

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Đokić

**KARAKTERIZACIJA I ISPITIVANJE  
IMUNOMODULATORNIH SVOJSTAVA  
MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZOLOVANIH  
IZ DENTALNOG TKIVA ČOVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

BIOLOGICAL FACULTY

Jelena M. Đokić

**CHARACTERISATION AND ANALYSIS OF  
IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF  
MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM  
HUMAN DENTAL TISSUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

Dr Miodrag Čolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu i redovni član SANU

Dr Biljana Božić, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija u sastavu:

Dr Miodrag Čolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu i redovni član SANU

Dr Biljana Božić, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Milena Kataranovski, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je urađena na Institutu za biomedicinska istraživanja, Vojnomedicinske Akademije u Beogradu, pod rukovodstvom akademika Miodraga Čolića. Disertacija je realizovana u okviru projekta *Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (evidencioni broj 175102)*: „Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u terapiji tumora“, i u okviru projekta *Ministarstva odbrane Republike Srbije (evidencioni broj VMA/06-10/B.2)*, čiji je rukovodilac akademik Miodrag Čolić.

Svojim mentorima, *akademiku Miodragu Čoliću* i *profesorki dr Biljani Božić* izražavam duboko poštovanje i izuzetnu zahvalnost na ukazanom poverenju, podršci i strpljenju od prvih koraka u laboratorijskom radu do konačne realizacije ove teze.

Duboko poštovanje i veliku zahvalnost izražavam *profesorki dr Mileni Kataranovski* koja mi je svojim predavanjima u okviru predmeta Imunobiologija na osnovnim studijama ulila ljubav prema ovoj oblasti i snažno uticala na moje profesionalno interesovanje.

Veliku zahvalnost dugujem *Sergeju Tomiću* na svesrdnoj pomoći pri osmišljavanju i izvođenju eksperimenata, i tumačