, Sox-2 i SSEA4) (nebojeni deo) u poređenju sa izotipskim kontrolama (sivo obojeno) određena protočnom citometrijom. Predstavljani su reprezentativni histogrami. (B) Tehnikom indirektno imunofluorescence ćelije su obeležene mišjim anti-NANOG, anti-SOX2 i anti-SSEA4 i zečjim anti-OCT-4 antitelima, i odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim TRITC (crveno) i FITC (zeleno) fluorohromom. Negativne kontrole su obeležene samo sekundarnim antitelom konjugovanim TRITC i FITC. Nukleusi su obeleženi DAPI fluorescentnom bojom (plavo). Prikazane su reprezentativne fotografije sa epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmera je 20  $\mu$ m. (C) Ekspresija iRNK za Nanog, Oct-4A, Oct-4B i SOX-2 u PD-MMĆ određena metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola. Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).



#### 4.1.2. Diferencijacija PD-MMĆ

U skladu sa propisanim kriterijumima za definisanje MMĆ koje je ustanovilo Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju u sledećem koraku je određivan multipotentni potencijal diferencijacije PD-MMĆ, kao funkcionalni test za potvrdu identiteta MMĆ. Nakon kultivacije PD-MMĆ treće do šeste pasaže u specifičnim diferencijacionim medijumima potvrđena je sposobnost ovih ćelija da se diferenciraju u ćelije osteogene, hondrogene i adipogene loze i to na osnovu detektovane aktivnosti alkalne fosfataze, bojenjem depoa kalcijuma (Ca), odnosno dokazivanjem prisustva glikozaminoglikana i lipidnih kapi (**Slika 17**). Naime, osteogena diferencijacija je indukovana u trajanju od 7 dana, koliko je potrebno da bi se podstakla ekspresija ALP, markera rane osteogeneze (**Slika 17A**). Ekspresija i aktivnost ALP analizirana je dodavanjem odgovarajućeg supstrata za ovaj enzim nakon čega su se ćelije koje ispoljavaju ALP obojile intenzivno teget-sivom bojom. Dobijeni rezultati pozitivne ekspresije ALP u PD-MMĆ kultivisanim u osteogenom medijumu su potvrdili potencijal PD-MMĆ za osteogenu diferencijaciju kod sva četiri analizirana donora. Takođe, osteogena diferencijacija PD-MMĆ je potvrđena kod svih ispitivanih donora bojenjem depozita unutarćelijskog kalcijuma Alizarin Red bojom nakon inkubacije ćelija 21 dan u osteogenom diferencijacionom medijumu (**Slika 17B**). Potencijal PD-MMĆ za hondrogenu diferencijaciju je potvrđen nakon 21 dana inkubacije u hondrogenom medijumu dokazivanjem prisustva proizvoda hondrogenih ćelija - proteoglikana u kulturi ćelija bojenjem Safranin O bojom (**Slika 17C**). Pored toga, detekcijom lipidnih kapi unutar ćelija bojenjem Oil Red O bojom nakon 21 dana kultivacije PD-MMĆ u adipogenom diferencijacionom medijumu dokazana je i sposobnost adipogene diferencijacije PD-MMĆ kod svih analiziranih donora (**Slika 17D**).

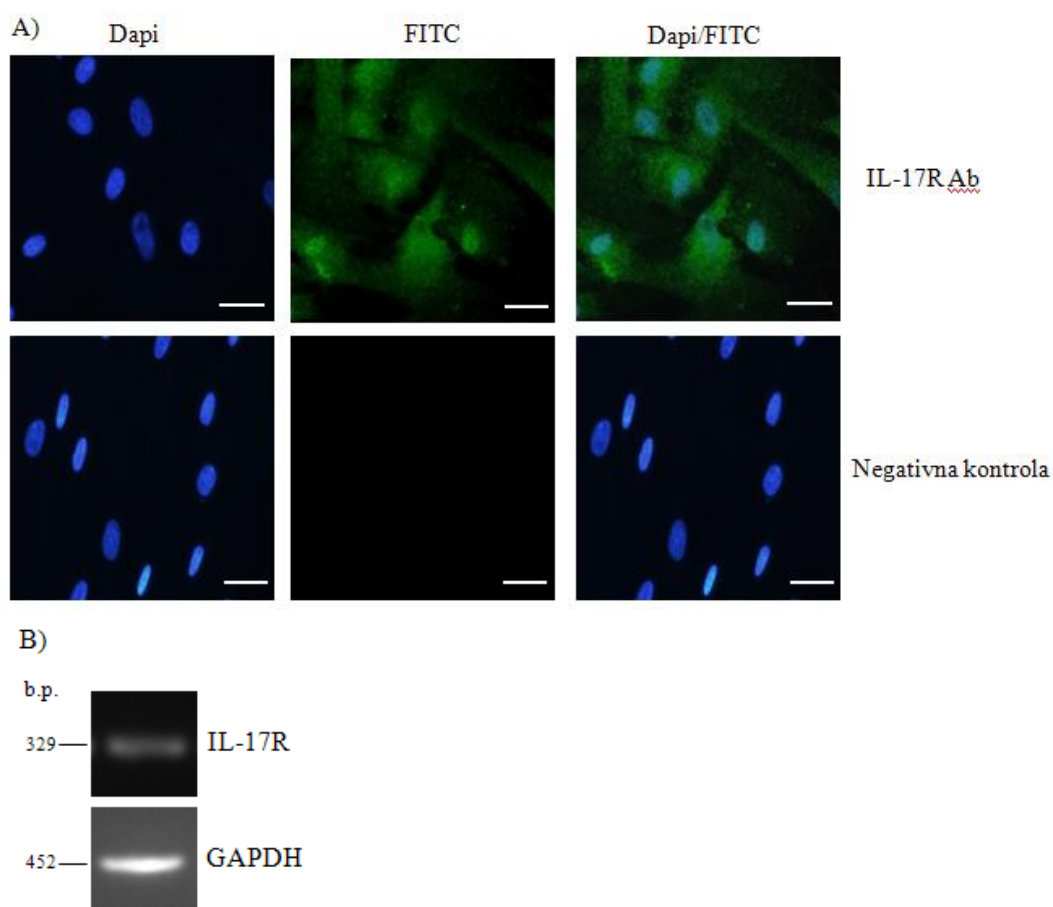


**Slika 17. Diferencijacija PD-MMĆ.**

Potencijal PD-MMĆ za osteogenu (A,B), hondrogenu (C) i adipogenu (D) diferencijaciju određivan je nakon kultivacije ćelija u odgovarajućem diferencijacionom medijumu, dok su kontrole kultivisane u standardnom medijumu. Osteogena diferencijacija potvrđena je (A) bojenjem ćelija na aktivnost alkalne fosfataze BCIP/NBT metodom nakon 7 dana inkubacije i (B) bojenjem deponovanog Ca pomoću Alizarin red boje nakon 21 dan kultivacije. (C) Hondrogena diferencijacija je određena nakon 21 dana inkubacije bojenjem proteoglikana Safranin O bojom. (D) Adipogena diferencijacija je analizirana nakon 21 dana inkubacije bojenjem lipidnih kapljica unutar ćelija Oil Red O bojom. Prikazane su reprezentativne fotografije. Vrednost razmera je 50  $\mu\text{m}$  za osteogenu i hondrogenu i 20  $\mu\text{m}$  za adipogenu diferencijaciju.

#### 4.1.3. Ekspresija receptora za IL-17 na PD-MMĆ

Pre nego što su započeta ispitivanja uticaja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ analizirana je ekspresija IL-17R na ovim ćelijama. Dobijeni rezultati, prikazani na **Slici 18**, potvrdili su da izolovane PD-MMĆ ispoljavaju IL-17R na svojoj površini. Naime, nakon obeležavanja PD-MMĆ antitelom specifičnim za IL-17R metodom indirektno immunofluorescence, pokazana je pozitivna ekspresija ovog membranskog receptora na površini PD-MMĆ u vidu diskretne fluorescentne tačke, koje se nisu mogle uočiti u negativnim kontrolama (**Slika 18A**). Ekspresija IL-17R dodatno je potvrđena na genskom nivou RT-PCR metodom (**Slika 18B**). Ekspresija IL-17R pokazana je na svim analiziranim PD-MMĆ izolovanim od različitih donora.



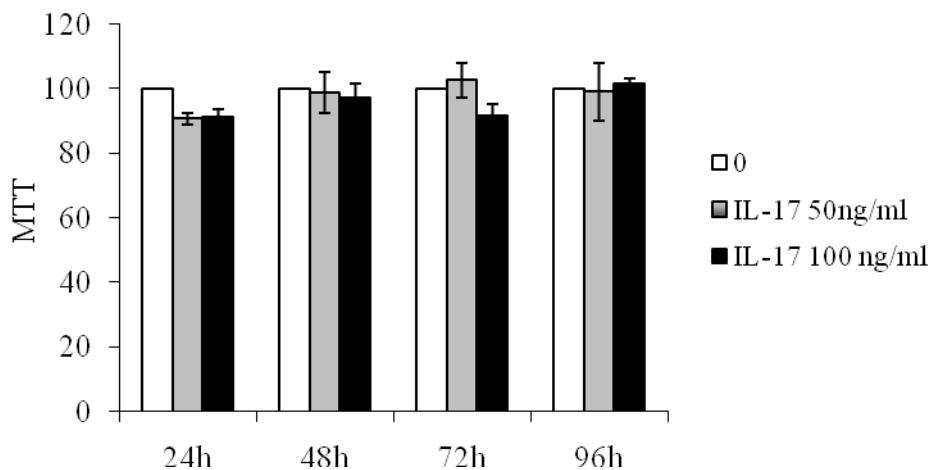
### Slika 18. Ekspresija IL-17R u PD-MMĆ.

(A) Indirektno imunofluorescentno bojenje sa primarnim zečjim anti-IL-17R antitelom i odgovarajućim sekundarnim anti-zečjim FITC-konjugovanim (zeleno) antitelom. Nukleusi su obojeni plavo (DAPI). Negativne kontrole su obeležene samo sekundarnim FITC-konjugovanim antitelom. Prikazane su reprezentativne fotografije sa epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmera je 50 $\mu$ m. (B) Ekspresija iRNK za IL-17R u PD-MMĆ određena metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola. Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).

## 4.2. UTICAJ IL-17 NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA PD-MMĆ

### 4.2.1. Uticaj IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ

Kako bi se ispitaio uticaj IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ, ćelije su inkubirane u standardnom medijumu bez ili sa dodatkom IL-17 (50 i 100 ng/ml) tokom različitih vremenskih intervala (24, 48, 72, i 96 h). Nakon svakog termina inkubacije uticaj IL-17 na stepen proliferacije PD-MMĆ je određivan MTT testom. Rezultati MTT testa su predstavljeni za svaki analizirani vremenski termin kao procentualne razlike vrednosti proliferacije tretiranih uzoraka u odnosu na vrednosti proliferacije kontrolnih uzoraka inkubiranih bez IL-17 (izražene kao 100%) (**Slika 19**). Na osnovu dobijenih rezultata ovih ispitivanja utvrđeno je da nakon 24 h inkubacije IL-17 dovodi do blagog, statistički značajnog smanjenja proliferacije PD-MMĆ u odnosu na netretiranu kontrolu. Pri tome je utvrđeno da IL-17 ispoljava sličan inhibitorni efekat na proliferaciju PD-MMĆ u obe testirane koncentracije. S druge strane, rezultati su pokazali da nakon 48, 72 i 96 h inkubacije IL-17 nema efekta na proliferaciju PD-MMĆ.



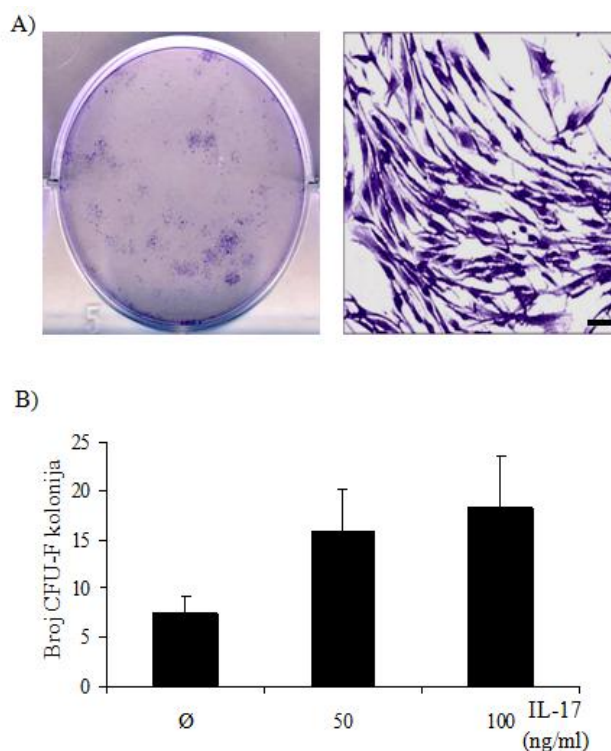
**Slika 19. Uticaj IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ.**

Proliferacija PD-MMĆ je merena MTT testom nakon 24, 48, 72 i 96 h inkubacije u standardnom medijumu bez ili sa IL-17 (50 i 100 ng/ml). Rezultati su predstavljeni relativnim indeksom proliferacije kao % od kontrole (ćelije inkubirane bez IL-17). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta postavljena u triplicatu. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*\*  $p < 0.01$ .



#### 4.2.2. Uticaj IL-17 na klonogeni potencijal PD-MMĆ

U sklopu ispitivanja uticaja IL-17 na rast PD-MMĆ, analiziran je efekat ovog citokina na klonogeni potencijal PD-MMĆ, praćenjem njihove sposobnosti formiranja CFU-F kolonija sličnih fibroblastima. U te svrhe, PD-MMĆ su kultivisane tokom 14 dana u standardnom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100 ng/ml). Rezultati su pokazali da IL-17 u obe primenjene koncentracije dovodi do povećanja učestalosti CFU-F kolonija u odnosu na kontrolnu grupu kultivisanu bez IL-17 (**Slika 20**). Međutim, uočeno povećanje nije bilo statistički značajno. Tokom ovih ispitivanja takođe je utvrđeno da PD-MMĆ izolovane iz različitih donora imaju sličan nizak kapacitet formiranja CFU-F, s obzirom da je kod svih donora broj dobijenih kolonija bio znatno niži u odnosu na broj zasađenih ćelija.

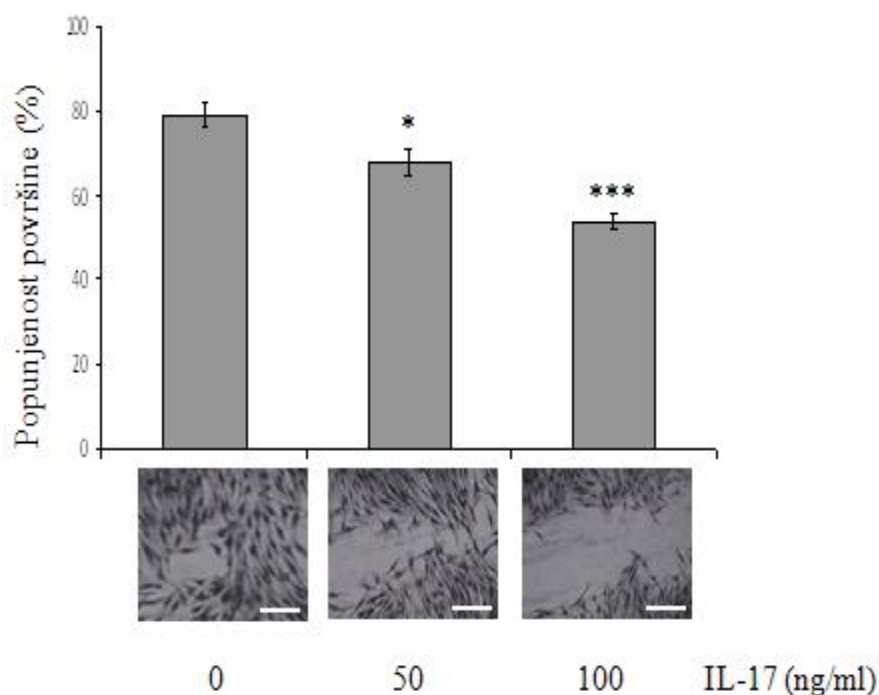


**Slika 20. Uticaj IL-17 na klonogeni potencijal PD-MMĆ.**

Ćelije su zasejane u ploče za gajenje ćelijskih kultura u koncentraciji 500 ćelija/otvoru i kultivisane tokom 14 dana u standardnom medijumu bez ili sa IL-17 (50 i 100 ng/ml) nakon čega su kolonije bojene kristal-violet bojom. (A) Izgled formiranih CFU-F kolonija. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 40  $\mu$ m. (B) Učestalost formiranja CFU-F kolonija. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti broja kolonija  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta postavljena u duplikatu.

#### 4.2.3. Uticaj IL-17 na migraciju PD-MMĆ

Uticaj IL-17 na migraciju PD-MMĆ praćen je nakon 24 h kultivacije ćelija u prisustvu rastućih koncentracija ovog citokina (0, 50 i 100 ng/ml) primenom *Scratch* eseja. Rezultati su pokazali da IL-17 indukuje statistički značajnu, dozno-zavisnu inhibiciju migracije PD-MMĆ (**Slika 21**). Naime, dok je IL-17 u koncentraciji od 50 ng/ml doveo do blage inhibicije migracije PD-MMĆ u odnosu na netretirane kontrole, izraženije smanjenje migracije ovih ćelija (za oko 35%) indukovala je veća koncentracija IL-17 (100 ng/ml). Kontrolne PD-MMĆ inkubirane u odsustvu IL-17 ispoljile su visok kapacitet za migraciju, imajući u vidu da su skoro potpuno prekrile površinu ogrebotine nakon 24h kultivacije.



**Slika 21. Uticaj IL-17 na migraciju PD-MMĆ.**

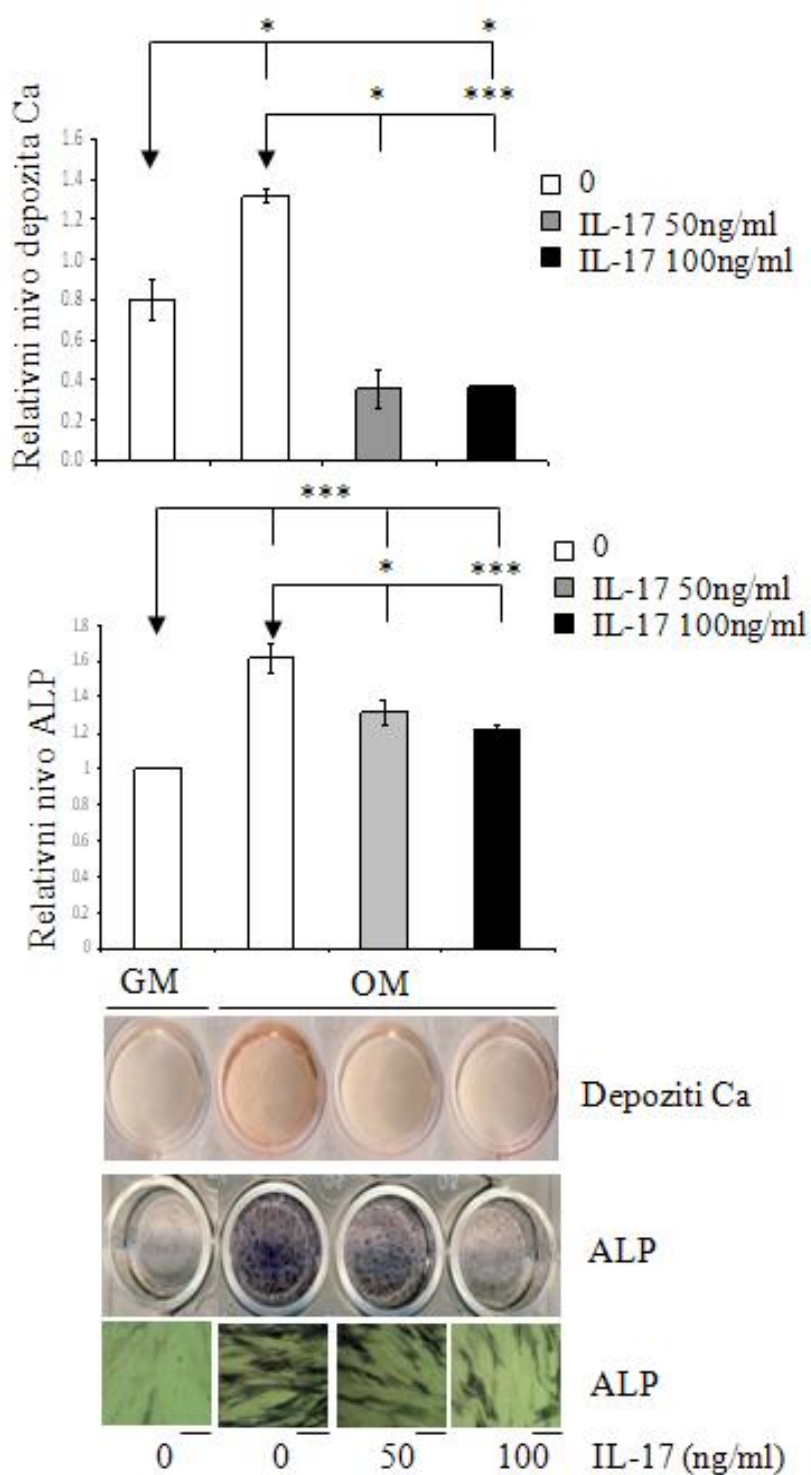
Migracija PD-MMĆ je analizirana *Scratch* esejom. Nakon što je u konfluentnom sloju ćelija po sredini povučena ravna linija u vidu ogrebotine, ćelije su inkubirane u standardnom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) tokom 24 h. Migracija ćelija u polje ogrebotine je analizirana na svetlosnom mikroskopu i predstavljena kao procenat površine polja ogrebotine pokrivene migrirajućim ćelijama. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta urađena u duplikatu. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazane su reprezentativne fotografije, vrednost razmera je 100  $\mu$ m.



#### 4.2.4. Uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ

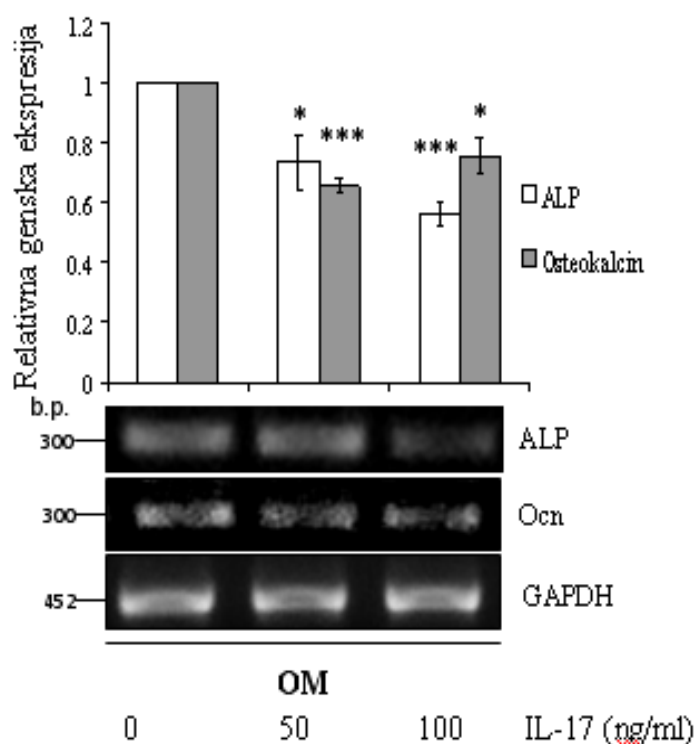
U cilju ispitivanja efekta IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ, konfluentne ćelije su inkubirane u osteogenom diferencijacionom medijumu u prisustvu rastućih koncentracija IL-17 (0, 50 i 100 ng/ml) tokom 7 ili 21 dana, nakon čega je analizirana aktivnost ALP, odnosno formiranje depozita kalcijuma (Ca) u ćelijskoj kulturi. Dobijeni rezultati, prikazani na **Slici 22**, pokazali su da je osteogena diferencijacija indukovana inkubacijom ćelija u osteogenom diferencijacionom medijumu inhibirana u prisustvu IL-17. Naime, utvrđeno je da IL-17 nakon 7 dana inkubacije u osteogenom medijumu indukuje značajno smanjenje aktivnosti ALP u PD-MMĆ, a nakon 21 dana inkubacije još izraženije smanjenje akumulacije kalcijuma u kulturi u poređenju sa netretiranim kontrolama. Pri tome su rezultati pokazali da obe primenjene koncentracije IL-17 ispoljavaju sličan inhibitorski efekat na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ.

Inhibitorski efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju je potvrđen i analizom ekspresije gena za markere osteogene diferencijacije, ALP i Ocn. Rezultati dobijeni RT-PCR metodom, prikazani na **Slici 23**, pokazali su da je nakon 7 dana inkubacije PD-MMĆ u osteogenom diferencijacionom medijumu u prisustvu IL-17 nivo ekspresije ALP i Ocn iRNK statistički značajno smanjen u poređenju sa nivoom ekspresije detektovanim u kontrolama kultivisanim bez IL-17 (**Slika 23**).



**Slika 22. Uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ.**

Ćelije su kultivisane u standardnom (GM) i osteogenom medijumu (OM) u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100 ng/ml) tokom 7 dana za detekciju aktivnosti ALP, odnosno 21 dan za detekciju depozita Ca. Vrednosti su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnim ćelijama inkubiranim u GM. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta urađena u duplikatu. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazane su reprezentativne fotografije, vrednost razmera je 50 $\mu$ m.

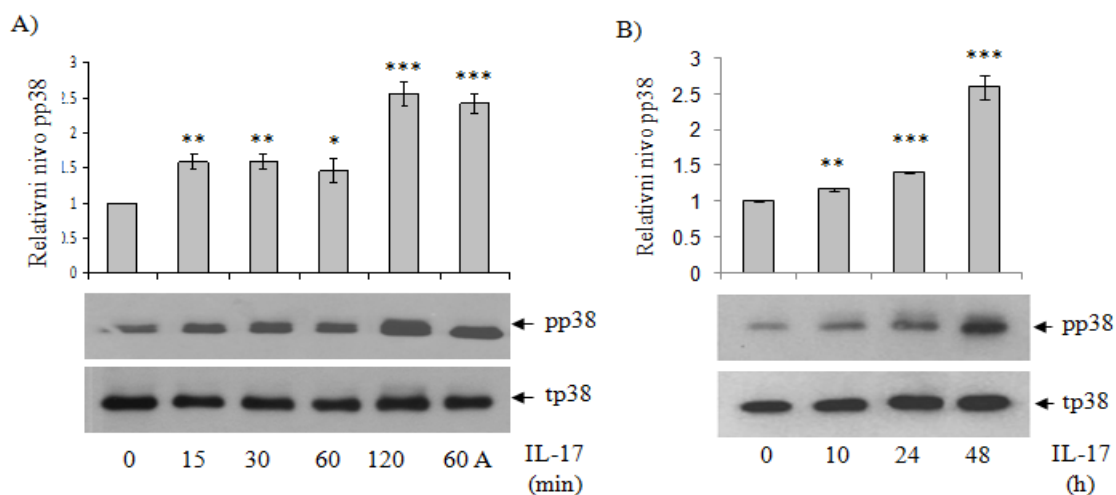


**Slika 23. Uticaj IL-17 na ekspresiju gena osteogene diferencijacije u PD-MMC.** Čelije su kultivisane u osteogenom medijumu (OM) bez ili u prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) tokom 7 dana, nakon čega je izolovana iRNK. Ekspresija iRNK za ALP i Ocn u PD-MMC određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SE odnosa intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovanog u odnosu na vrednosti dobijene za kontrole kultivisane bez IL-17 za dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).



### 4.3. UNUTARĆELIJSKA SIGNALIZACIJA IL-17 U PD-MMĆ

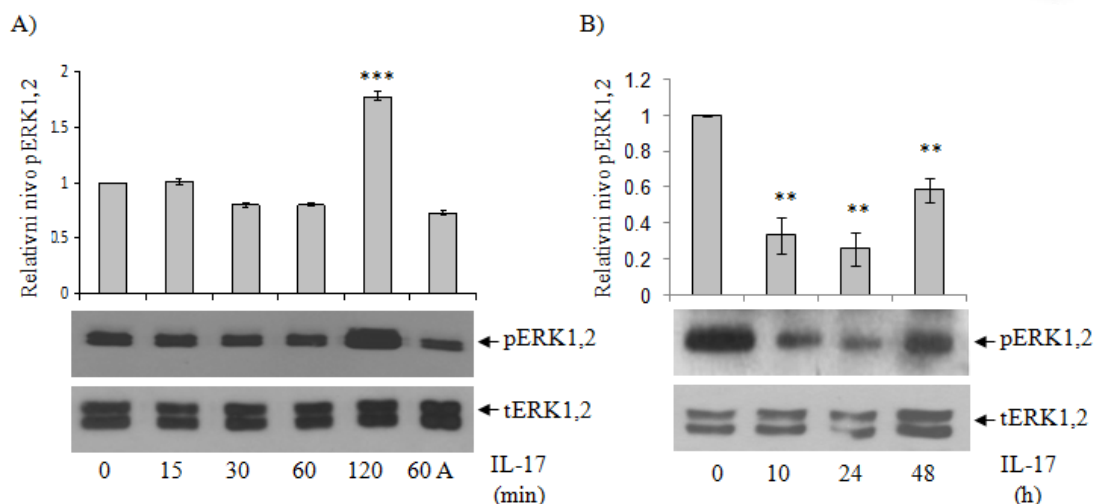
Naredni cilj istraživanja podrazumevao je ispitivanje puteva unutarćelijske signalizacije uključenih u delovanje IL-17 na PD-MMĆ. Dosadašnja izučavanja puteva signalizacije indukovanih IL-17 pokazala su da se brojni efekti ovog citokina na različite tipove ćelija ostvaruju preko aktivacije MAPK (*Kawaguchi i sar., 2004, Gaffen 2009*). Da bi smo utvrdili da li IL-17 aktivira MAPK i u PD-MMĆ, ćelije su inkubirane u različitim vremenskim intervalima u prisustvu 100 ng/ml IL-17 u standardnom medijumu bez seruma, nakon čega je Western blot analizom praćena ekspresija totalne i aktivne, fosforilisane forme p38, ERK1,2 i JNK MAPK u ćelijskim lizatima. Kao pozitivna kontrola ćelijskim kulturama je dodavan aktivator p38 i JNK MAPK, anizomicin. Dobijeni rezultati su pokazali da PD-MMĆ konsitutivno eksprimiraju p38, ERK1,2 i JNK MAPK, kao i da IL-17 indukuje aktivaciju sve tri klase MAPK. Naime, utvrđeno je da kratkotrajna stimulacija ovih ćelija sa IL-17 značajno povećava fosforilaciju p38 MAPK već nakon 15 min u poređenju sa nivoom fosforilacije p38 detektovanim u netretiranim kontrolama (**Slika 24A**). Statistički značajno povećan nivo fosforilacije p38 MAPK utvrđen je i nakon 30, 60 i 120 minuta stimulacije PD-MMĆ sa IL-17, pri čemu je najviša aktivacija pokazana nakon 120 minuta. Rezultati ispitivanja dugotrajne stimulacije PD-MMĆ sa IL-17 su takođe pokazali da ovaj citokin aktivira p38 MAPK u PD-MMĆ i nakon 10, 24 i 48 h inkubacije ispoljavajući najizraženiji stimulatorni efekat na nivo fosforilacije ove MAPK nakon 48 h (**Slika 24B**).



**Slika 24. Uticaj IL-17 na aktivaciju p38 MAPK u PD-MMC.**

Ćelije su inkubirane u medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 15, 30, 60 i 120 min ili 60 min sa anizomicinom (100 ng/ml) (A), odnosno u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 10, 24 i 48 h (B). Nakon toga su iz ćelija izolovani proteinski ekstrakti u kojima je ekspresija p38 MAPK utvrđena Western blot analizom. Na graficima su predstavljeni odnosi intenziteta traka fosforilisanog i ukupnog proteina normalizovani u odnosu na kontrolnu vrednost (0'), prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (0'): \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni blotovi.

Kao što se vidi iz rezultata prikazanih na **Slici 25A**, statistički značajno povećana fosforilacija ERK1,2 MAPK je uočena u PD-MMC samo nakon 120 min stimulacije sa IL-17 u poređenju sa nivoom fosforilacije ove MAPK kod netretiranih kontrola. Naši rezultati su takođe potvrdili i da anizomicin, aktivator p38 i JNK MAPK, nema uticaja na aktivaciju ERK1,2 MAPK u PD-MMC. S druge strane, kada su PD-MMC stimulisane sa IL-17 tokom dužih vremenskih intervala pokazano je smanjenje nivoa fosforilacije ERK1,2 MAPK nakon 10, 24 i 48 h inkubacije u prisustvu IL-17 (**Slika 25B**).

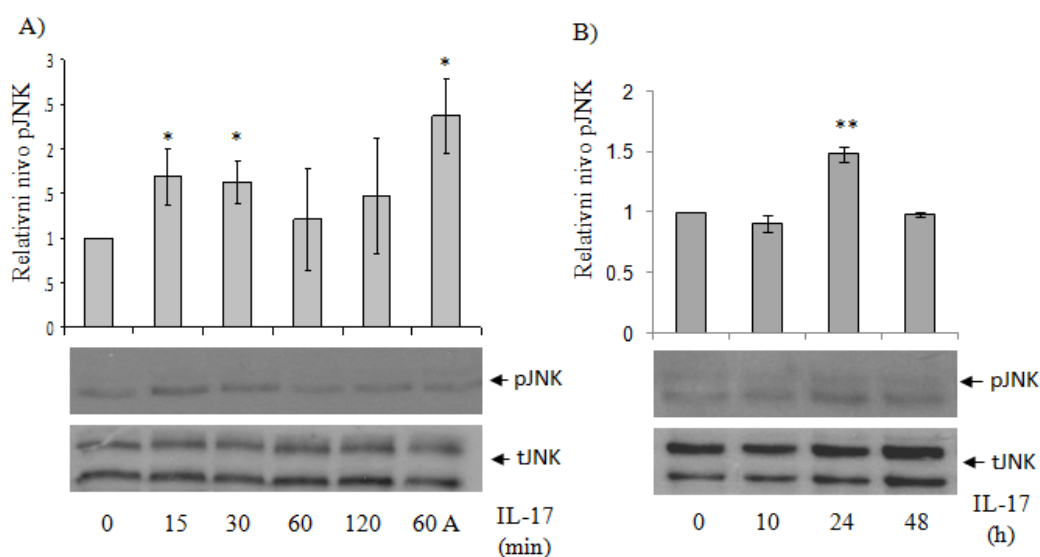


**Slika 25. Uticaj IL-17 na aktivaciju ERK1,2 MAPK u PD-MMĆ.**

Ćelije su inkubirane u medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 15, 30, 60 i 120 min ili 60 min sa anisomicinom (100 ng/ml) (A), odnosno u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 10, 24 i 48 h (B). Nakon toga su iz ćelija izolovani proteinski ekstrakti u kojima je ekspresija ERK1,2 MAPK utvrđena Western blot analizom. Na graficima su predstavljeni odnosi intenziteta traka fosforilisanog i ukupnog proteina normalizovani u odnosu na kontrolnu vrednost (0') prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (0'): \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni blotovi.

Na **Slici 26A** su predstavljeni rezultati aktivacije JNK MAPK. Kao što je prikazano, povećan nivo fosforilacije JNK MAPK je uočen samo 15 i 30 min nakon stimulacije PD-MMĆ sa IL-17 u poređenju sa nivoom aktivacije JNK detektovanim u netretiranim kontrolama. Rezultati na **Slici 26B** prikazuju statistički značajnu aktivaciju JNK MAPK u kasnijim terminima inkubacije samo 24 h u prisustvu IL-17.





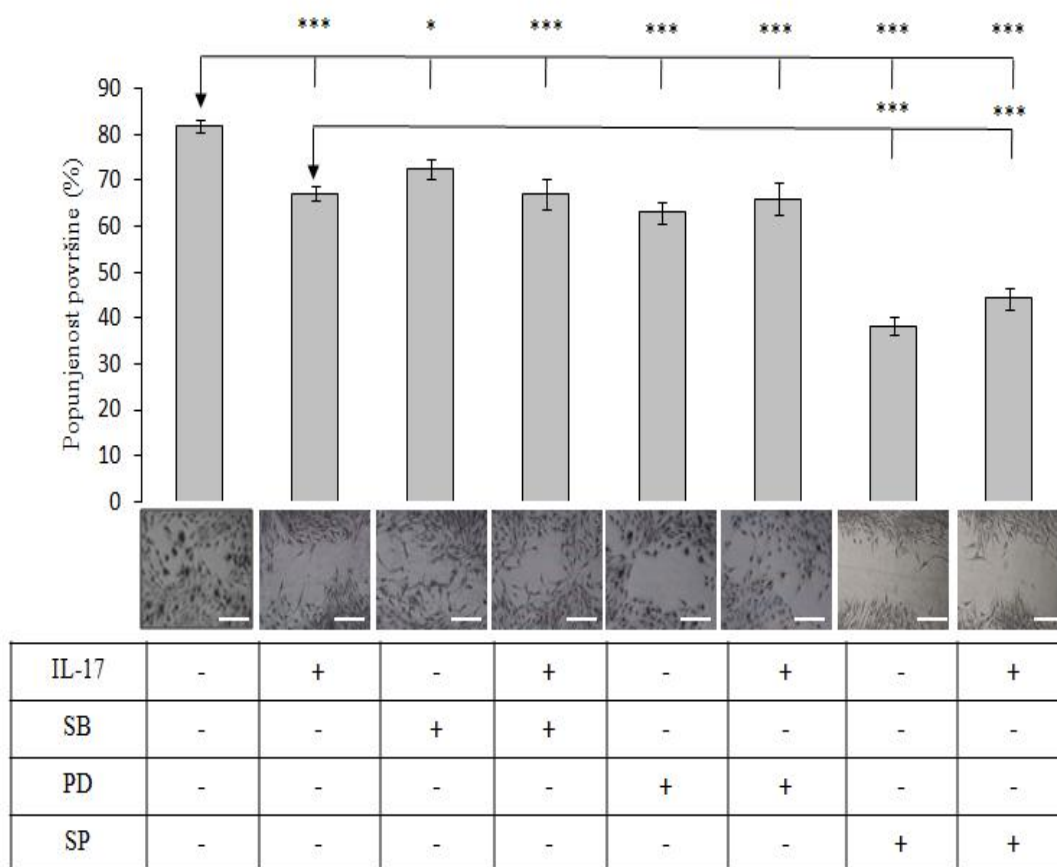
**Slika 26. Uticaj IL-17 na aktivaciju JNK MAPK u PD-MMĆ.**

Ćelije su inkubirane u medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 15, 30, 60 i 120 min ili 60 min sa anizomicinom (100 ng/ml) (A), odnosno u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 tokom 10, 24 i 48 h (B). Nakon toga su iz ćelija izolovani proteinski ekstrakti u kojima je ekspresija JNK MAPK utvrđena Western blot analizom. Na graficima su predstavljene odnosi intenziteta traka fosforilisanog i ukupnog proteina normalizovani u odnosu na kontrolnu vrednost (0') prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (0'): \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Prikazani su reprezentativni blotovi.

#### 4.4. ULOGA MAPK SIGNALNOG PUTA U IL-17-INDUKOVANOJ INHIBICIJI MIGRACIJE PD-MMĆ

Imajući u vidu da aktivirane MAPK mogu da učestvuju u regulaciji ćelijske migracije, a da je aktivacija MAPK pod uticajem IL-17 prethodno pokazana u PD-MMĆ, u daljim istraživanjima smo ispitali učešće p38, ERK1,2 i JNK MAPK u zapaženoj inhibiciji migracije PD-MMĆ indukovanoj sa IL-17. U te svrhe analiziran je uticaj specifičnih inhibitora ovih signalnih puteva na IL-17 posredovanu inhibiciju migracije PD-MMĆ. Dobijeni rezultati su pokazali da sami inhibitori p38 (SB203580), ERK1,2 (PD98059) i JNK (SP600125) MAPK dovode do inhibicije migracije PD-MMĆ, pri čemu je inhibitor JNK ispoljio najizraženiji inhibicioni efekat na migraciju ovih ćelija. Dobijeni rezultati su ukazali na značaj aktivacije MAPK signalnih puteva u regulaciji migracije PD-MMĆ. Pored toga, kada su inhibitori p38, ERK1,2 i JNK MAPK korišćeni u kombinaciji sa IL-17 utvrđeno je da inhibicija ovih signalnih puteva ne menja inhibicioni efekat IL-17 na migraciju PD-MMĆ. Na osnovu ovih rezultata

moglo se pretpostaviti da MAPK signalni putevi nisu uključeni u IL-17 indukovanu inhibiciju migracije PD-MMC.



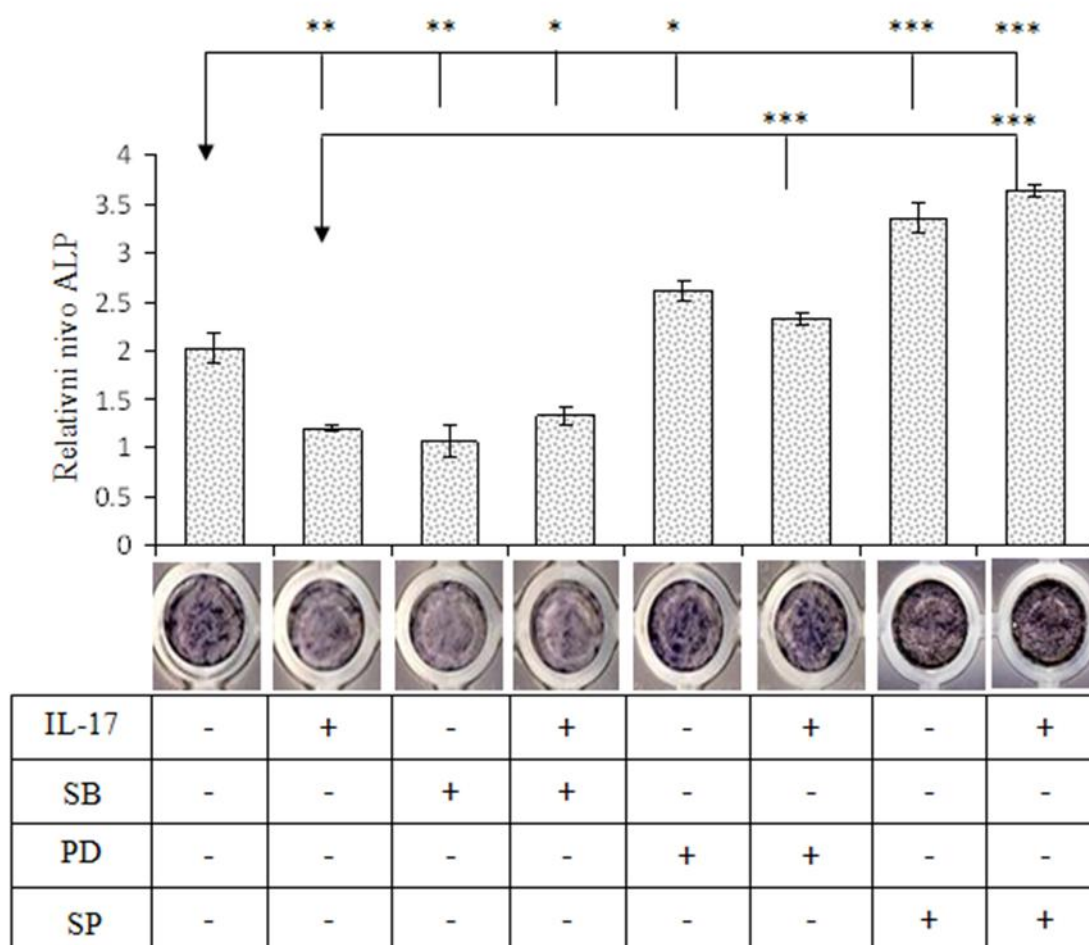
**Slika 27. Uticaj specifičnih inhibitora MAPK na IL-17-indukovanu inhibiciju migracije PD-MMC.**

Migracija PD-MMC je praćena *in vitro* Scratch testom: nakon što je u konfluentnom sloju ćelija po sredini povučena ravna linija u vidu ogrebotine, ćelije su inkubirane tokom 24 h u standardnom medijumu u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17 i inhibitora MAPK: 10  $\mu$ M SB20308 (SB) za p38, 25  $\mu$ M PD98059 (PD) za ERK1,2 i 10  $\mu$ M SP600125 (SP) za JNK. Migracija ćelija u polje ogrebotine je analizirana na svetlosnom mikroskopu i predstavljena kao procenat površine polja ogrebotine pokrivena migrirajućim ćelijama. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta urađena u duplikatu. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazane su reprezentativne fotografije, vrednost razmera je 100 $\mu$ m.



#### 4.5. UČEŠĆE MAPK SIGNALNOG PUTA U INHIBICIJI OSTEOGENE DIFERENCIJACIJE PD-MMĆ INDUKOVANOJ IL-17

Da bi se ispitalo učešće MAPK signalnog puta u inhibitornom delovanju IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ, ćelije su inkubirane u osteogenom medijumu u prisustvu IL-17 i inhibitora za p38 (SB203580), ERK1,2 (PD98059) ili JNK (SP600125) MAPK. Rezultati dobijeni analizom aktivnosti ALP u ćelijskim kulturama, prikazani na **Slici 27**, pokazali su da sam inhibitor za p38 MAPK, SB203580, dovodi do inhibicije osteogene diferencijacije PD-MMĆ, s obzirom da indukuje smanjenje aktivnosti ALP u PD-MMĆ u odnosu na netretirane kontrole. Pored toga, kada je inhibitor p38 MAPK korišćen u kombinaciji sa IL-17 utvrđeno je da se inhibicioni efekat IL-17 na aktivnost ALP u PD-MMĆ ne menja značajno u prisustvu ovog inhibitora. S druge strane, primenom PD98059, pokazano je da sama inhibicija ERK1,2 MAPK dovodi do povećanja nivoa aktivnosti ALP u PD-MMĆ za 30%, dok JNK inhibitor, SP600125, ima još izraženiji uticaj na osteogenu diferencijaciju ovih ćelija povećavajući nivo aktivnosti ALP za 80% u odnosu na netretirane kontrole. Ispitivanjem efekata inhibitora ovih MAPK u kombinaciji sa IL-17 na aktivnost ALP, utvrđeno je da je IL-17 posredovana inhibicija osteogene diferencijacije PD-MMĆ otklonjena u prisustvu PD98059 i SP600125 inhibitora, s obzirom da je primećen povišen nivo aktivacije ALP u odnosu na ćelije tretirane samo sa IL-17. Dobijeni rezultati su sugerisali na učešće ERK1,2 i JNK MAPK u inhibitornom delovanju IL-17 na aktivnost ALP u PD-MMĆ.



**Slika 28. Uticaj specifičnih inhibitora MAPK na IL-17-indukovanu inhibiciju aktivnosti ALP u PD-MMĆ.**

Ćelije su kultivisane tokom 7 dana u osteogenom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100ng/ml) i inhibitora MAPK: 10  $\mu$ M SB20308 (SB) za p38, 25  $\mu$ M PD98059 (PD) za ERK1,2 i 10  $\mu$ M SP600125 (SP) za JNK. Aktivnost alkalne fosfataze određena je imunocitohemijskim bojenjem. Vrednosti su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne ćelije inkubirane u standardnom medijumu. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta urađena u duplikatu. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazane su reprezentativne fotografije.

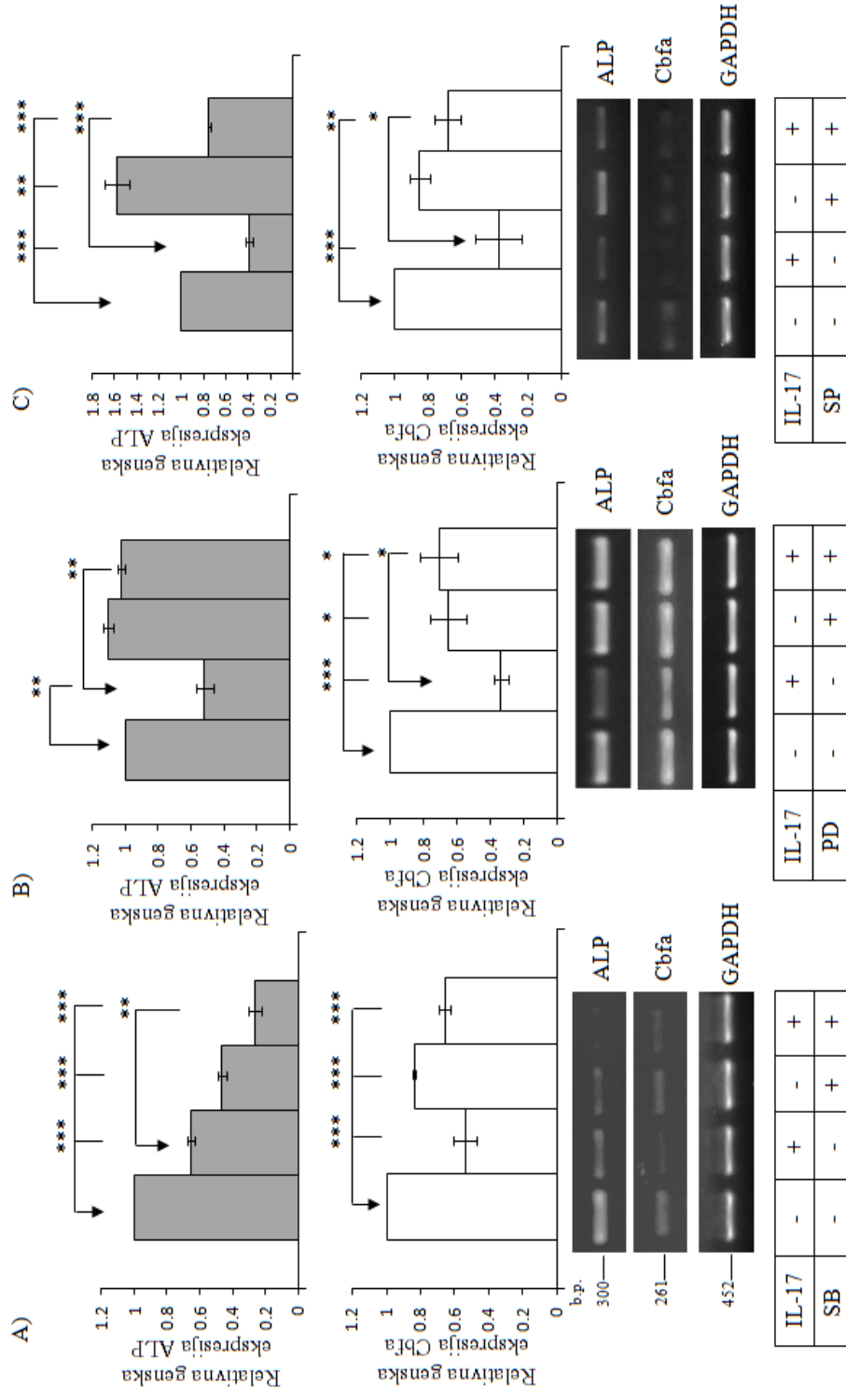
Učešće MAPK u inhibiciji osteogene diferencijacije PD-MMĆ indukovanoj IL-17 dalje je ispitivano na nivou ekspresije gena markera osteogene diferencijacije MMĆ, uključujući ALP i RUNX2/Cbfa1. U te svrhe PD-MMĆ su inkubirane u osteogenom medijumu u prisustvu inhibitora MAPK (SB203580, PD98059 ili SP600125) i IL-17 (100ng/ml) tokom 7 dana, nakon čega je izolovana iRNK. Dobijeni rezultati su potvrdili inhibitorni efekat IL-17 na ekspresiju ALP i RUNX2/Cbfa1 iRNK u PD-MMĆ. Takođe, pokazano je da sam inhibitor p38 MAPK, SB203580, dovodi do smanjenja ekspresije



ALP i RUNX2/Cbfa1 iRNK u PD-MMĆ u poređenju sa netretiranim ćelijama (**Slika 29A**), što je ukazalo na značaj aktivacije p38 MAPK u regulaciji osteogene diferencijacije PD-MMĆ. Pored toga, utvrđeno je da u kombinaciji sa IL-17, p38 inhibitor dodatno pojačava inhibitorski efekat IL-17 na ekspresiju ALP gena u PD-MMĆ, dok ne utiče značajno na IL-17 indukovano smanjenje ekspresije RUNX2/Cbfa1 gena (**Slika 29A**). Ovi nalazi su ukazali da aktivacija p38 MAPK najverovatnije ne učestvuje u IL-17 posredovanoj inhibiciji ekspresije ALP i RUNX2/Cbfa1 gena u PD-MMĆ.

Ispitivanjem efekata PD98059, ERK1,2 MAPK inhibitora, pokazano je da sam inhibitor ove MAPK nema značajnog uticaja na nivo ekspresije ALP iRNK u PD-MMĆ, dok indukuje značajno smanjenje ekspresije RUNX2/Cbfa1 iRNK u odnosu na netretirane kontrole (**Slika 29B**). S druge strane, utvrđeno da inhibicija ERK1,2 MAPK signalnog puta otklanja negativan efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ, s obzirom da dovodi do povećanja ekspresije ALP iRNK u PD-MMĆ tretiranim IL-17 vraćajući je na nivo ekspresije detektovan u netretiranim kontrolama (**Slika 29B**). Slično je pokazano da ERK1,2 MAPK inhibitor, PD98059, značajno smanjuje inhibitorski efekat IL-17 na ekspresiju RUNX2/Cbfa1 iRNK u PD-MMĆ, s obzirom da značajno povećava nivo ekspresije ovog gena u odnosu na nivo detektovan u ćelijama tretiranim samo IL-17. Dobijeni rezultati su ukazali na učešće aktivacije ERK1,2 MAPK signalnog puta u inhibitorskom delovanju IL-17 na ekspresiju ALP i RUNX2/Cbfa1 gena u PD-MMĆ.

Primenom SP600125 pokazano je da sam inhibitor JNK MAPK dovodi do povećane ekspresije ALP iRNK u PD-MMĆ u poređenju sa netretiranim kontrolama, dok na ekspresiju RUNX2/Cbfa1 iRNK ovaj inhibitor nije imao statistički značajan uticaj (**Slika 29C**). Pored toga, utvrđeno je da u kombinaciji sa IL-17 inhibitor JNK MAPK smanjuje negativan efekat IL-17 na ekspresiju ALP i RUNX2/Cbfa1 gena u PD-MMĆ, s obzirom da indukuje umereno, ali statistički značajno povećanje ekspresije iRNK za ova dva markera osteogene diferencijacije u odnosu na nivo ekspresije detektovan u uzorcima samo u prisustvu IL-17. Dobijeni rezultati su sugerisali na učešće JNK MAPK u inhibitorskom delovanju IL-17 na ekspresiju ALP i RUNX2/Cbfa1 gena u PD-MMĆ.



**Slika 29. Uticaj specifičnih inhibitora MAPK na IL-17-indukovanu inhibiciju ekspresije gena povezanih sa osteogenezom u PD-MMC.**

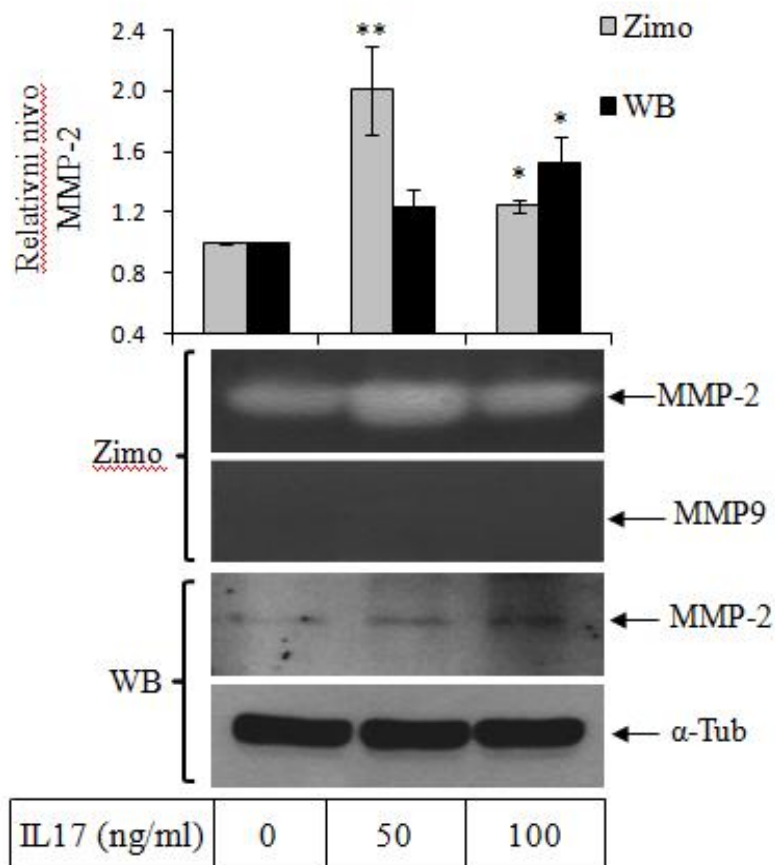
Ćelije su kultivisane tokom 7 dana u osteogenom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100ng/ml) i inhibitora MAPK: SB203580 - SB (10µM) za p38 (A), PD98059 - PD (25µM) za ERK1,2 (B) i SP600125 - SP (10µM) za JNK (C), nakon čega je izolovana iRNK. Ekspresija iRNK za ALP i Cbfa u PD-MMC određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti ± SE iz tri nezavisna eksperimenta i prikazani kao odnos intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne netretirane uzorke. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).



#### 4.6. UTICAJ IL-17 NA EKSPRESIJU MMP I UPA U PD-MMĆ

Imajući u vidu da su MMP i uPA enzimi koji učestvuju u razgradnji komponenti ECM doprinoseći na taj način progresiji parodontopatije, u daljim istraživanjima je ispitivan uticaj IL-17 na ekspresiju ovih enzima u PD-MMĆ. U te svrhe, nakon 24 h kultivacije ćelija u prisustvu rastućih koncentracija IL-17 (0, 50 i 100ng/ml), prikupljeni su kultivacioni medijumi (KM), izolovani proteini i iRNK. Aktivnost sekretovanih MMP od strane PD-MMĆ analizirana je metodom zimografije u KM tretiranih ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da u obe primenjene koncentracije IL-17 indukuje blago, ali statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti MMP-2 sekretovane od PD-MMĆ (**Slika 30**). Western blot analizom dodatno je pokazano da IL-17 indukuje i povećanu unutarćelijsku ekspresiju MMP-2 proteina u PD-MMĆ. S druge strane, ekspresija sekretovane MMP-9 nije detektovana u KM kako netretiranih, tako i IL-17 tretiranih PD-MMĆ.

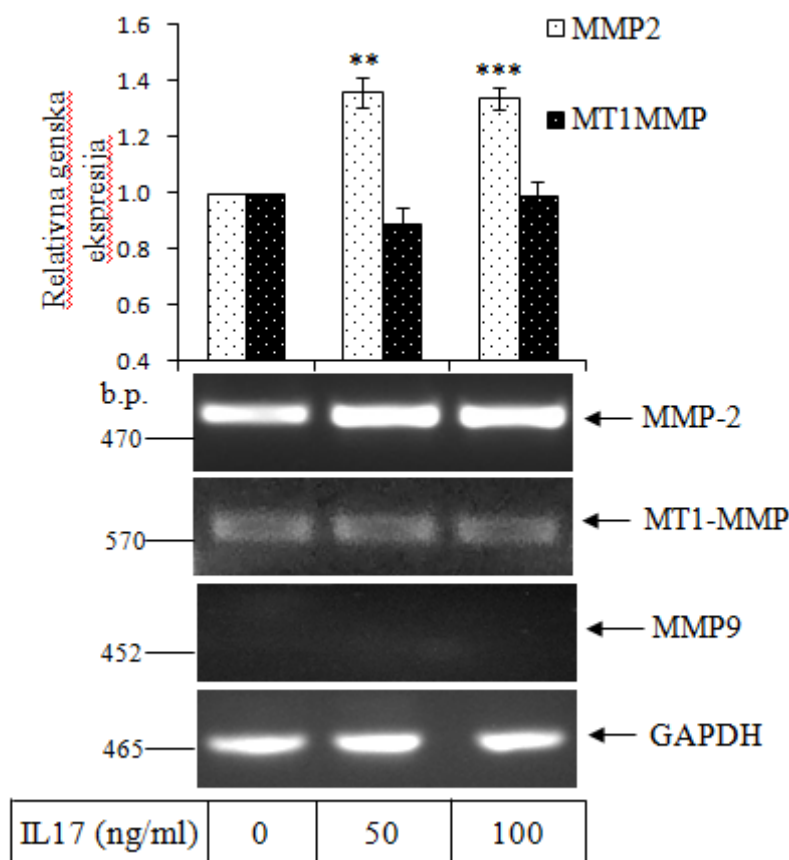
Analiza genske ekspresije potvrdila je ove nalaze, s obzirom da je u PD-MMĆ tretiranim sa IL-17 RT-PCR metodom detektovano blago, ali statistički značajno povećanje ekspresije gena za MMP-2 u poređenju sa nivoom ekspresije detektovanim kod netretiranih kontrola (**Slika 31**). S druge strane, dobijeni rezultati su pokazali da IL-17 nema uticaja na ekspresiju gena za aktivator MMP-2, MT1-MMP, u ovim ćelijama. Pored toga, slično rezultatima zimografije, ekspresija MMP-9 nije detektovana ni na genskom nivou kako u netretiranim, tako i u PD-MMĆ tretiranim sa IL-17.



**Slika 30. Uticaj IL-17 na ekspresiju enzimski aktivnih MMP u PD-MMĆ.**

Ćelije su inkubirane 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml). Nakon inkubacije, metodom zimografije (Zimo) određena je enzimska aktivnost MMP-2 i MMP-9 u kondicioniranim medijumima, a Western blot (WB) metodom ekspresija unutarćelijske MMP-2. Za WB je korišćen  $\alpha$ -Tubulin kao kontrola za približno iste količine uzoraka proteina. Vrednosti nivoa aktivnosti za zimografiju predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretiranu kontrolu, a za WB kao relativan odnos ekspresije MMP-2 i  $\alpha$ -Tubulina u ispitivanom uzorku normalizovan u odnosu na netretiranu kontrolu. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*  $p < 0.05$ . Prikazani su reprezentativni gelovi i imunoblotovi.



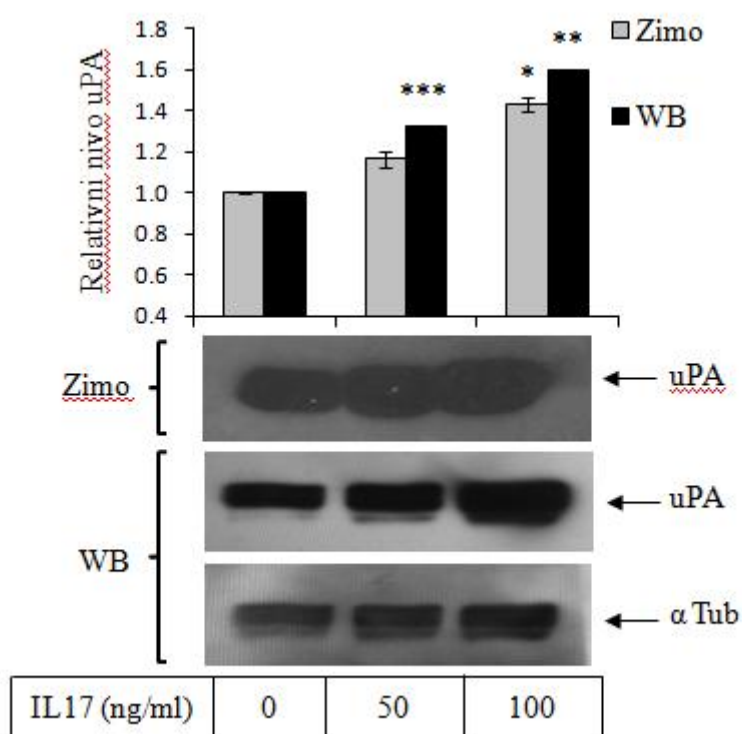


**Slika 31. Uticaj IL-17 na ekspresiju gena za MMP2 i MT1-MMP u PD-MMĆ.**

Ćelije su kultivisane tokom 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) nakon čega je izolovana iRNK. Ekspresija iRNK za MMP-2 i MT1-MMP u PD-MMĆ određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljani kao odnos intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne uzorke kultivisane bez IL-17. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Predstavljani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).

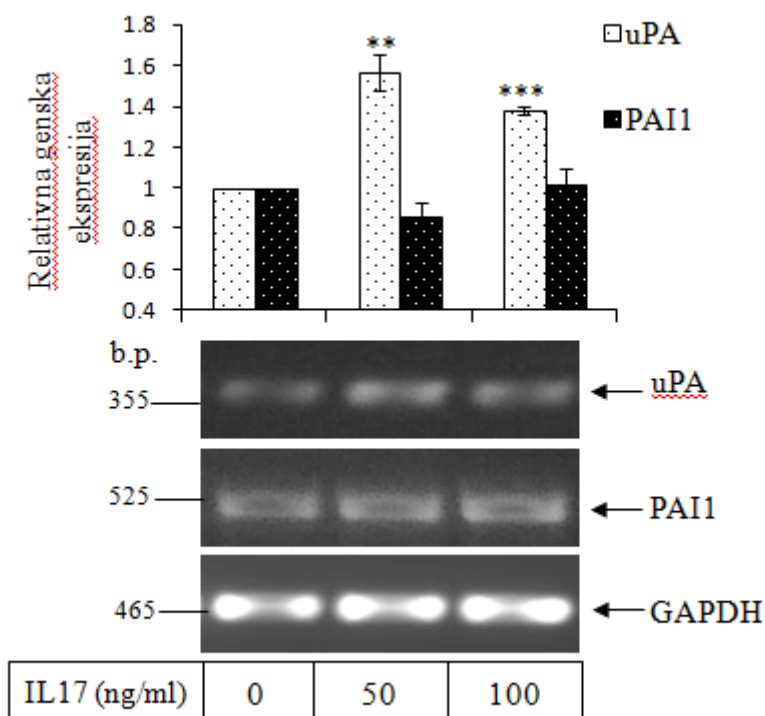
Rezultati analize ekspresije uPA u PD-MMĆ su pokazali da IL-17 ispoljava stimulatorni efekat na aktivnost i ekspresiju ovog enzima. Naime, kada je metodom zimografije analizirana aktivnost sekretovanog uPA u KM testiranih ćelija, utvrđeno je da IL-17 na dozno zavisani način dovodi do blagog, ali statistički značajnog povećanja enzimske aktivnosti uPA u PD-MMĆ (**Slika 32**). Slično tome, kada je Western blot metodom praćena ekspresija unutarćelijskog proteina uPA pokazano je da IL-17 indukuje dozno zavisno povećanje ekspresije uPA proteina u PD-MMĆ (**Slika 32**).

Stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju uPA potvrđen je i analizom genske ekspresije ovog enzima. Kao što se vidi iz rezultata dobijenih RT-PCR metodom, prikazanih na **Slici 33**, IL-17 je doveo do blagog, ali statistički značajnog povećanja genske ekspresije uPA u PD-MMĆ u poređenju sa netretiranim kontrolama. Pored toga, dobijeni rezultati su pokazali da IL-17 nema uticaja na ekspresiju gena za inhibitor uPA, PAI1, u ovim ćelijama.



**Slika 32. Uticaj IL-17 na ekspresiju enzimski aktivnog uPA u PD-MMĆ.**

Ćelije su inkubirane 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml). Nakon inkubacije, metodom zimografije (Zimo) je određena enzimska aktivnog uPA u kondicioniranim medijumima, a Western blot (WB) metodom ekspresija unutarćelijskog uPA. Za WB je korišćen  $\alpha$ -Tubulin kao kontrola približno iste količine uzorka. Vrednosti nivoa ekspresije za zimografiju predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretiranu kontrolu, a za WB kao relativan odnos ekspresije uPA i  $\alpha$ -Tubulina u ispitivanom uzorku normalizovan u odnosu na netretiranu kontrolu. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni gelovi i imunoblotovi.



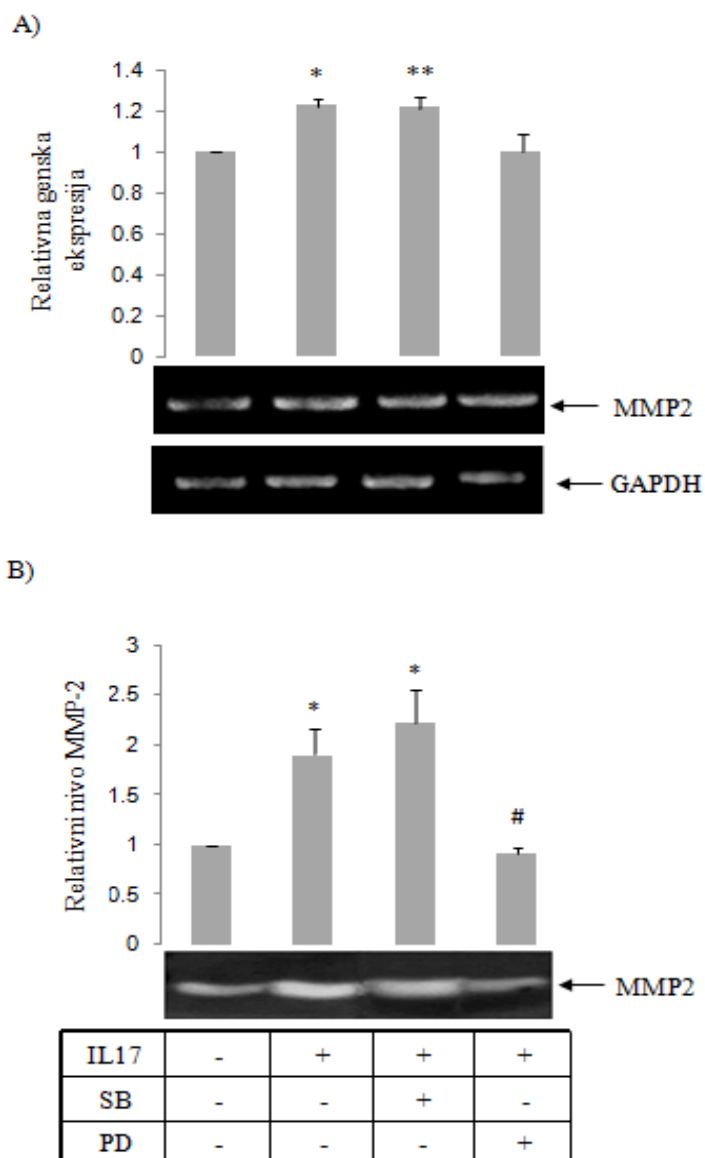
**Slika 33. Uticaj IL-17 na ekspresiju gena za uPA i PAI-1 u PD-MMĆ.**

Ćelije su kultivisane tokom 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) nakon čega je izolovana iRNK. Ekspresija iRNK za uPA i PAI-1 u PD-MMĆ određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljani kao odnos intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne uzorke kultivisane bez IL-17. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).



#### 4.7. UČEŠĆE P38 I ERK1,2 MAPK U IL-17 INDUKOVANOJ EKSPRESIJI MMP I UPA U PD-MMĆ

Poznato je da citokinima aktivirane p38 i ERK1,2 MAPK mogu da učestvuju u regulaciji aktivnosti MMP-2 i uPA u različitim tipovima ćelija (*Zhong i sar., 2006; Kocić i sar., 2013*). S obzirom na pokazan uticaj IL-17 na aktivaciju ovih MAPK, u daljim istraživanjima je upotrebom specifičnih inhibitora p38 i ERK1,2 MAPK, SB203580 i PD98059, ispitivano učešće ovih signalnih molekula u delovanju IL-17 na ekspresiju MMP-2 i uPA u PD-MMĆ. Rezultati dobijeni metodom zimografije su pokazali da tretman ćelija inhibitorom p38 MAPK signalnog puta ne utiče na IL-17 stimulisanu povećanje ekspresije enzimski aktivne MMP-2 u PD-MMĆ, s obzirom da je pokazan isti nivo aktivnosti MMP-2 u ćelijama tretiranim sa IL-17 i SB203580 inhibitorom, kao i u ćelijama tretiranim samo sa IL-17 (**Slika 34A**). Ovi nalazi su dodatno potvrđeni RT-PCR analizom ekspresije ovog enzima na genskom nivou (**Slika 34B**). S druge strane, kada su ćelije istovremeno tretirane sa inhibitorom za ERK1,2 MAPK i IL-17 utvrđeno je da inhibicija ovog signalnog puta blokira stimulatívni efekat IL-17 na ekspresiju enzimski aktivne MMP-2 u PD-MMĆ, vraćajući je na nivo detektovan u netretiranim kontrolama (**Slika 34B**). Iako je analizom na genskom nivou takođe pokazano da PD98059 inhibitor otklanja stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju MMP-2 i RNK u PD-MMĆ, detektovana promena nije bila statistički značajna (**Slika 34A**). Dobijeni rezultati sugerišu na učešće aktivacije ERK1,2 MAPK signalnog puta u delovanju IL-17 na ekspresiju MMP-2 u PD-MMĆ.

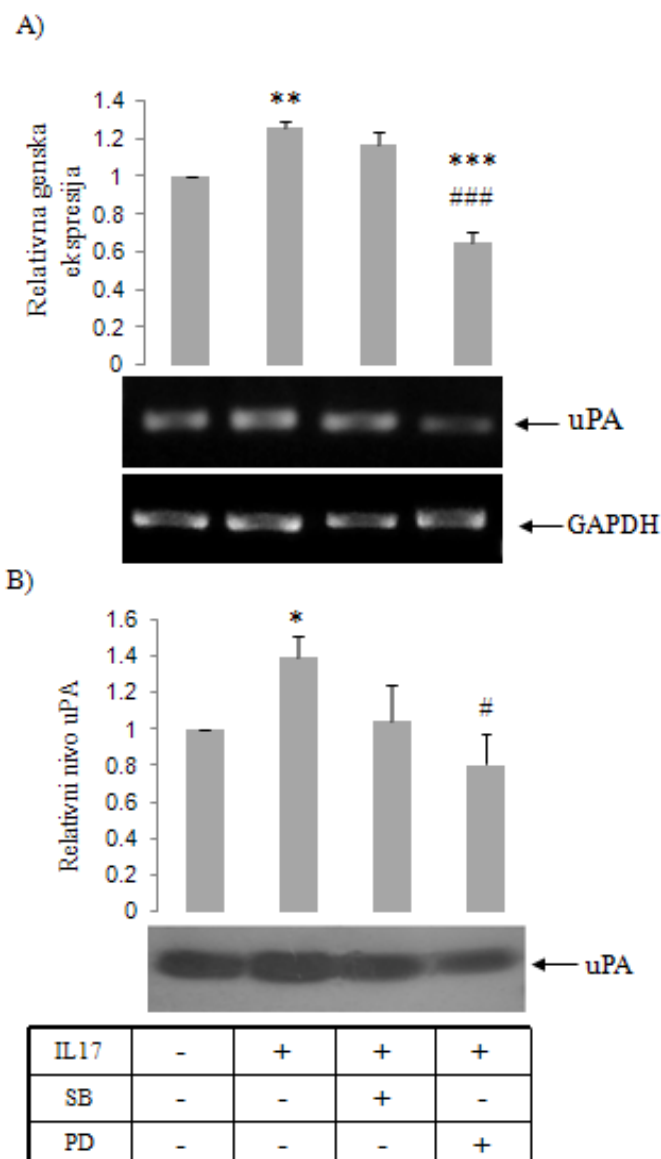


**Slika 34. Uticaj specifičnih inhibitora p38 i ERK1,2 MAPK na IL-17-indukovanu ekspresiju MMP-2 u PD-MMĆ.**

Ćelije su kultivisane 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100ng/ml) i inhibitora SB203580 - SB (10 $\mu$ M) za p38 i PD98059 - PD (25 $\mu$ M) za ERK1,2 MAPK. (A) Ekspresija iRNK za MMP-2 u PD-MMĆ određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao odnos ekspresije gena za MMP-2 i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne netretirane uzorke. Prikazani su reprezentativni gelovi. (B) Metodom zimografije određivana je enzimska aktivnost MMP-2 u kondicioniranim medijumima PD-MMĆ. Vrednosti nivoa aktivnosti za zimografiju predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretiranu kontrolu. Prikazani su reprezentativni gelovi. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE za dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost: \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  u odnosu na netretirane kontrolne uzorke, #  $p < 0.01$  u odnosu na uzorke tretirane samo sa IL-17.



Rezultati ispitivanja učesća p38 i ERK1,2 MAPK u delovanju IL-17 na ekspresiju uPA u PD-MMĆ pokazali su da p38 MAPK najverovatnije ne učestvuje u prenosu signala putem kojih IL-17 indukuje povećanje ekspresije uPA u PD-MMĆ, s obzirom da je utvrđeno da inhibitor p38 MAPK, SB203580, ne menja stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju uPA iRNK u ovim ćelijama (**Slika 35A**). Slično tome, kada je zimografijom praćena ekspresija enzimski aktivnog uPA pokazano je da u istovremenom prisustvu IL-17 i SB203580 inhibitora dolazi do blagog smanjenja IL-17-stimulisane aktivnosti uPA enzima u PD-MMĆ, koje, međutim, nije bilo statistički značajno (**Slika 35B**). S druge strane, kada su ćelije istovremeno tretirane sa IL-17 i inhibitorom ERK1,2 MAPK utvrđeno je da inhibicija ovog signalnog puta otklanja stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju uPA iRNK u PD-MMĆ, smanjujući nivo ekspresije uPA iRNK ispod bazalnog nivoa detektovanog kod netretiranih kontrola (**Slika 35A**). Takođe je pokazano da PD98059 inhibitor blokira stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju enzimski aktivnog uPA u PD-MMĆ vraćajući je na nivo detektovan kod netretiranih kontrola (**Slika 35B**). Dobijeni nalazi su ukazali da je aktivacija ERK1,2 MAPK signalnog puta uključena u IL-17 indukovanu stimulaciju ekspresije uPA u PD-MMĆ.



**Slika 35. Uticaj specifičnih inhibitora p38 i ERK1,2 MAPK na IL-17-indukovanu ekspresiju uPA u PD-MMĆ.**

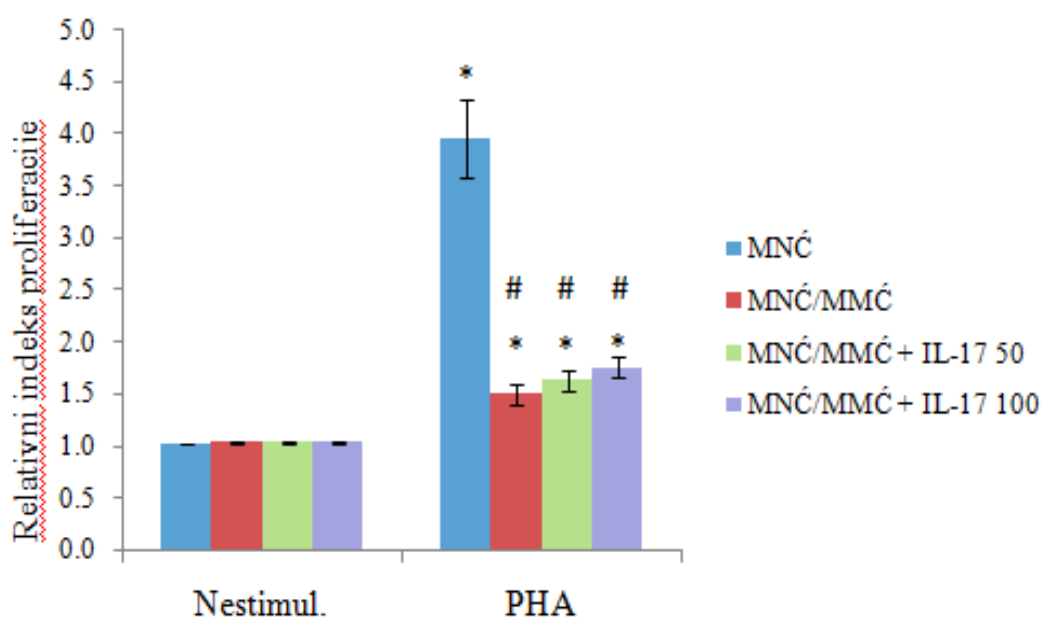
Ćelije su kultivisane 24 h u standardnom medijumu bez seruma u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100ng/ml) i inhibitora SB203580 - SB (10 $\mu$ M) za p38 i PD98059 - PD (25 $\mu$ M) za ERK1,2 MAPK. (A) Ekspresija iRNK za uPA u PD-MMĆ određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao odnos ekspresije gena za uPA i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne netretirane uzorke. Prikazani su reprezentativni gelovi. (B) Metodom zimografije određivana je ekspresija enzimski aktivnog uPA u kondicioniranim medijumima PD-MMĆ. Vrednosti nivoa ekspresije za zimografiju predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretiranu kontrolu. Prikazani su reprezentativni gelovi. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE za dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  u odnosu na netretirane kontrolne uzorke, #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  u odnosu na uzorke tretirane samo sa IL-17.



#### 4.8. UTICAJ IL-17 NA IMUNOMODULATORNA SVOJSTVA PD-MMĆ

Izučavanje imunomodulatornog potencijala MMĆ predmet je brojnih aktuelnih istraživanja koja imaju za cilj da ispituju i definišu ulogu ovih ćelija u razvoju različitih imunoloških oboljenja, kao i mogućnosti njihove kliničke primene u terapiji. Naime, dosadašnja saznanja su pokazala da imunomodulatorna sposobnost MMĆ zavisi od različitih faktora mikrosredine, te da MMĆ mogu ispoljiti kako inhibitorni, tako i stimulatorni efekat na proliferaciju limfocita. Imajući u vidu ove podatke, naredni cilj istraživanja bio je da se ispita uticaj PD-MMĆ na proliferaciju mitogenom stimulisanih limfocita, kao i uticaj IL-17 na ovu funkciju PD-MMĆ. U te svrhe su PD-MMĆ, prethodno kultivisane tri dana u standardnom medijumu bez ili sa dodatkom IL-17 (50 i 100 ng/ml), postavljene u kokulture sa CFSE obeleženim monukleranim ćelijama (MNĆ) periferne krvi. Uticaj PD-MMĆ na mitogenom (PHA) indukovanu proliferaciju alogenih MNĆ je ispitivan korišćenjem i merenjem intenziteta fluorescence nakon inkorporacije CFSE u žive ćelije. Obeležavanje MNĆ sa antitelom za CD3, marker T limfocita, omogućilo je da se metodom protočne citometrije prati proliferacija T limfocita u ukupnoj populaciji ispitivanih MNĆ. Rezultati dobijeni u testu proliferacije, prikazani na **Slici 36**, su pokazali da PD-MMĆ ne utiču na spontanu proliferaciju T limfocita, ali da značajno inhibiraju proliferaciju T limfocita u odgovoru na PHA ukazujući na imunosupresivni potencijal PD-MMĆ. Pored toga je utvrđeno da IL-17 nema uticaja na ovo svojstvo PD-MMĆ, s obzirom da prethodna kultivacija PD-MMĆ sa IL-17 ne dovodi do statistički značajne promene u inhibitornom delovanju ovih ćelija na proliferaciju T limfocita stimulisanu sa PHA.





**Slika 36. Uticaj IL-17 na imunomodulatornu sposobnost PD-MMĆ.**

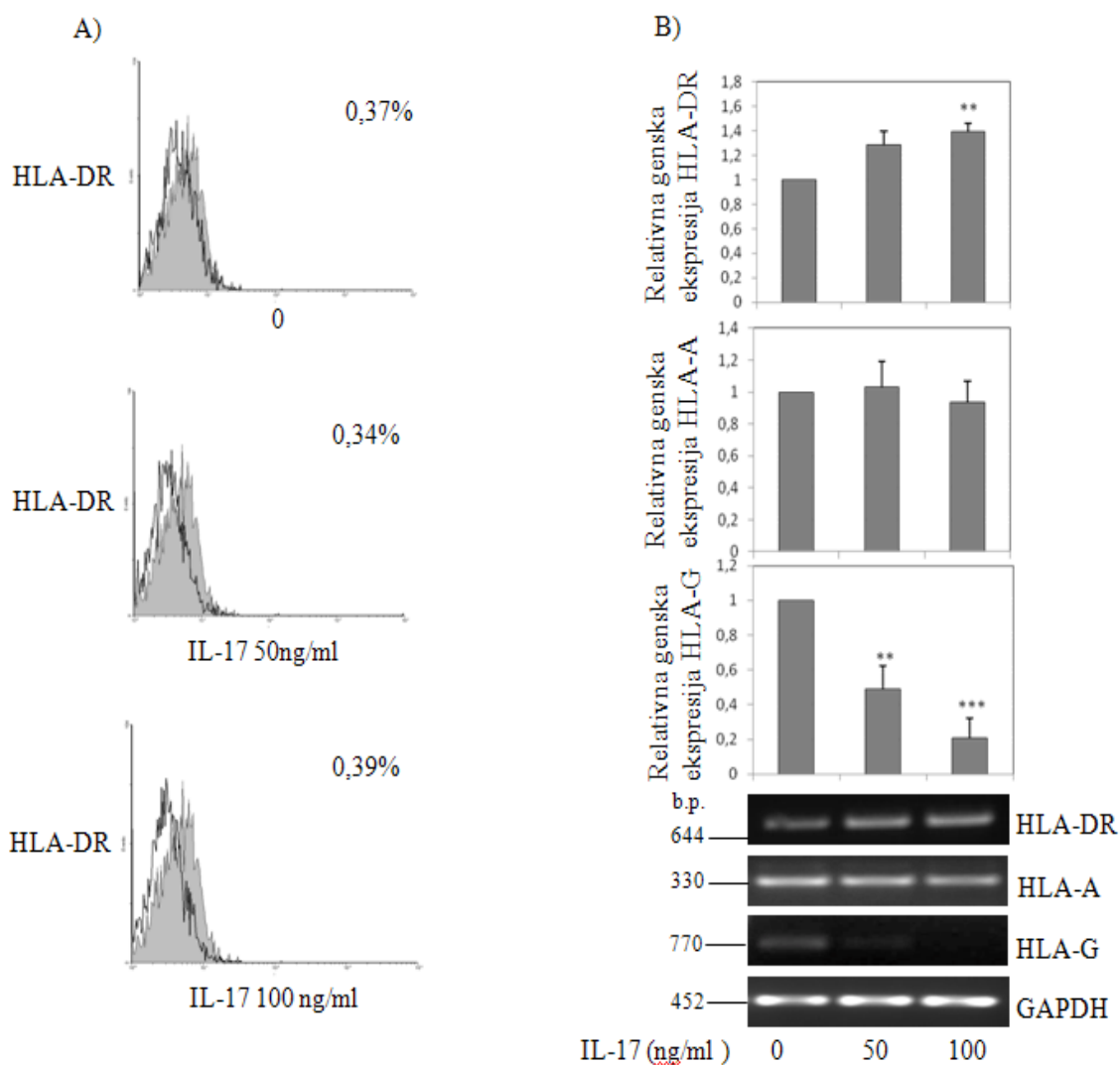
MMĆ prethodno inkubirane tri dana u standardnom medijumu bez ili u prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) su tretirane mitomicinom (50  $\mu$ g/ml) 30 min, a potom narednih 5 dana kokultivirane sa CFSE obeleženim alogenim mononuklearnim ćelijama (MNC) stimulisanim PHA (2.5 $\mu$ g/ml) u odnosu 1:10. Nakon pet dana ko-kultivacije ćelije su obeležavane anti-CD3 antitelom konjugovanim PE. Proliferacija T limfocita je određivana na osnovu detekcije CFSE fluorescence na protočnom citometru i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i samih nestimuliranih limfocita (indeks proliferacije). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: \*  $p < 0.05$  u odnosu na netretirane kontrolne uzorke, #  $p < 0.05$  u odnosu na uzorke tretirane samo sa PHA.

Uticaj IL-17 na gensku ekspresiju molekula povezanih sa imunomodulatornim potencijalom MMĆ, poput molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa i parakrinih medijatora imunskog odgovora, ispitan je metodom RT-PCR nakon 24h inkubacije PD-MMĆ sa ovim citokinom. Rezultati dobijeni ispitivanjem ekspresije HLA-A, HLA-G5, HLA-DR, IDO-1 i IL-6, su pokazali da se geni za ove molekule koji imaju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora konstitutivno ekspimiraju u PD-MMĆ (Slika 37B). Upoređivanjem genske ekspresije ovih molekula nakon tretmana sa IL-17 pokazano je da IL-17 nema uticaja na ekspresiju HLA-A gena, ali da dovodi do dozno zavisnog smanjenja genske ekspresije HLA-G molekula u PD-MMĆ u poređenju sa njegovom ekspresijom u netretiranim ćelijama. S druge strane, takođe je utvrđeno da IL-17 u većoj koncentraciji (100 ng/ml) indukuje statistički značajno povećanje genske ekspresije molekula HLA-DR u PD-MMĆ (Slika 36B). U isto vreme, uticaj različitih



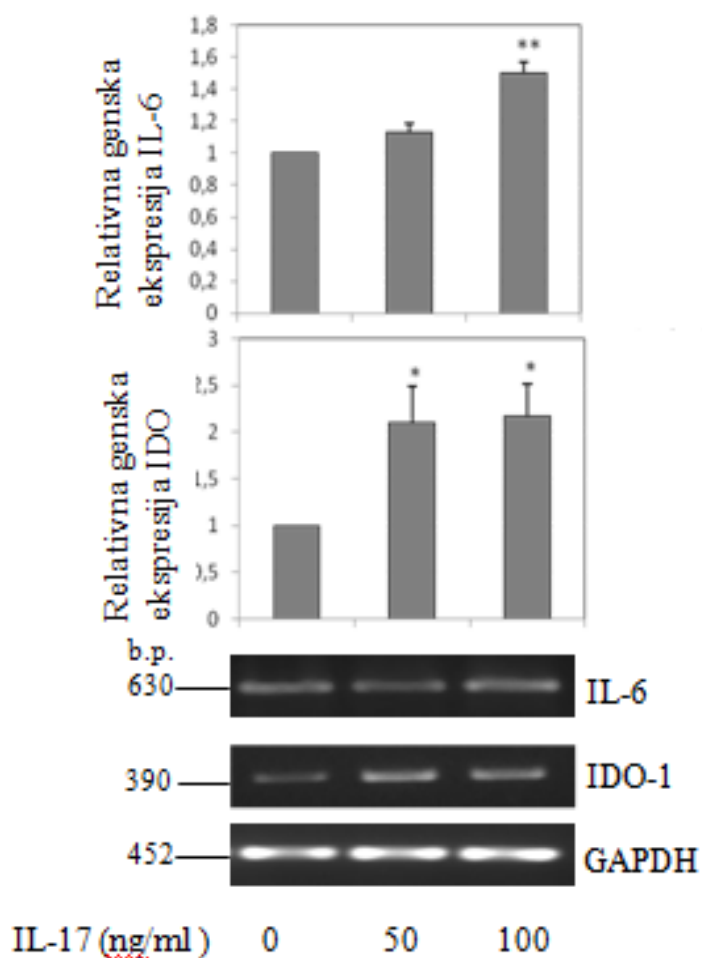
koncentracija IL-17 na površinsku ekspresiju HLA-DR ispitivan je protočnom citometrijom nakon 48 h inkubacije PD-MMĆ sa ovim citokinom. Pri tome je utvrđeno da veoma mali procenat PD-MMĆ (manje od 1%) eksprimira HLA-DR molekul na svojoj površini, kao i da tretman različitim koncentracijama IL-17 nije imao značajan uticaj na ekspresiju ovog molekula (**Slika 37A**).

Rezultati dobijeni analizom uticaja IL-17 na gensku ekspresiju parakrinih medijatora imunskog odgovora su pokazali da IL-17 primenjen u koncentraciji od 50 ng/ml nema efekta na konstitutivnu ekspresiju gena za IL-6, ali da u većoj koncentraciji (100 ng/ml) dovodi do blagog, statistički značajnog povećanja ekspresije ovog gena u PD-MMĆ (**Slika 38**). Takođe je utvrđeno da IL-17, u obe primenjene koncentracije (50 i 100 ng/ml), dovodi do statistički značajnog povećanja ekspresije gena za IDO-1 u PD-MMĆ u poređenju sa nivoom ekspresije detektovanim u netretiranim ćelijama (**Slika 38**).



**Slika 37. Uticaj IL-17 na ekspresiju molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa (HLA-DR, HLA-A i HLA-G) u PD-MMC.**

(A) Površinska ekspresija HLA-DR molekula na PD-MMC određena protočnom citometrijom: Čelije su inkubirane u standardnom medijumu bez ili u prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) tokom 48 h. Nakon inkubacije, čelije su obeležavane anti-HLA-DR antitelom konjugovanim FITC. Prikazani su reprezentativni histogrami ekspresije HLA-DR (nebojeni deo) u poređenju sa izotipskim kontrolama (sivo obojeno) sa naznačenim procentima čelija koje ispoljavaju površinski HLA-DR molekul u odnosu na ukupan broj analiziranih čelija. (B) Ekspresija iRNK za HLA-DR, HLA-A i HLA-G u PD-MMC određena metodom RT-PCR: Čelije su 24 h kultivisane u standardnom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) nakon čega je izolovana iRNK. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao odnos intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne uzorke kultivisane bez IL-17. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).



**Slika 38. Uticaj IL-17 na ekspresiju IL-6 i IDO-1 gena u PD-MMC.**

Ćelije su 24 h kultivisane u standardnom medijumu u odsustvu ili prisustvu IL-17 (50 i 100ng/ml) nakon čega je izolovana iRNK. Ekspresija iRNK za IL-6 i IDO u PD-MMC određena je metodom RT-PCR. GAPDH je primenjen kao kontrola za istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao odnos intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH normalizovan u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne uzorke kultivisane bez IL-17. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SE za dva nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske težine dobijenih PCR produkata su izražene u baznim parovima (b.p.).

# 5. DISKUSIJA





U poslednjih nekoliko decenija istraživanja na polju biologije i terapijske primene MMĆ su intenzivirana s obzirom na obećavajuće rezultate. Međutim, uloga ovih ćelija u regeneraciji tkiva, imunomodulaciji i regulaciji hematopoeze još uvek nije dovoljno istražena. S obzirom da ne postoje jedinstveni kriterijumi identifikacije i karakterizacije MMĆ, kao i da postoje brojna pitanja vezana za regulaciju funkcija MMĆ, ove ćelije se još uvek smatraju nebezbednim za kliničku primenu. Takođe, na osnovu dosadašnjih rezultata, uloga MMĆ u regeneraciji tkiva i organa nije u potpunosti razjašnjena, te su neophodna dodatna istraživanja da bi se u potpunosti sagledao njihov terapijski potencijal.

U osnovi razvoja parodontopatije, koja predstavlja hronično inflamatorno oboljenje potpornog tkiva zuba uzrokovano bakterijama zubnog plaka, uloga lokalne mikrosredine predstavlja jedan od ključnih faktora u kontekstu odgovora organizma na perzistentnu infekciju. Poznato je da lokalna inflamatorna reakcija na bakterijsku infekciju dovodi do sekrecije brojnih citokina, i drugih inflamatornih medijatora, uz regrutovanje različitih tipova imunskih ćelija (*Kayal i sar., 2013*). IL-17 je jedan od važnih faktora mikrosredine parodontocijuma u parodontopatiji, s obzirom da je u okviru parodontalnih lezija pokazano prisustvo Th17 ćelija (*Cardoso i sar., 2009*). Takođe je pokazan i povećan nivo IL-17 u serumu i sulkusnoj tečnosti gingive pacijenata koji boluju od parodontopatije (*Shaker i Ghallab, 2012; Schenkein i sar., 2010; Vernal i sar., 2005*), koji takođe doprinose inflamatornom miljeu obolelog tkiva. Među različitim tipovima ćelija zastupljenim u lokalnoj mikrosredini parodontocijuma nalaze se i PD-MMĆ za koje je pokazano da mogu pozitivno uticati na regeneraciju tkiva, s obzirom da poseduju karakteristike MMĆ uključujući sposobnost samoobnove, multipotentne diferencijacije, ali i inhibicije imunskog odgovora (*Racz i sar., 2014*), kao i formiranja tkiva sličnih potpornom tkivu zuba uključujući periodoncijum i cement (*Seo i sar., 2004*). Međutim, biološki efekti i mehanizmi delovanja IL-17 kao proinflamatornog citokina na funkcionalne osobine PD-MMĆ još uvek nisu istraženi. Imajući u vidu značaj lokalne mikrosredine oštećenog tkiva parodontocijuma u modulaciji funkcija PD-MMĆ, istraživanja u sklopu ove teze izvedena su u cilju ispitivanja uloge IL-17 u regulaciji regenerativnog i imunomodulatornog potencijala ovih ćelija.



U istraživanjima obuhvaćenim ovom disertacijom uspešno smo izolovali i okarakterisali humane PD-MMĆ. U skladu sa kriterijumima za karakterizaciju MMĆ propisanim od Komiteta za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar. 2006*), ćelije izolovane u našoj laboratoriji iz tkiva periodoncijuma zdravih osoba su pokazale sposobnost adherentnosti za plastiku, tipičnu morfologiju ćelija koje podsećaju na fibroblaste, sposobnost samoobnove i formiranja CFU-F kolonija, ekspresiju karakterističnih mezenhimskih markera, kao i multipotentni potencijal diferencijacije u ćelije osteogene, hondrogene i adipogene loze kod svih ispitivanih donora, što je u skladu sa do sada objavljenim podacima o PD-MMĆ (*Zhu i sar., 2015*). Kada je reč o fenotipskim markerima koje ispoljavaju PD-MMĆ, naši rezultati su potvrdili nalaze prethodno objavljenih studija (*Liu i sar., 2014; Feng i sar., 2010; Zhu i sar., 2013*) da MMĆ izolovane iz periodoncijuma u visokom procentu (preko 90%) ekspimiraju markere karakteristične za MMĆ (CD44, CD90, CD105, CD73 i CD29), uz minimalnu ekspresiju markera hematopoetskih ćelija, (CD34, CD45, CD235a, CD11b) i antigen prezentujućih ćelija (HLA-DR) (1-2%). Deo naših istraživanja odnosio se na ispitivanje ekspresije markera specifičnih za embrionalne matične ćelije, kao što su Nanog, SOX-2, Oct-4, i SSEA4. Analizom na protočnom citometru pokazano je da preko 70% ćelija eksprimira Nanog i Sox2, dok je oko 30% ćelija SSEA4 pozitivno. Pokazana ekspresija Nanog, Sox2, Oct4 i SSEA4 u PD-MMĆ u saglasnosti je sa nalazima iz literature o pozitivnoj ekspresiji embrionalnih markera u različitim tipovima MMĆ izolovanim iz različitih izvora (*Reikstina i sar., 2009*), uključujući i PD-MMĆ (*Huang i sar., 2009; Trubiani i sar., 2010*). Dodatno, ekspresija transkripcionih faktora Nanog, Oct4, Sox2, kao i površinskog molekula SSEA-4, na PD-MMĆ potvrđena je u našim istraživanjima i imunofluorescentnim obeležavanjem, kao i na genskom nivou RT-PCR analizom ekspresije Nanog, Oct-4A, Oct4-B i SOX-2 gena. Iako je uloga faktora pluripotentnosti dokazana u regulaciji samoobnove i diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija (*Wang i sar., 2012*), njihova ekspresija i uloga u MMĆ još uvek nije dovoljno istražena (*Tsai i sar., 2012*). U dosadašnjim istraživanjima, poređenjem ćelija iz različitih dentalnih tkiva je pokazano da su PD-MMĆ manje primitivne od MMĆ poreklom iz dentalne pulpe (*Ponnaiyan i sar., 2012*), mada su naši rezultati pokazali da ove ćelije u značajno većem procentu ispoljavaju markere pluripotentnosti od MMĆ izolovanih iz periferne krvi i masnog tkiva



(Trivanović i sar., 2015). Podaci o povećanoj ekspresiji Oct-4 i Nanog tokom ranih faza osteogene diferencijacije MMĆ kostne srži (Tsai i sar., 2010), ukazuju da pored uloge u održavanju pluripotencnosti embrionalnih matičnih ćelija, ekspresija embrionalnih markera može biti takođe važna i za određivanje potencijala diferencijacije matičnih ćelija.

Naredni deo istraživanja odnosio se na ispitivanje uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ uključujući proliferaciju, klonogeni kapacitet, migraciju i osteogenu diferencijaciju. Kao što se očekivalo, naši rezultati pozitivne ekspresije IL-17R na PD-MMĆ su još jednom potvrdili ubikvitarnu ekspresiju ovog receptora. Dobijeni rezultati su u skladu sa do sada pokazanom ekspresijom IL-17R na različitim stromalnim ćelijama, uključujući humane i mišje MMĆ kostne srži (Silva i sar., 2003; Huang i sar., 2009; Mojsilović i sar., 2011), ali i na ćelijama tkiva parodontijuma, poput epitelnih ćelija gingive, gingivalnih fibroblasta i fibroblasta periodoncijuma (Hosokawa i sar., 2009; Takahashi i sar., 2011; Zhu i sar., 2011).

Što se tiče efekata IL-17 na proliferaciju PD-MMĆ, naši rezultati su pokazali da ovaj citokin dovodi do blagog smanjenja proliferacije PD-MMĆ samo nakon 24 h inkubacije. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na stimulatorni uticaj IL-17 na proliferaciju humanih i mišjih MMĆ kostne srži (Huang i sar., 2009; Mojsilović i sar., 2011), endometrijalnih stromalnih ćelija i epitelnih ćelija disajnih puteva (Inoue i sar., 2006, Hirata i sar., 2008). Suprotno, pokazano je i da TNF $\alpha$ , citokin koji luče i Th17 ćelije, ima inhibitorno dejstvo na proliferaciju PD-MMĆ, kao i na MMĆ kostne srži inkubirane u osteogenom medijumu (Zhang i sar., 2014). S obzirom da IL-17 često ne ispoljava svoje efekte samostalno već u kombinaciji sa drugim faktorima i da često ima aditivno dejstvo sa TNF $\alpha$  (Fossiez i sar., 1996), neophodna su dodatna istraživanja kako bi se ispitalo da li IL-17 u kontekstu inflamatorne mikrosredine oštećenog tkiva parodontijuma ostvaruje svoje delovanje na proliferaciju PD-MMĆ u kombinaciji sa TNF $\alpha$ . Takođe, najnoviji podaci ukazuju da IL-17 ne deluje na proliferaciju fibroblasta periodoncijuma (Wu i sar., 2014), kao i da deluje inhibitorno na proliferaciju neuralnih MĆ (Li i sar., 2013). Iako su PD-MMĆ izolovane iz periodoncijuma odraslih osoba po glavnim karakteristikama sličnije MMĆ, nego ćelijama neuroektodermalnog porekla (Kaku i sar., 2012), dobijeni rezultati sugerišu na specifičnosti PD-MMĆ koje mogu biti povezane i sa njihovim poreklom (Chai i sar., 2000).





Rezultati dobijeni ispitivanjem efekata IL-17 na klonogeni potencijal PD-MMĆ su pokazali da ovaj citokin značajno, mada ne i statistički, povećava učestalost CFU-F kolonija. Relativno mali broj dobijenih kolonija kod svih donora je u skladu sa podacima iz literature koji su pokazali da manji deo populacije PD-MMĆ ima klonogeni potencijal (Seo i sar., 2004). Povećan broj kolonija nakon tretmana sa IL-17 do sad je primećen kod humanih i mišjih MMĆ izolovanih iz kostne srži (Huang i sar., 2006; Mojsilović i sar., 2011), a takođe je i u skladu sa najnovijim podacima iz literature vezanim za poređenje funkcionalnih osobina PD-MMĆ pacijenata obolelih od parodontopatije i zdravih osoba (Zheng i sar., 2015), koji su pružili dokaz da inflamatorna sredina zajedno sa svojim faktorima značajno povećava klonogenu sposobnost PD-MMĆ.

Migracija PD-MMĆ je jedna od važnih funkcija ovih ćelija. Danas se osim otkrića da IL-17 stimuliše migraciju fibroblasta periodoncijuma (Wu i sar., 2014), malo zna o uticaju IL-17 na migraciju PD-MMĆ. U dosadašnjim *in vitro* istraživanjima pokazano je da IL-17 stimuliše migraciju MMĆ kostne srži (Huang i sar., 2009), a naša istraživanja su pokazala da ovaj citokin stimuliše transendotelsku migraciju MMĆ periferne krvi (Krstić i sar., 2015<sup>b</sup>), dok inhibira migraciju mioblastne ćelijske linije C2C12 bez uticaja na proliferaciju ovih ćelija (Kocić i sar., 2012). Do sada je već pokazano da humane PD-MMĆ subkutano injektovane imunokomprimovanim pacovima imaju sposobnost migracije ka periodoncijumu (Byong i sar., 2004). Naši rezultati su po prvi put pokazali smanjenje migracije PD-MMĆ pod uticajem IL-17. Sa ovog stanovišta ne možemo isključiti mogućnost da je inhibitorni efekat IL-17 na migraciju PD-MMĆ posledica blage inhibicije proliferacije ovih ćelija pokazane nakon 24 h inkubacije sa IL-17. Međutim, ovu pretpostavku je potrebno potvrditi dodatnim eksperimentalnim dokazima.

Regenerativni potencijal MĆ je određen njihovom sposobnošću proliferacije, migracije i diferencijacije (Frescaline i sar., 2012). Stoga je sledeći korak u istraživanjima bio da se ispita uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ. U regulaciji početne faze osteogene diferencijacije glavnu ulogu ima aktivacija transkripcionog faktora RUNX2/Cbfa1 na čiju funkciju su ukazali nalazi o poremećenoj osteogenoj diferencijaciji kod miševa koji ne ekspimiraju ovaj faktor (Ducy i sar., 1997). Ulogu u regulaciji osteogeneze RUNX2/Cbfa1 ostvaruje putem regulacije



ekspresije specifičnih gena markera osteoblasta, uključujući ALP, kolagen I, BSP i Ocn (*Franceschi i Xiao, 2003*). Nakon aktivacije transkripcionih faktora, opredeljeni osteogeni progenitori se diferenciraju u preosteoblaste koji eksprimiraju ALP, jedan od najranijih markera osteogene diferencijacije. U sledećoj fazi diferencirani osteoblasti luče proteine koji ulaze u sastav koštanog matriksa, kolagen I, osteopontin, osteonektin, BSP, i eksprimiraju gene za proteine uključene u mineralizaciju matriksa, kao što je Ocn - protein marker zrelih osteoblasta s hormonskom aktivnošću. Daljom diferencijacijom osteoblasta nastaju osteociti koji održavaju strukturu koštanog tkiva i ne eksprimiraju više markere ranih osteoblasta (*Rucci, 2008*).

Naši rezultati su po prvi put pokazali inhibitorni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju humanih PD-MMĆ posredovan redukcijom ekspresije gena za ALP i Ocn. Naime, ćelije inkubirane u osteogenom medijumu 21 dan u prisustvu IL-17 su pokazale smanjenje akumulacije kalcijuma u kulturi u poređenju sa netretiranim kontrolama, kao i smanjenu aktivnost ALP nakon 7 dana inkubacije. Pored toga, analizom ekspresije gena za markere osteogene diferencijacije, ALP i Ocn, primećeno je da IL-17 indukuje statistički značajno smanjenje nivoa ekspresije iRNK za ALP i Ocn u PD-MMĆ. Za razliku od brojnih dokaza u literaturi o učešću IL-17 u procesima resorpcije kosti putem aktivacije osteoklasta (*Kotake i sar., 2009*), malo se zna o njegovoj funkciji u osteogenezi. Ipak, pokazano je da ovaj citokin utiče na proliferaciju i diferencijaciju različitih tipova MMĆ, pri čemu se literaturni podaci o uticaju IL-17 na diferencijaciju MMĆ razlikuju u zavisnosti od vrste domaćina i tkivnog porekla ćelija. Pokazano je da osim što ovaj citokin stimulatorno deluje na osteogenu diferencijaciju humanih MMĆ kostne srži (*Huang i sar., 2009; Osta i sar., 2014*) i inhibitorno na adipogenu diferencijaciju ovih ćelija (*Shin i sar., 2009*), IL-17 dovodi do inhibicije miogene diferencijacije ćelijske linije mišjih multipotentnih mioblasta C2C12 preusmeravajući i stimulišući njihovu diferencijaciju u pravcu osteogeneze (*Kocić i sar., 2012*). Međutim, noviji radovi ukazuju i na inhibitorno dejstvo IL-17 na osteogenu diferencijaciju mišjih MMĆ kostne srži *in vitro* (*Chang i sar., 2013*), kao i ćelija izolovanih iz kosti lobanje pacova *in vitro* i *in vivo* (*Kim i sar., 2014*). Dodatno je pokazano da inflamatorna mikrosredina inhibira diferencijacioni potencijal PD-MMĆ posebno u ćelije osteogene, kao i adipogene loze (*Liu i sar., 2011*), kao i da je kod pacijenata sa parodontopatijom primećen smanjen stepen osteogene diferencijacije PD-



MMĆ u odnosu na zdrave osobe (*Zheng i sar., 2015*). Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da lokalna mikrosredina, kao i tkivno poreklo MMĆ, zaista mogu imati uticaj na prirodu ispoljenog dejstva IL-17 na diferencijaciju ovih ćelija.

Poznato je da citokini ulogu u regulaciji ćelijskih funkcija ostvaruju putem vezivanja za specifične receptore i indukcijom brojnih signalnih puteva, te sledstvenom aktivacijom specifičnih transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju ciljnih gena. Dosadašnja ispitivanja signalizacije IL-17 pokazala su da se brojni efekti ovog citokina na različite tipove ćelija ostvaruju preko aktivacije različitih signalnih molekula, uključujući sve tri klase MAPK - p38, ERK i JNK (*Gaffen 2008; Gaffen i sar., 2014*). Međutim, signalni putevi uključeni u delovanje IL-17 na PD-MMĆ do sada nisu izučavani. To je bio povod da se u sklopu ove teze ispita učešće signalnih molekula MAPK kaskade u efektima IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ. U te svrhe, pored analize efekata IL-17 na aktivaciju sve tri klase MAPK u PD-MMĆ, eksperimentalni pristup zasnovan na dodavanju specifičnih farmakoloških inhibitora MAPK u kombinaciji sa IL-17 omogućio nam je da definišemo i ulogu MAPK u IL-17 posredovanoj regulaciji različitih funkcionalnih osobina PD-MMĆ. Prethodna istraživanja su pokazala da su MAPK uključene u regulaciju različitih bioloških funkcija MMĆ, uključujući indukciju osteogene diferencijacije (*Jaiswal i sar., 2000; Liu i sar., 2009; Li i sar., 2016*). Kada je reč o IL-17, do sad je pokazano da ovaj citokin aktivira sva tri tipa MAPK, ali na različit način zavisno od tipa ćelija (*Gaffen, 2008; Ivanov i Linden, 2009; Krstić i sar., 2009a; Gaffen i sar., 2014*). Rezultati naših istraživanja su pokazali da IL-17 u kratkim terminima inkubacije povećava nivo fosforilacije sve tri klase MAPK, p38, ERK1,2 i JNK, u PD-MMĆ. Iako je uočena različita kinetika aktivacije za različite MAPK, brza i perzistentna za p38, i kratkotrajna za ERK1,2 i JNK, dobijeni rezultati su jasno ukazali na učešće MAPK signalizacije u IL-17 indukovanim efektima na PD-MMĆ. Slično ovim nalazima, naša ranija istraživanja su pokazala da IL-17 stimuliše aktivaciju p38 MAPK u ukupnim ćelijama kostne srži miša (*Krstić i sar., 2009*), kao i da IL-17 indukuje aktivaciju p38 i ERK1,2 MAPK u mišjim MMĆ izolovanim iz kostne srži (*Mojsilović i sar., 2011*). Pored toga, nalazi drugih autora su pokazali učešće ERK1,2 MAPK u IL-17 stimulisanjoj proliferaciji humanih MMĆ kostne srži (*Huang i sar., 2009*). Međutim, iako je IL-17 ispoljio stimulatorni efekat na fosforilaciju p38, ERK1,2 i JNK MAPK u PD-MMĆ,



primenom farmakoloških inhibitora ovih MAPK (SB203580, PD98059 i SP60125) u našim istraživanjima je utvrđeno da ovi signalni putevi nisu uključeni u IL-17 posredovanu inhibiciju migracije PD-MMĆ. Iako je ranije pokazano da je IL-17 stimulirana migracija fibroblasta periodoncijuma posredovana p38 MAPK signalnim putem (Wu i sar., 2014), kao i da su naši prethodni rezultati pokazali učešće ERK1,2 MAPK signalnog puta u IL-17 zavisnoj indukciji migracije MMĆ periferne krvi (Krstić i sar., 2015), neophodna su dodatna istraživanja molekularnih mehanizama inhibitorynog delovanja IL-17 na migraciju PD-MMĆ koja bi uključila analizu učešća drugih signalnih molekula u ostvarivanju ovog efekta IL-17.

Dalja istraživanja u kojima su primenjeni specifični farmakološki inhibitori za p38, ERK1,2 i JNK MAPK su pokazala različito učešće ove tri MAPK u regulaciji IL-17 indukovane inhibicije osteogene diferencijacije PD-MMĆ. Dobijeni rezultati da sam inhibitor p38 MAPK dovodi do inhibicije aktivnosti ALP, kao i genske ekspresije ALP i RUNX2/Cbfa1 u PD-MMĆ, ukazali su na ključnu ulogu aktivacije p38 u regulaciji osteogene diferencijacije ovih ćelija. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazana značajna uloga p38 signalnog puta u regulaciji osteogene diferencijacije mišjih ćelija kalvarije (kosti lobanje) (Hu i sar., 2003; Wang i sar., 2007). Pored toga, s obzirom da inhibicija p38 MAPK nije promenila inhibitoryni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ mogli smo zaključiti da aktivacija p38 MAPK ne učestvuje u ostvarivanju ovog efekta IL-17. S druge strane, naši rezultati su pokazali da sama inhibicija ERK1,2 i JNK MAPK signalnih molekula stimuliše osteogenu diferencijaciju ovih ćelija, s obzirom da dovodi do povećanja nivoa aktivnosti i ekspresije ALP, mada ne i ekspresije Cbfa gena u PD-MMĆ. Osim toga, inhibicija ovih signalnih puteva je u potpunosti otklonila inhibitoryni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ ukazujući na učešće ERK1,2 i JNK MAPK signalnih puteva u delovanju IL-17 na osteogenu diferencijaciju ovih ćelija. Slično je pokazano u ranijim istraživanjima za IL-1 $\beta$  da je inhibitoryni efekat ovog citokina na aktivnost ALP pacovskih ćelija kosti lobanje delimično otklonjen inhibicijom ERK MAPK, kao i da je njegov supresivni efekat na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ otklonjen inhibicijom JNK MAPK (Lin i sar., 2009; Mao i sar., 2016). Učešće ERK1,2 MAPK u IL-17 zavisnoj indukciji osteogene diferencijacije je do sad pokazano na ćelijskoj liniji mišjih multipotentnih mioblasta C2C12 (Krstić i sar., 2012), kao i na humanim MMĆ kostne



srži (Huang i sar., 2009). O učešću JNK MAPK u delovanju IL-17 na osteogenu diferencijaciju, međutim, nema podataka u literaturi. Neophodna su dodatna ispitivanja da bi se ispitala mogućnost da je inhibitorni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ posledica uzajamnog delovanja ERK1,2 i JNK signalnih puteva koji zajedno doprinose preusmeravanju diferencijacionog potencijala PD-MMĆ.

U kontekstu boljeg razumevanja mehanizama delovanja IL-17 u razvoju i progresiji paradontopatije postavilo se pitanje sposobnosti IL-17 da moduliše ekspresiju enzima uključenih u razgradnju komponenti ECM, MMP i uPA, u PD-MMĆ. Uloga MMP i uPA u remodeliranju tkiva parodontijuma poznata je od ranije (Kapila i sar., 1996), pri čemu se zna da MMP mogu da razgrađuju sve komponente ECM, dok uPA sa svojim specifičnim receptorom uPAR (uPA receptor) učestvuje u konvertovanju plazminogena u plazmin koji razgrađuje fibrin i aktivira MMP (Wyganowska-Świątkowska i sar., 2014). Ovi enzimi igraju važnu ulogu u procesima koji zahtevaju koncentrisanu proteolitičku aktivnost poput ćelijske migracije (Legrand i sar., 2001). Povećana ekspresija uPA i PAI-1 je otkrivena u obolelom tkivu parodontijuma (Deppe i sar., 2010), a dodatne studije su ukazale na učešće plazmin sistema u razvoju paradontopatije delujući direktno ili indirektno preko aktivacije latentnih formi MMP (Bodet i sar., 2007; Lam i sar., 2015). Uz to, utvrđeno je da kontinuirana, visoka sekrecija MMP-2, MMP-3, MMP-8 i MMP-9 nakon stimulacije patogenim bakterijama doprinosi razgradnji ECM tkiva periodoncijuma (Sorsa i sar., 2004), dok je povećan nivo MMP detektovan u gingivalnom tkivu i sulkusnoj tečnosti pacijenata obolelih od paradontopatije (Ejeil i sar., 2003; Pozo i sar., 2005; Rai i sar., 2008). Pored granulocita i makrofaga, pokazano je da MMP proizvode ćelije gingive i periodoncijuma, uključujući epitelne ćelije i fibroblaste (Ejeil i sar., 2003; Utito i sar., 2003). Takođe, postoje i literaturni podaci koji pokazuju da je ekspresija i enzimska aktivnost MMP2 verovatno uključena u degradaciju ECM tokom početne faze razvoja parodontalnih lezija, kao što su pokazali Corroti i saradnici 2009. godine na eksperimentalnom modelu indukovanih periapikalnih lezija kod pacova (Corroti i sar., 2009). Međutim, informacije o uticaju IL-17 na ekspresiju MMP i uPA u ćelijama tkiva periodoncijuma su retki. Naša istraživanja su po prvi put ispitivala uticaj IL-17 na ekspresiju MMP-2, MMP-9 i uPA u PD-MMĆ i pokazala da ovaj citokin izaziva povećanje ekspresije MMP-2 i uPA enzima na genskom i proteinskom nivou, dok nema



efekta na ekspresiju MMP-9 u ovim ćelijama. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim podacima o stimulatornom uticaju IL-17 na ekspresiju MMP-2 u tumorskim ćelijama (Wang i sar., 2014), kao i sinovijalnim fibroblastima pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa (Li i sar., 2013). S druge strane, suprotni podaci da IL-17 inhibira ekspresiju MMP-2 u fibroblastima periodoncijuma ukazuju na različite uloge različitih tipova ćelija u obolelom tkivu parodontijuma (Wu i sar., 2013). Dodatno, pokazan stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju uPA u PD-MMĆ u skladu je sa našim prethodnim istraživanjima u kojima je utvrđeno da IL-17 indukuje ekspresiju uPA u MMĆ periferne krvi (Krstić i sar., 2015<sup>b</sup>). Uz to su naši nalazi da IL-17 ne utiče na gensku ekspresiju aktivatora MMP-2, MT1-MMP, kao i inhibitora uPA, PAI1, ukazali da ovi faktori ne učestvuju u IL-17 regulisanom povećanju ekspresije MMP-2 i uPA u PD-MMĆ.

Identifikacija signalnih puteva uključenih u IL-17 modulisanu ekspresiju uPA i MMP-2 u PD-MMĆ je još jedno pitanje koje može doprineti razumevanju mehanizama preko kojih IL-17 ostvaruje svoje funkcije u periodoncijumu. Naša ispitivanja signalnih puteva uključenih u regulaciju IL-17 indukovane ekspresije MMP-2, pokazala su da je aktivacija ERK1,2 MAPK signalnog puta odgovorna za IL-17 indukovano povećanje ekspresije MMP2 u PD-MMĆ. Naime, rezultati dobijeni upotrebom MAPK inhibitora su pokazali da ERK1,2 MAPK signalni put nije ključan za regulaciju IL-17 indukovane ekspresije MMP-2 gena u PD-MMĆ. S druge strane, značajno smanjen stimulatorni efekat IL-17 na enzimsku aktivnost MMP-2 u PD-MMĆ pokazan u prisustvu inhibitora ERK1,2 MAPK ukazao je da je aktivacija ovog signalnog puta u ovom procesu ključna. Iako je bilo očekivano da inhibitor ERK1,2 ostvaruje isti efekat na ekspresiju MMP-2 i na genskom i na proteinskom nivou, moguće je da je dobijena razlika povezana sa različitim mehanizmima posttranskripcione regulacije ovih enzima koji kroz različite regulatorne faze definišu njihovu finalnu ekspresiju (Racz i sar., 2014). Razlika između ekspresije MMP-2 na genskom i proteinskom nivou i/ili na nivou aktivnosti je do sada već pokazana u više studija (Gaffney i sar., 2015; Petković i sar., 2015). Učešće ERK1,2 MAPK signalnog puta u regulaciji ekspresije MMP-2 je do sad pokazano na humanojoj leukemijskoj liniji U937, kao i na humanim tumorskim ćelijskim linijama MCF-7 i MDA-MB231 kancera dojke (Liu i sar. 2010; Moulik i sar., 2014), a naši rezultati su po prvi put pokazali da je ovaj signalni put uključen u IL-17 indukovanu



ekspresiju MMP-2 u PD-MMĆ. Rezultati dobijeni korišćenjem specifičnih inhibitora MAPK signalnih puteva su pokazali da je aktivacija ERK1,2 MAPK odgovorna i za IL-17 indukovanu ekspresiju uPA u PD-MMĆ i na proteinskom i na genskom nivou. Dobijeni rezultati su u skladu sa našim nedavno objavljenim rezultatima koji su pokazali da je stimulatorno dejstvo IL-17 na ekspresiju uPA u MMĆ periferne krvi posredovano aktivacijom ERK1,2 MAPK signalnog puta (*Krstić i sar., 2015*).

U sledećem segmentu naših istraživanja ispitivali smo ulogu IL-17 na imunomodulatorna svojstva PD-MMĆ. U dosadašnjim istraživanjima najviše podataka iz literature o imunosupresorskoj prirodi MMĆ se odnosilo na MMĆ kostne srži (*Krampera i sar., 2003; Aggarwal i sar., 2005*). Kako su u međuvremenu otkriveni novi izvori MMĆ iz drugih tkiva javila se potreba za proširivanjem ispitivanja imunomodulatornih svojstava MMĆ, pa je tako utvrđeno da MMĆ ispoljavaju antiinflamatorne i imunomodulatorne osobine uzajamnim delovanjem kako na ćelije urođenog, tako i adaptivnog imunskog sistema i to putem direktnih međucelijskih kontakata i/ili sekrecijom solubilnih medijatora (*Aggarwal i Pittenger, 2005, Wang i sar., 2012, Elman i sar., 2014, Ma i sar., 2013*). Imunomodulatorna svojstva PD-MMĆ su do sada već pokazana pri čemu je potvrđeno da i ove ćelije slično MMĆ kostne srži inhibiraju mitogenom stimulisanu proliferaciju MNC periferne krvi (*Kim i sar., 2010; Wada sar., 2009*). Naša istraživanja su u skladu sa podacima o imunosupresorskoj prirodi PD-MMĆ, s obzirom da smo pokazali da PD-MMĆ inhibiraju proliferaciju mitogenom stimulisanih T ćelija periferne krvi, dok ne utiču na spontanu proliferaciju ovih ćelija.

Imajući u vidu da imunosupresorski potencijal MMĆ nije konstitutivan već se indukuje u prisustvu proinflamatornih citokina kao što su IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ili IL-1 $\beta$  (*Krampera i sar., 2011*), pretpostavlja se da je uloga faktora lokalne mikrosredine u regulaciji imunomodulatornih osobina PD-MMĆ ključna. Naime, danas je pokazano da u zavisnosti od različitih faktora mikrosredine, uključujući proinflamatorne citokine, hemokine i različite TLR agoniste, MMĆ mogu imati imunostimulatorno (M1 fenotip) ili imunosupresivno (M2 fenotip) dejstvo (*Waterman i sar., 2010*). U tom kontekstu je do sada pokazano da imunosupresorski potencijal PD-MMĆ posredovan produkcijomIDO može biti indukovano proinflamatornim citokinom IFN- $\gamma$  (*Wada i sar., 2009*).



Međutim, iako su imunosupresivni efekti PD-MMĆ pokazani, kompleksni molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih efekata su još uvek nedovoljno razjašnjeni.

U kontekstu uticaja inflamatorne mikrosredine na imunomodulatorna svojstva PD-MMĆ, sledeći cilj naših istraživanja je bio da se ispita uticaj IL-17 na imunosupresorski potencijal PD-MMĆ. Uticaj IL-17 na imunomodulatorne osobine MMĆ još uvek nije dovoljno istražen. Rezultati dobijeni u sklopu ove disertacije su pokazali da IL-17 nema uticaja na inhibiciju proliferacije mitogenom stimulisanih T limfocita od strane PD-MMĆ. U skladu sa ovim nalazima su i naši preliminarni neobjavljeni rezultati koji su pokazali da IL-17 ne utiče na imunosupresorska svojstva mišjih MMĆ kostne srži, kao ni humanih MMĆ periferne krvi (*Mojsilović i sar., 2015*), tako da se samo može spekulirati da IL-17 sam nije dovoljan signal za modulaciju imunosupresivnog potencijala MMĆ.

U okviru ispitivanja uticaja IL-17 na imunomodulatorna svojstva PD-MMĆ u sledećem koraku naših istraživanja analiziran je uticaj IL-17 na ekspresiju molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa i različitih parakrinih medijatora potencijalno odgovornih za imunomodulatorne efekte PD-MMĆ.

HLA-DR je MHC molekul II klase eksprimiran na profesionalnim antigen prezentujućim ćelijama, koji učestvuje u aktivaciji imunskog sistema putem prezentacije antigena T-limfocitima. Međutim, u uslovima inflamacije, može doći do ekspresije ovog molekula i na neprofesionalnim antigen-prezentujućim ćelijama, uključujući i MMĆ, na kojima HLA-DR nije konstitutivno ispoljen, ali se detektuje kada su MMĆ stimulisane inflamatornim medijatorima (*Najar i sar., 2012*). Rezultati dobijeni u sklopu našeg istraživanja pokazuju da PD-MMĆ konstitutivno ne eksprimiraju HLA-DR na svojoj površini (<2 % ćelija) što je u skladu sa podacima iz literature (*Wada i sar., 2009*). S druge strane, nalazi dobijeni RT-PCR analizom su pokazali konstitutivnu ekspresiju gena za HLA-DR u ovim ćelijama. Ovi podaci su u saglasnosti sa dosadašnjim rezultatima u kojima je pokazano da se HLA-DR konstitutivno eksprimira intracelularno, ali ne i na površini MMĆ kostne srži, dok se njegova ekspresija može detektovati na površini MMĆ samo kada su izložene inflamatornim citokinima (*Le Blanc i sar., 2003; Romieu-Mourez i sar., 2007*). Dodatno, naši rezultati su pokazali da IL-17 nema uticaj na ekspresiju HLA-DR na PD-MMĆ, ali da povećava gensku ekspresiju ovog molekula.





U dosadašnjim istraživanjima je pokazano da MMC eksprimiraju male količine MHC molekula I klase (*Schu i sar., 2012*), što ih uz odsustvo ekspresije MHC molekula klase II, čini dobrim kandidatima za transplantaciju, jer imaju sposobnost da izbegnu ili odlože prepoznavanje od strane imunskog sistema domaćina (*Majumdar i sar., 2003; Rasmusson i sar., 2003*). Naši rezultati ispitivanja uticaja IL-17 na gensku ekspresiju MHC molekula klase I, uključujući HLA-A i HLA-G5 u PD-MMC su pokazali konstitutivnu gensku ekspresiju ovih molekula. Pored toga, utvrđeno je da IL-17 ne utiče na ekspresiju HLA-A gena, dok je suprotno našim očekivanjima ovaj citokin značajno smanjio ekspresiju HLA-G5 u PD-MMC. Prema dosadašnjim saznanjima MMC eksprimiraju gen za HLA-G5 (*Lee i sar., 2012*). Solubilna forma HLA-G5 je uključena u regulaciju imunskog odgovora putem supresije proliferacije T ćelija, kao i citotoksičnosti NK i T ćelija (*Selmani i sar., 2008*), dok sa druge strane stimuliše stvaranje Treg ćelija (*Amodio i sar., 2015*). Takođe je pokazano i da direktni međucelijski kontakti MMC i T ćelija indukuju najveću produkciju solubilnog HLA-G5 posredstvom oslobođenog IL-10 (*Ghannam i sar., 2010; Bassi sar., 2011*). Prethodne studije su ukazale i na značajno povećanje ekspresije HLA-G5 u MMC indukovano nakon tretmana sa IFN- $\gamma$  i/ili TNF (*Trivanović i sar., 2013; Montespan, 2014*). Prema našim saznanjima, ne postoje dodatne informacije o tome kako IL-17 modulira ekspresiju HLA-G5 u MMC. S obzirom da je poznato da ekspresija primarnog transkripta HLA-G može, ali ne mora direktno uticati na ekspresiju aktivnog, solubilnog proteina (*Naji, 2013*) koji ostvaruje svoje imunomodulatorno dejstvo, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se potpunije definisao uticaj IL-17 na ekspresiju ovog molekula.

Modulaciju imunskog odgovora PD-MMC vrše i putem ekspresije drugih medijatora, poput IL-6 i IDO-1 molekula. Rezultati naših istraživanja su pokazali konstitutivnu ekspresiju gena za IL-6 i IDO u PD-MMC, kao i stimulatorni efekat IL-17 na gensku ekspresiju ovih molekula u PD-MMC. IL-6 je citokin koji ima važnu dvojaku ulogu u imunomodulaciji i predstavlja jedan od glavnih molekula koji reguliše preusmeravanje imunskog odgovora od urođenog ka adaptivnom, kontrolišući aktivnost leukocita (*Jones, 2005*). Takođe, ovaj citokin svoj imunosupresorski potencijal ostvaruje inhibicijom diferencijacije DC čime se smanjuje aktivacija T ćelija. Uz to, pokazano je i da se sekrecija ovog citokina od strane MMC povećava pod uticajem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i



IL-2 (*Bouffi i sar., 2010*) pri čemu je poznato da IL-6 u sinergizmu sa TNF- $\alpha$  deluje proinflamatorno indukujući regrutovanje neutrofila (*Scheller i sar., 2011*). U našem radu primećeno povećanje ekspresije gena za IL-6 pod uticajem IL-17 u PD-MMĆ u skladu je sa objavljenim podacima o pozitivnom uticaju citokina koje luče Th17 ćelije na ekspresiju IL-6 u ćelijama periodoncijuma (*Konermann i sar., 2012*). IDO-1 je metabolički molekul važan za postizanje imunske tolerance, koji deplecijom triptofana i produkcijom kinurenina indukuje supresiju T ćelijskog odgovora stimulišući nastanak Treg ćelija (*Terness i sar., 2002*). Pored toga, pokazano je da MMĆ u direktnim međućelijskim kontaktima sa imunskim ćelijama ostvaruju imunosupresorski efekat posredstvom produkcije IDO-1 molekula (*Wang i sar., 2014*). Dodatno, istraživanja koja su rađena sa MMĆ iz različitih izvora su pokazala da ekspresiju IDO u ovim ćelijama stimuliše IFN- $\gamma$  (*Yoo i sar., 2009*). Slično ovim nalazima, u našim istraživanjima je prvi put pokazano povećanje ekspresije gena za IDO-1 molekul u PD-MMĆ nakon inkubacije u prisustvu IL-17.

Iako je u našim istraživanjima primećena promena genske ekspresije imunomodulatornih molekula pod uticajem IL-17 u PD-MMĆ, pokazano je da ovaj citokin nema efekta na supresivno dejstvo PD-MMĆ na proliferaciju T ćelija periferne krvi zdravih donora. Potrebni su dodatni eksperimenti u kojima bi se ispitaio uticaj IL-17 na imunomodulatorni potencijal PD-MMĆ u uslovima sličnim inflamatornom okruženju uključivanjem dodatnih citokina imajući u vidu da su prethodna istraživanja imunomodulatornih osobina PD-MMĆ izolovanih iz inflamacijom zahvaćenog tkiva parodontoncijuma ukazala na smanjen potencijal imunosupresije T ćelija od strane PD-MMĆ kod osoba sa parodontopatijom (*Liu i sar., 2012*).

Gledajući u celini, na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da periodoncijum predstavlja dobar izvor MMĆ. Pored toga, naši rezultati ukazuju da IL-17 ima potencijal da moduliše regenerativne osobine PD-MMĆ, s obzirom da su pokazali inhibitorni efekat ovog citokina na migraciju PD-MMĆ, ali i značajnu ulogu IL-17 u inhibiciji osteogene diferencijacije ovih ćelija posredovanu aktivacijom ERK1,2 i JNK MAPK. Naši rezultati takođe ukazuju na sposobnost IL-17 da putem aktivacije ERK1,2 MAPK reguliše ekspresiju i aktivnost proteaza uključenih u razgradnju ECM, poput MMP-2 i uPA, u PD-MMĆ sugerišući na potencijalne mehanizme delovanja ovog citokina u razvoju parodontopatije. Dobijeni rezultati ističu



kompleksnost biologije MMĆ i njihove interakcije sa faktorima iz okruženja. Dodatna istraživanja uloge i mehanizama delovanja IL-17 su potrebna kako bi se u potpunosti sagledale mogućnosti razvoja novih modaliteta lečenja široko rasprostranjenog oboljenja parodontopatije primenom anticitokinske terapije.

# 6. ZAKLJUČCI





Na osnovu prethodno izloženih ciljeva istraživanja i predstavljenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

**1. Uspešno su izolovane i okarakterisane humane mezenhimske matične ćelije periodoncijuma (PD-MMĆ)**

- Izolovane PD-MMĆ ispoljavaju aadherentnost za plastiku i morfologiju karakterističnu za mezenhimske matične ćelije.
- Izolovane PD-MMĆ ekspimiraju specifične mezenhimske površinske markere, dok ne ekspimiraju markere hematopoetskih ćelija. Imunofenotip PD-MMĆ izolovanih iz različitih donora je sličan.
- Izolovane PD-MMĆ ekspimiraju markere embrionalnih matičnih ćelija, Nanog, Oct4, SOX-2 i SSEA4, na genskom i proteinskom nivou.
- Izolovane PD-MMĆ imaju multipotentni potencijal diferencijacije pokazujući sposobnost osteogeneze, hondrogeneze i adipogeneze u odgovarajućim *in vitro* uslovima.
- Izolovane PD-MMĆ ekspimiraju receptor za IL-17 na proteinskom i genskom nivou.

**2. Ispitivanja uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na funkcionalna svojstva PD-MMĆ pokazala su da:**

- IL-17 dovodi do blagog smanjenja proliferacije PD-MMĆ samo nakon 24 h inkubacije.
- IL-17 stimuliše klonogeni kapacitet PD-MMĆ indukujući povećanje broja CFU-F kolonija.
- IL-17 inhibira migraciju PD-MMĆ.
- IL-17 inhibira osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ indukujući smanjenje ekspresije gena za ALP, RUNX2/Cbfa1 i Osteokalcin.
- IL-17 aktivira sve tri klase MAPK: p38, ERK1,2 i JNK u PD-MMĆ.
- Inhibitorni efekat IL-17 na migraciju PD-MMĆ nije posredovan MAPK signalnim putevima.
- Inhibitorni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju PD-MMĆ se ostvaruje aktivacijom ERK1,2 i/ili JNK MAPK signalnih puteva.



**3. Ispitivanja uticaja i mehanizama delovanja IL-17 na ekspresiju matriksnih metaloproteinaza i urokinaze u PD-MMĆ pokazala su da:**

- IL-17 indukuje povećanu enzimsku aktivnost, proteinsku i gensku ekspresiju MMP-2 u PD-MMĆ, dok nema efekta na ekspresiju MMP-9 u ovim ćelijama.
- IL-17 indukuje povećanu enzimsku aktivnost, proteinsku i gensku ekspresiju uPA u PD-MMĆ.
- IL-17 nema efekta na gensku ekspresiju aktivatora MMP2, MT1-MMP, inhibitora uPA, PAI1, u PD-MMĆ.
- Stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju MMP-2 je posredovan aktivacijom ERK1,2 MAPK signalnog puta.
- Stimulatorni efekat IL-17 na ekspresiju uPA je posredovan aktivacijom ERK1,2 MAPK signalnog puta.

**4. Ispitivanja uticaja IL-17 na imunomodulatorne osobine PD-MMĆ pokazala su da:**

- IL-17 nema uticaja na sposobnost PD-MMĆ da inhibiraju proliferaciju mitogenom stimuliranih T limfocita.
- IL-17 nema uticaja na ekspresiju HLA-A gena, dok dovodi do smanjenja genske ekspresije HLA-G u PD-MMĆ.
- IL-17 indukuje povećanje genske ekspresije HLA-DR u PD-MMĆ, dok nema uticaja na površinsku ekspresiju ovog molekula na PD-MMĆ.
- IL-17 indukuje povećanje genske ekspresijeIDO-1 i IL-6 u PD-MMĆ.

# 7. LITERATURA





**A**damopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Research & Therapy* 10(5):225, 2008.

Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10(5):544-55, 2012.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278(3):1910-4, 2003.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815-22, 2005.

Amodio G, Comi M, Tomasoni D, Gianolini ME, Rizzo R, LeMaout J, Roncarolo MG, Gregori S. HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10. *Haematologica* 100(4):548-57, 2015.

Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends in Molecular Medicine* 16(5):203-9, 2010.

Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32(3):252-60, 2014.

Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275(7):4858-64, 2000.

**B**aker-LePain JC, Nakamura MC, Lane NE. Effects of inflammation on bone: an update. *Curr Opin Rheumatol* 23(4):389-95, 2011.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3):301-16, 2004.

Bassi EJ, Aita CA, Câmara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells* 3(1):1-8, 2011.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 86(4):347-51, 2007.

Becker J, McCulloch E, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* 197(4866):452-454, 1963.





Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. *J Periodontol* 64(5):474–84, 1993.

Bergfeld S, DeClerck Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Review* 29(2):249-61, 2010.

Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13(4):392-402, 2013.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090):235-8, 2006.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. *Cell stem cell* 2(4):313-319, 2008.

Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol* 212(1):189-94, 2007.

Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 7(4):e35685, 2012.

Bouffi C, Djouad F, Mathieu M, Noel D and Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology (Oxford)* 48(10):1185-1189, 2009.

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*, 5(12):e14247, 2010.

Boveri, T. *Sitzungsber d Gesellschaft f Morphologie und Physiologie*, 114–225, 1892.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169(2):338-46, 2006.

Bugarski D, Krstić A, Vlaški M, Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Milenković P. Interleukine-17-induced inhibitory effect on late stage murine erythroid bone marrow progenitors. *Eur Cytokine Netw* 15(3):247-54, 2004.

Bugarski D, Jovčić G, Katić-Radivojević S, Petakov M, Krstić A, Stojanović N, Milenković P. Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata*-infected mice. *Parasitol Int* 55(2):91-7, 2006.



Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunology and Cell Biology* 91(1):12–18, 2013.

Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoimmunology-the hidden immune regulation of bone. *Autoimmun Rev* 8(3):250-5, 2009.

Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641-50, 1991.

Cardoso CR, Garlett GP, Crippa GE, Rosa AL, Martins W Jr, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, 24(1):1-6, 2009.

Carrión F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. *Immunol Lett* 135(1-2):10-6, 2011.

Cawson RA, Odell EW. *Essentials of oral pathology and oral medicine*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 6th ed, 2000.

Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 167(10):6015-20, 2001.

Chai Y, Jiang X, Ito Y et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127(8):1671–1679, 2000.

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Journal of Gene Medicine* 5(12):1028–38, 2003.

Chang J, Liu F, Lee M et al. NF-κB inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β-catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23):9469-74, 2013.

Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunology and Cell Biology* 84(5):413–21, 2006.

Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol* 41(6):541-9, 2014.

Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res* 16(11):902–7, 2006.



Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12(6):560-7, 2011.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 54: 764–771, 2009.

Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7):479-89, 2010.

**D**a Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119(Pt 11):2204-13, 2006.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8(7):481-90, 2010.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61(5):577–87, 2008.

DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010:865601, 2010.

Deppe H, Hohlweg-Majert B, Hölzle F, Kesting MR, Wagenpfeil S, Wolff KD, Schmitt M. Content of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in oral mucosa and inflamed periodontal tissue. *Quintessence Int* 41(2):165-71, 2010.

Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 4:201, 2013.

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* 28(10):1829-38, 2010.

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* 8(4):315-7, 2006.

Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 8(5):337-48, 2008.



Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-54, 1997.

**E**ggenhofer E, Steinmann JF, Renner P, Slowik P, Piso P, Geissler EK, Schlitt HJ, Dahlke MH, Popp FC. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transpl Immunol* 24(3):157-63, 2011.

Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 74(2):188-95, 2003.

Elman JS, Li M, Wang F, Gimble JM, Parekkadan B. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J Inflamm (Lond)* 11(1):1, 2014.

Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* 10(12):1245–1251, 2009.

Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol* 3:126, 2012.

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

Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim JH, Liang S, Ciero PA, Krauss JL, Li F, Rauner M, Hofbauer LC., Choi EY, Chung KJ, Hashim A, Curtis MA, Chavakis T, Hajishengallis G. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nature Immunology* 13(5):465–73, 2012.

**F**an L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. *Int J Mol Sci.* 17(5):E 650, 2016.

Feng F, Akiyama K, Liu Y et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Diseases* 16(1):20–28, 2010.

Figuerola FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res* 45(3):269-277, 2012.

Florina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *Journal of Immunology* 183(2):993-1004, 2009.



Fossiez F, Djossou O, Chomarar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183(6):2593–603, 1996.

Frankowski H, Gu YH, Heo JH, Milner R, del Zoppo GJ. Use of Gel Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase (Gelatinase) Expression in Brain Tissue or in Primary Glial Cultures. *Methods Mol Biol.* 814:221–33, 2012.

Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 88(3):446-54, 2003.

Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J, Albanese P. Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 8(2):180–92, 2012.

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

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17(4):331-40, 1974.

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

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 215(3):743-9, 2008.

**G**affen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 43(3):402-7, 2008.

Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9(8):556-67, 2009.

Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 14(9):585-600, 2014.

Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol* 44-46:191-9, 2015.



Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res* 41(6):580-84, 2006.

Ghannam SA, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy* 1(1):2, 2010.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105(7):2821-7, 2005.

Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* 288(1):51-59, 2003.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13625-30, 2000.

**H**aeckel, E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Berlin: Georg Reimer, 1868.

Häcker, V. *Archiv f mikr Anat*, 39, 556–581, 1892.

Haddad R and Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? *BioMed Research International* 2014:216806, 2014.

Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystone, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* 35(1):3-11, 2014.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology* 15(1):30-44, 2015.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin-17 producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11):1123-32, 2005.

Hasegawa T, Kikui T, Takeyama S, Yoshimura Y, Mitome M, Oguchi H, Shirakawa T. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. *Tissue Cell* 34(1):44-51, 2002.

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* 9:12, 2011.



Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A, Takemura Y, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K, Tajima T, Saito S, Yano T, Taketani Y. Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 149(3):1260-7, 2008.

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* 10(12):1496-500, 2010.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T. Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A-stimulated human gingival fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry* 24(5-6):391-6, 2009.

Hu Y, Chan E, Wang SX, Li B. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation. *Endocrinology* 144(5):2068-74, 2003.

Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee Y, Kim HH. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ* 16(10):1332-43, 2009.

Hung TY, Lin HC, Chan YJ, Yuan K. Isolating stromal stem cells from periodontal granulation tissues. *Clin Oral Investig* 16(4):1171-80, 2012.

Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(6):1512-8, 2006.

Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen Med* 4(6):809-21, 2009.

Inoue D, Numasaki M, Watanabe M, Kubo H, Sasaki T, Yasuda H, Yamaya M, Sasaki H. IL-17A promotes the growth of airway epithelial cells through ERK-dependent signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 347(4):852-8, 2006.

Ivanov S, Linden A. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 30(2):95-103, 2009.

Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol* 37(12):1088-99, 2010.

Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N et al. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *Journal of Periodontology* 84(10):1425-33, 2013.



**J**aiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase..*J Biol Chem* 31;275(13):9645-52, 2000.

Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, Ma Q, Yang Z, Wen L, Xuan K. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *J Periodontal Res* 48(1):105-16, 2013.

Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *Journal of immunology* 179(5):2824-31, 2007.

Jones D, Glimcher LH, Aliprantis AO. Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection. *J Clin Invest* 121(7):2534–2542, 2011.

Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol*, 175:3463-3468, 2005.

Jovčić G, Bugarski D, Krstić A, Vlaški M, Petakov M, Mojsilović S, Stojanović N, Milenković P. The effect of interleukin-17 on hematopoietic cells and cytokine release in mouse spleen. *Physiol Res* 56(3):331-9, 2007.

Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Krstić A, Vlaški M, Stojanović N, Milenković P. In vivo effects of interleukin-17 on haematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif* 37(6):401–12, 2004.

Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stanković J, Stojanović N, Milenković P. Effect of IL-17 on in vitro hematopoietic progenitor cells growth and cytokine release in normal and postirradiated murine bone marrow. *Growth Factors* 19(1):61–71, 2001.

**K**atsumoto K, Shiraki N, Miki R, Kume S. Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Dev Growth Differ* 52(1):115-29, 2010.

Kaku M, Komatsu Y, Mochida Y, Yamauchi M, Mishina Y, Ko C. Identification and characterization of neural crest-derived cells in adult periodontal ligament of mice. *Archives of Oral Biology* 57(12):1668–1675, 2012.

Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 15(4):251-61, 1996.

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* 59(2):167-75, 2014.





Katz Y, Nativ O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 44(9):2176-84, 2001.

Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation* 79(2):74–83, 2010.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 114(6):1265-1273, 2004.

Kayal RA. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. *Biomed Research International* 2013:639368, 2013.

Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, Huskens D, Leclercq G, Matthys P. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68(5):744–50, 2009.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord, or adipose tissue. *Stem Cells* 24(5):1294-301, 2006.

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.* 40(6):265-70, 2010.

Kim YG, Lee CK, Nah SS, Mun SH, Yoo B, Moon HB. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15;357(4):1046–52, 2007.

Kim YG, Park JW, Lee JM, Suh JY, Lee JK, Chang BS, Um HS, Kim JY, Lee Y. IL-17 inhibits osteoblast differentiation and bone regeneration in rat. *Archives of Oral Biology* 59(9):897-905, 2014.

Klopp A, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M and Marini F. Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor Growth? *Stem Cells* 29(1):11–19, 2011.

Kobayashi R, Kono T, Bolerjack BA, Fukuyama Y, Gilbert RS, Fujihashi K, Ruby J, Kataoka K, Wada M, Yamamoto M, Fujihashi K. *J Dent Res* 90(5):653-8, 2011.



Kocić J, Santibañez JF, Krstić A, Mojsilović S, Ilić V, Bugarski D. Interleukin-17 modulates myoblast cell migration by inhibiting urokinase type plasminogen activator reexpression through p38 mitogen-activated protein kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 45(2):464-75, 2013.

Kocić J, Santibañez JF, Krstić A, Mojsilović S, Dorđević IO, Trivanović D, Ilić V, Bugarski D. Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2. *Biochim Biophys Acta*. 1823(4):838-49, 2012.

Konermann A, Beyer M, Deschner J, Allam JP, Novak N, Winter J, Jepsen S, Jäger A. Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cell Immunol* 272(2):137-43, 2012.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152):484-7, 2007.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103(9):1345-52, 1999.

Kramer JM, Hanel W, Shen F, Isik N, Malone JP, Maitra A, Sigurdson W, Swart D, Tocker J, Jin T, Gaffen SL. Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J Immunol* 179(10):6379-83, 2007.

Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*. 25(9):1408-14, 2011.

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*. 101(9):3722-9, 2003.

Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevaleyre J, Duchez P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z. Low O<sub>2</sub> concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34<sup>+</sup> and mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw* 20(1):10-6, 2009.

Krstić A, Mojsilovic S, Jovcic G, Bugarski D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res* 52(1-2):34-41, 2012.

Krstić J, Obradović H, Kukulj T, Mojsilović S, Okić-Dorđević I, Bugarski D, Santibañez JF. An Overview of Interleukin-17A and Interleukin-17 Receptor A Structure, Interaction and Signaling *PPL* 22(7):570-8, 2015.



Krstić J, Obradović H, Jauković et al. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, 1853(2):431–444, 2015.

**L**a Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131(2):267-82, 2009.

Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Hamilton JA, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Orth RK, Tan Y, Walsh KA, Fleetwood AJ, Reynolds EC. GM-CSF and uPA are required for *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. *Immunol Cell Biol* 93(8):705-15, 2015.

Le Blanc K, Rindgen O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine* 262(5):509-25, 2007.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 31(10):890-6, 2003.

Lee SJ, Lee EJ, Kim SH, Choi I, Lee DM, Lee HJ, Yoon D, Chun T. IL-17A promotes transdifferentiation of mouse myoblast cells (C2C12) into adipocytes by increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  through CAAT/enhancer binding protein  $\beta$  signaling. *Biotechnol Lett* 33(2):229-35, 2011.

Lee JM, Jung J, Lee HJ, Jeong SJ, Cho KJ, Hwang SG, Kim GJ. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol* 13(2):219-24, 2012.

Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M et al. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res* 264(2):326-36, 2001.

Li Z, Li K, Zhu L, Kan Q, Yan Y, Kumar P, Xu H, Rostami A, Zhang GX. Inhibitory effect of IL-17 on neural stem cell proliferation and neural cell differentiation. *BMC Immunol* 14:20, 2013.

Li CS, Zheng Z, Su XX, Wang F, Ling M, Zou M, Zhou H. Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Is Critical for Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation. *Biomed Res Int* 3764372, 2016.

Lin FH, Chang JB, Brigman BE. Role of mitogen-activated protein kinase in osteoblast differentiation. *J Orthop Res* 29(2):204-10, 2011.



Liu N, Shi S, Deng M, Tang L, Zhang G, Liu N, Ding B, Liu W, Liu Y, Shi H, Liu L, Jin Y. High levels of  $\beta$ -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *J Bone Miner Res* 26(9):2082-95, 2011.

Liu W, Konermann A, Guo T, Jäger A, Zhang L, Jin Y. Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. *Biochimica Biophysica Acta* 1840(3):1125–34, 2014.

Liu WH, Chang LS. Caffeine induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in human leukemia U937 cells via  $Ca^{2+}$ /ROS-mediated suppression of ERK/c-fos pathway and activation of p38 MAPK/c-jun pathway. *J Cell Physiol* 224(3):775-85, 2010.

Liu Q, Cen L, Zhou H, Yin S, Liu G, Liu W, Cao Y, Cui L. The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone. *Tissue Eng Part A* 15(11):3487-97, 2009.

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* 39(12):1174-82, 2012.

Luan X, Dangaria S, Ito Y, Walker CG, Jin T, Schmidt MK, Galang MT, Druzinsky R. Neural crest lineage segregation: a blueprint for periodontal regeneration. *J Dent Res* 88(9):781-91, 2009.

Luo CY, Wang L, Sun C, Li DJ. Estrogen enhances the functions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cellular and Molecular Immunology* 8(1):50–58, 2011.

Lohr J, Knoechel B, Caretto D, Abbas AK. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect* 11(5):589-93, 2009.

Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 21(2):216-25, 2013.

Maeda H, Wada N, Fuji S, Tomokiyo A and Akamine A. Periodontal ligament stem cell. In: Gholamrezanezhad A. Editor. *Stem cells in clinic and research*. In Tech Chapter 25: 619-636, 2011.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science* 10(2):228-41, 2003.



Mao CY, Wang YG, Zhang X, Zheng XY, Tang TT, Lu EY. Double-edged-sword effect of IL-1 $\beta$  on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- $\kappa$ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways. *Cell Death Dis* 14;7:e2296, 2016.

Marie P. Bone remodeling: a social network of cells. *Medicographia* 34(2):149-154, 2002.

Martino G, Franklin RJ, Baron Van Evercooren A, Kerr D. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Nature Reviews Neurology* 6(5):247-55, 2010.

Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 1(2):142-9, 2012.

Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem cells* 31(9): 1980–1991, 2013.

Mojsilović S, Jauković A, Santibañez JF, Bugarski D. Interleukin-17 and its implication in the regulation of differentiation and function of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Mediators Inflamm* 2015:470458, 2015.

Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Okić-Đorđević I, Kocić J, Trivanović D, Santibañez JF, Jovčić G, Bugarski D. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell and Tissue Research* 346(3):305-316, 2011.

Montespan F, Deschaseaux F, Sensébé L, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: implications in bone repair therapy. *J Immunol Res* 2014: 230346, 2014.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441(7097):1068-74, 2006.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132(4):598-611, 2008.

Moulik S, Pal S, Biswas J, Chatterjee A. Role of ERK in Modulating MMP 2 and MMP 9 with Respect to Tumour Invasiveness in Human Cancer Cell Line MCF-7 and MDA-MB-231. *Journal of Tumor* 2( 2), 2014.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348–57, 1986.



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* 8(6):711-23, 2013.

Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 8(4):1188-98, 2012.

Naji A, Rouas-Freiss N, Durrbach A, Carosella ED, Sensébé L, Deschaseaux F. Concise review: combining human leukocyte antigen G and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy. *Stem Cells* 31(11):2296-303, 2013.

Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34<sup>+</sup>-derived and monocytederived dendritic cells. *J Immunol* 177(4):2080-7, 2006.

Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubüser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem Sci* 28(5):226-229, 2003.

Okamoto K, Takayanagi H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 13(3):219, 2011.

O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS, Fan S. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect* 11(5): 599-611, 2009.

Osta B, Lavocat F, Eljaafari A, Miossec P. Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Immunology* 5:425, 2014.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 136:42-60, 1988.

Parish CR, Warren HS. Use of the Intracellular Fluorescent Dye CFSE to Monitor Lymphocyte Migration and Proliferation. *Current protoc Immunol Chapter 4: Unit 4.9*, 2002.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing Interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11):1133-41, 2005.



Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Bugarski D, Ivanović Z, Milenković P. Značaj testova za određivanje matičnih ćelija hematopoeze u transplantaciji. Bilten za hematologiju 26:1-6, 1998.

Petakov M, Balint B, Bugarski D. Biologija matičnih ćelija hematopoeze. U: Transfuziologija. Aut. Balint B. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd I izdanje 497-524, 2004.

Petković F, Živanović J, Blaževski J, Timotijević G, Momčilović M, Stanojević Ž et al. Activity, but not mRNA expression of gelatinases correlates with susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience 292:1-12, 2015.

Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. Birth Defects Res C Embryo Today 90(1):67-74, 2010.

Phinney DG. Functional Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cell Therapy. Journal of Cellular Biochemistry 113(9):2806–12, 2012.

Plotnikov E, Khryapenkova T, VasilevaA, MareyM, GalkinaS, IsaevN, ShevalE, PolyakovV, Sukhik G, Zorov D. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 12(5a):1622-1631, 2008.

Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. Int J Immunopathol Pharmacol 25(1):127-34, 2012.

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldívar M, Puente J, Martínez B, Gamonal J. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Periodontal Res 40(3):199-207, 2005.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276(5309):71-4, 1997.

Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. Mol Ther 17(6):939-946, 2009.

Psaltis P, ZannettinoA, WorthleySG, Gronthos S. Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. Stem Cells 26(9):2201-10, 2008.

**R**acz 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. Journal of Physiology and Pharmacology 65(3):327-39, 2014.



Rahman MS, Yamasaki A, Yang J, Shan L, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J Immunol* 177(6): 4064-4071, 2006.

Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci* 50(1):53-6, 2008.

Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* 312(12):2169-79, 2006.

Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(6):413-23, 2010.

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 5(4):378-386, 2009.

Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol* 182(12):7963-73, 2009.

Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 179(3):1549-58, 2007.

Ronay V, Belibasakis GN, Attin T, Schmidlin PR, Bostanci N. Expression of embryonic stem cell markers and osteogenic differentiation potential in cells derived from periodontal granulation tissue. *Cell Biol Int* 38(2):179-86, 2014.

Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 150(12):5445-56, 1993.

Rucci Nadia. Molecular biology of bone remodeling. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 5(1): 49–56, 2008.

Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol* 24:226-38, 2000.

**S**antibáñez JF, Frontelo P, Iglesias M, Martínez J, Quintanilla M. Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor b1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 74:61–73, 1999.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813(5):878-88, 2011.





Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 89(9):943-7, 2010.

Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, Murphy M, O'Brien T, Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 16(9):2094-103, 2012.

Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, Nelson S, Bagby GJ, Stoltz D, Mynatt RL, Spriggs M, Kolls JK. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: Use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol* 161(11):6383-9, 1998.

Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 164(9):4783-9, 2000.

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<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells* 26(1):212-22, 2008.

Sekhon BS. Matrix metalloproteinases – an overview. *Research and Reports in Biology*. 1:1-20, 2010.

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* 364(9429):149-55, 2004.

Settem RP, Honma K, Nakajima T, Phansopa C, Roy S, Stafford GP, Sharma A. A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunology* 6(2):415-26, 2013.

Shaker OG, Ghallab NA. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients:relation to PCR bacterial detection. *Mediators Inflamm* 2012:174764, 2012.

Sheng G. The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) *BMC Developmental Biology* 15:44, 2015.

Shin JH, Shin DW, Noh M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochem Pharmacol* 77(12):1835-44, 2009.



Silva JAF, Ferrucci DL, Peroni LA, Abrahao PGS, Salamene AF, Rossa CJ, Carvalho HF, Stach-Machado AD. Sequential IL-23 and IL-17 and Increased Mmp8 and Mmp14 Expression Characterize the Progression of an Experimental Model of Periodontal Disease in Type 1 Diabetes. *J Cell Physiol* 227(6):2441-50, 2012.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 21(6):661-9, 2003.

Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol* 81(8):1207-15, 2010.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 62: 327-336, 1963.

Song JS, Kim SO, Kim SH, Choi HJ, Son HK, Jung HS, Kim CS, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of human deciduous and permanent teeth. *Tissue Eng Part A*. 18(19-20):2040-51, 2012.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 10(6):311–18, 2004.

Subramaniam SV, Cooper RS, Adunyah SE. Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17. *Biochem Biophys Res Commun* 262(1):14-19, 1999.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516, 2001.

**T**aghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta* 32(4):S311-315, 2011.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S . The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 32(4):369-374, 2005.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-76, 2006.

Takahashi N, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. *European Journal of Oral Sciences* 119(5):339–344, 2011.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7(4):292–304, 2007.



Tang R, Wei F, Wei L, Wang S, Ding G. Osteogenic differentiated periodontal ligament stem cells maintain their immunomodulatory capacity. *J Tissue Eng Regen Med* 8(3):226-32, 2014.

Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196(4):447-57, 2002.

Till JE, McCulloch EA, Siminovich L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Physiology* 51:29-36, 1964.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 213-222, 1961.

Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 177(1):36-9, 2006.

Trivanović D, Jauković A, Popović B, Krstić J, Mojsilović S, Okić-Djordjević I, Kukulj T, Obradović, Santibanez, Bugarski. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci* 141:61-73, 2015.

Trivanović D, Mojsilović S, Ilić V, Krstić J, Jauković A, Okić Đorđević I, Santibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Centr Eur J Immunol* 38(4):421-9, 2013.

Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, Marchisio M, Giancola R, Pizzicannella J, Bühring HJ, Piattelli M, Caputi S, Nanci A. Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 225(1):123-31, 2010.

Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* 47(2):169-82, 2012.

Tsai CC, Chen CL, Liu HC, Lee YT, Wang HW, Hou LT, et al. Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J Biomed Sci* 17:64, 2010.

Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 31: 77-104, 2000.



Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology* 8(9):726-736, 2008.

Valenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43(6):1084-1092, 2008.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2):179-89, 2006.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32(4):383-9, 2005.

Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 219(3):667-76, 2009.

Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamuta H, Akamine A. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Periodontol Res* 36(1):56-63, 2001.

Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24:33-63, 2006.

Wang D, Ji YR, Chen K, Du WT, Yang ZX, Han ZB, Chi Y, Liang L, Bayard F, Han ZC. IL-6 production stimulated by CD14(+) monocytes-paracrine IL-1 $\beta$  does not contribute to the immunosuppressive activity of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* 29(3-4):551-60, 2012.

Wang M, Tian T, Yu S, He N, Ma D. Th17 and Treg cells in bone related diseases. *Clin Dev Immunol* 2013:203705, 2013.

Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 30:5:19, 2012.

Wang Y, Wu H, Wu X, Bian Z, Gao Q. Interleukin 17A promotes gastric cancer invasiveness via NF- $\kappa$ B mediated matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS One* 9(6):e96678, 2014<sup>a</sup>.

Wang X, Goh CH, Li B. p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix. *Endocrinology* 148(4):1629-37, 2007.



Wang D, Feng X, Lu L, Konkel JE, Zhang H, Chen Z, Li X, Gao X, Lu L, Shi S, Chen W, Sun L. A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*, 66(8):2234-45, 2014<sup>b</sup>.

Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS ONE* 7(9):e45590, 2012.

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* 5(4):e10088, 2010.

Weismann A. Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena Gustav Fischer, 1885 .

Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther* 151:107-20, 2015.

Wu Y, Zhu L, Liu L, Zhang J, Peng B. Interleukin-17A stimulates migration of periodontal ligament fibroblasts via p38 MAPK/NF- $\kappa$ B -dependent MMP-1 expression. *J Cell Physiol* 229(3):292-9, 2014.

Wu Y, Zhu L, Wei H, Peng B. Regulation of matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and extracellular metalloproteinase inducer by interleukin-17 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 39(1):62-7, 2013.

Wyganowska-Świątkowska M, Surdacka A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. The plasminogen activation system in periodontal tissue. *Int J Mol Med* 33(4):763-8, 2014.

Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 7(3):164-74, 2010.

Yang SH<sup>1</sup>, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 41(5): 315–324, 2009.

Yago T<sup>1</sup>, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, Kotake S. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem* 108(4):947–955, 2009.



Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: A novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155(12):5843–6, 1995<sup>a</sup>.

Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3(6):811-21, 1995<sup>b</sup>.

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signalling for lung CXC chemokine and IL-17 and its biological functions granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194(4):519-527, 2001.

Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 259(2):150-6, 2009.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109(9): 3794–3802, 2007.

Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J et al. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis and Rheumatism* 56(12):4104–4112, 2007.

Zhang H, Zeng X, Sun L. Allogenic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus. *Expert Opinion on Biological Therapy* 10(5):701-9, 2010.

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 microenvironments. *Differentiation* 88(4-5):97-105, 2014.

Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther* 13(4):234, 2011.

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* 15(9):2363-71, 2009.

Zheng W, Wang S, Wang J, Jin F. Periodontitis promotes the proliferation and suppresses the differentiation potential of human periodontal ligament stem cells. *Int J Mol Med* 36(4):915–22, 2015.



Zhong J, Gencay MM, Bubendorf L, Burgess JK, Parson H, Robinson BW, Tamm M, Black JL, Roth M. ERK1/2 and p38 MAP kinase control MMP-2, MT1-MMP, and TIMP action and affect cell migration: a comparison between mesothelioma and mesothelial cells. *J Cell Physiol* 207(2):540-52, 2006.

Zhu W, Tan Y, Qiu Q et al. Comparison of the properties of human CD146+ and CD146- periodontal ligament cells in response to stimulation with tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Archives of Oral Biology* 58(12):1791–1803, 2013.

Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int* 2015:972313, 2015.

Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20(1):4-12, 2010.

Zhu L, Wu Y, Wei H, Xing, X, Zhan N, Xiong H, Peng, B. IL-17R activation of human periodontal ligament fibroblasts induces IL-23 p19 production: differential involvement of NF-kappaB versus JNK/AP-1 pathways. *Molecular Immunology* 48(4):647–656, 2011.

Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 23(6):719-26, 2005.

## PRILOG – SPISAK SKRAĆENICA

**A** – adenin

**ALP** (od engl. *alkaline phosphatase*) – alkalna fosfataza

**BCIP/NBT** (od engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride*) – hromogen za alkalnu fosfatazu

**BSA** (od engl. *Bovine Serum Albumine*) – albumin goveđeg seruma

**BSP** (od engl. *Bone Sialoprotein*) – sialoprotein kosti

**Ca** – kalcijum

**CBAD** (od engl. *C-terminal C/EBP $\beta$ -activation domain*) – C-terminalni C/EBP $\beta$ -aktivacioni domen; motiv karakterističan za IL-17RA

**CD** (od engl. *cluster of differentiation*) – klaster diferencijacije; oznaka za međunarodnu klasifikaciju membranskih antigena

**cDNK** – DNK komplementarna molekulu RNK, najčešće stvorena *in vitro* pomoću enzima reverzne transkriptaze

**C/EBP** (od engl. *CCAAT-enhancer-binding proteins*) – familija transkripcionih faktora koji se vezuju za CCAAT sekvencu pojačivača gena

**CFU-F** (od engl. *Colony forming unit – fibroblastic*) – jedinica formiranja fibroblastnih kolonija

**CFSE** (od engl. *5-6-carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester*) – 5-6-karboksifluorescein diacetat sukcinimidil ester

**CTLA** (od engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen*) – antigen citotoksičnih T limfocita

**CO<sub>2</sub>** – ugljenik dioksid

**CXC** – C-X-C hemokin

**DAPI** (od engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4',6-diamidin-2-fenilindol

**ĐĆ** (od engl. *dendritic cells*) – dendritične ćelije

**DMEM** (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle' Medium*)

**DMSO** – dimetilsulfoksid



**DNK** – deoksiribonukleinska kiselina

**dNTP** – deoksiribonukleotid trifosfat

**E-ACA** (od engl. *epsilon aminocaproic acid*) – epsilon-aminokaproična kiselina, inhibitor proteaza

**ECM** (od engl. *extracellular matrix*) – ekstraćelijski matriks

**ECL** (od engl. *Enhanced Chemiluminescence*) – pojačana hemiluminiscencija

**EDTA** (od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetrasirćetna kiselina

**EMĆ** – embrionalne matične ćelije

**ERK** (od engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*) – kinaza regulisana ekstracelularnim signalima; signalni molekul

**FBS** (od engl. *Fetal Bovine Serum*) – fetalni goveđi serum

**FGF** (od engl. *Fibroblast growth factor*) – faktor rasta fibroblasta

**FITC** – fluorescein izotiocijanat

**FlowCy** (od engl. *Flow Cytometry*) – protočna citometrija

**GAPDH** – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, *housekeeping* gen

**G-CSF** (od engl. *Granulocyte colony-stimulating factor*) – faktor stimulacije rasta granulocitnih kolonija

**GM-CSF** (od engl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija

**GMP** – granulocitno-monocitni progenitor

**GvHD** (od engl. *Graft versus Host Disease*) – bolest usled reakcije stranog protiv domaćeg tkiva

**HCl** – hlorovodonična kiselina

**HGF** (od engl. *hepatocyte growth factor*) - faktor rast hepatocita

**HLA** (od engl. *Human leukocyte antigen*) – humani leukocitni antigen

**HMĆ** – hematopoetske matične ćelije

**HRP** (od engl. *Horse radish peroxidase*) – peroksidaza rena

**IBMX** (engl. *isobutyl-methylxanthine*) – izobutil metilksantin

**ICAM-1** (od engl. *intercellular adhesion molecule-1*) – intercelularni adhezivni molekul-1

**IDO-1** (od engl. *Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1*) – indoleamindioksidogenaza-1

**IF** (od engl. *immunofluorescence*) – imunofluorescentno obeležavanje

**IFN** – interferon

**IGF-1** (od engl. *insulin growth factor-1*) - insulinski faktor rasta-1

**IL** – interleukin

**iPS** (engl. *induced pluripotent stem cells*) – indukovane pluripotentne matične ćelije

**iRNK** – informaciona RNK

**JAK** – Janus kinaza; signalni molekul

**JNK** – *c-Jun NH<sub>2</sub>*-terminalna kinaza; signalni molekul

**KM** – kultivacioni medijum

**LFA-1** (od engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*) – antigen asociran sa funkcijom leukocita

**LPS** – lipopolisaharid

**LTi** (od engl. *Lymphoid Tissue Inducer cells*) – ćelije induktori limfoidnog tkiva

**MAPK** (od engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) – mitogenom aktivirane protein kinaze

**MCP-1** (od engl. *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) – protein hemoatraktant monocita-1

**MIF** (macrophage migration inhibitory factor) - inhibitorski faktor migracije makrofaga

**MĆ** – matične ćelije

**MEP** – megakariocitni-eritrocitni progenitori

**MHC** (od engl. *Major Histocompatibility Complex*) – glavni kompleks tkivne podudarnosti

**MIP-2** (od engl. *Macrophage-inflammatory protein-2*) – makrofagni inflamatorni protein 2

**MLR** – (od engl. *Mixed Lymphocytes Reaction*) – reakcija mešanih limfocita

**MMĆ** – mezenhimske matične ćelije

**MNĆ** – mononuklearne ćelije periferne krvi

**MMP** – matriks metaloproteinaze

**MT1MMP** (od engl. *membrane type-1 matrix metalloproteinase*) – membranski tip-1 MMP; aktivator MMP

**MTT** – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromide

**NF $\kappa$ B** – nuklearni faktor  $\kappa$ B; transkripcioni faktor

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

**NO** – azot monoksid

**NOS** – NO sintaza

**Ocn** (od engl. *Osteocalcin*) – transkripcioni faktor uključen u osteogenu diferencijaciju

**OPG** - osteoprotegerin

**ORF13** (od engl. *Open reading frame 13*) – otvoreni okvir čitanja (odnosi se na sekvencu genoma virusa *Herpesvirus saimiri* kojom je kodiran virusni homolog IL-17)

**PAI1** (od engl. *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) – inhibitor aktivatora plazminogena-1

**PBS** (od engl. *Phosphate Buffer Saline*) – fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom

**PCR** (od engl. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcija lančanog umnožavanja

**PD** – periodoncijum

**PD-MMC** – mezenhimske matične ćelije periodoncijuma

**PGE<sub>2</sub>** – prostaglandin E<sub>2</sub>

**PHA** (od engl. *Phytohemagglutinine*) – fitohemaglutinin

**PE** (od engl. *Phycoerythrin*) – fikoeritrin

**PI** (od engl. *Propidium Iodide*) – propidijum jodid

**PMSF** (od engl. *phenylmethanesulphonylfluoride*) – fenilmetansulfonilfluorid

**R** – receptor

**RANK** (od engl. *Receptor activator of Nuclear factor  $\kappa$ B*) – receptor aktivator *NF $\kappa$ B*

**RANKL** (od engl. *Receptor activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand*) – ligand za receptor aktivator *NF $\kappa$ B*

**RIPA** (od engl. *Radioimmunoprecipitation buffer*) – pufer za lizu ćelija u cilju izolacije membranskih i citosolnih proteina

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**Runx2/Cbfa1** (od engl. *Runt-related transcription factor 2/Core-binding factor subunit alpha-1*) – transkripcioni faktor uključen u regulaciju osteogene diferencijacije

**RT** – reverzna transkripcija

**SCF** (od engl. *Stem cell factor*) - faktor stimulacije matičnih ćelija

**SDS** (od engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*) – natrijum dodecil sulfat

**SDS-PAGE** (od engl. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)  
poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS

**SE** – standardna greška

**SEFIR** (engl. *Similar Expression to Fibroblast growth factor genes and IL-17*

*Receptors*) - motiv u intraćelijskom domenu IL-17R, homolog TIR familiji receptora

**SSEA4** (*Stage Specific Embryonic Antigen*) – membranski antigen specifičan za embrionalne ćelije

**STAT** (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) – prenosnik signala i aktivator transkripcije; transkripcioni faktor

**TAE** - Tris-acetat-EDTA pufer

**TBS** (engl. *Tris-Buffered Saline*) - fiziološki rastvor puferovan Tris-om

**TGF-β** (engl. *Transforming growth factor beta*) – faktor transformacije rasta beta

**Th** – pomoćničke T ćelije

**TILL** (engl. *TIR-like loop*) – C-terminalni region SEFIR domena IL-17R koji pokazuje sličnost sa TIR domenom

**TIR** (engl. *Toll-IL-1 receptor*) – familija receptora koja objedinjuje TLR i IL-1 familije

**TLR** (engl. *Toll-like Receptors*) – receptori slični Toll-u

**TNF** (engl. *Tumor necrosis factor*) – faktor nekroze tumora

**TRAF** (engl. *TNF-Receptor-associated factor*) – faktor povezan sa TNF receptorom; signalni molekul

**Treg** - regulatorni T limfocit

**Tris** – tris(hidroksimetil)aminometan

**TRITC** – tetrametilrodamin-5-(i 6)-izotiocijanat

**U** – uracil

**uPA** ( od engl. *urokinase Plasminogen Activator*) – urokinazni aktivator plazminogena

**VCAM - 1** (od engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) – adhezivni molekul vaskularnih ćelija-1

**VEGF** (od engl. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularno endotelski faktor rasta

**VLA-4** (od engl. *Very Late Antigen*) – integrin T limfocita

**WB** – Western blot

**ZLP** - zajednički limfoidni progenitori

**ZMP** - zajednički mijeloidni progenitori

## BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Okić Đorđević je rođena 01. decembra 1981. godine u Beogradu. Nakon završene VI Beogradske gimnazije (prirodno-matematički smer) u Beogradu, školske 2000/2001. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (grupa *Biologija, smer Embriologija i histologija*). Diplomirala je oktobra 2007. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8,03 odbranivši diplomski rad pod nazivom: *Morfološke promene mitohondrija adipocita mrkog masnog tkiva pod uticajem kalcijuma* sa ocenom 10. Doktorske studije Ivana Okić Đorđević upisala je 2008. god. na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na programu *Imunobiologija*. Položila je sve programom predviđene ispite sa srednjom ocenom 9.36.

Od maja 2008. godine Ivana Okić Đorđević je uključena u rad na projektu Ministarstva za nauku *Ćelijski i molekularni mehanizmi regulacije hematopoeze* (#145048) na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, kao volonter, a oktobra 2008. god. zaposlena je u okviru istog projekta prvo kao istraživač pripravnik i od oktobra 2011.god. kao istraživač saradnik u Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju. Od januara 2011. godine Ivana Okić Đorđević je angažovana na projektu *Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija* (#175062) a od juna 2014. je saradnik na projektu Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu *Proizvodnja novih dijetetskih formulacija na bazi prirodnih proteina sa antioksidativnim i antitumorskim dejstvom*. Angažovana je na bilateralnom projektu sa Republikom Austrijom.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila dvadeset osam bibliografskih jedinica: ukupan broj objavljenih radova u celini je 21, od čega su 4 rada objavljena u vrhunskim časopisima (M21), 5 radova u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i 10 radova u časopisu međunarodnog značaja (M23). Objavila je 7 radova saopštenih u izvodu (M34).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а **Ивана Н. Окић Ђорђевић**

број индекса **Б901/2008**

### Изјављујем

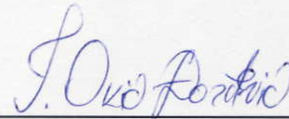
да је докторска дисертација под насловом

**Ефекти Интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума**

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

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2016.



---

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора	<b>Ивана Н. Окић Ђорђевић</b>
Број индекса	<b>Б901/2008</b>
Студијски програм	<b>Имунобиологија</b>
Наслов рада	<b>Ефекти Интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума</b>
Ментор	<b>др Александра Јауковић</b> , виши научни сарадник Институт за медицинска истраживања Универзитет у Београду

Потписана **Ивана Н. Окић Ђорђевић**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2016.

  
\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Ефекти Интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума**

која је моје ауторско дело.

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

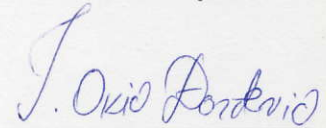
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду, 26.08.2016.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.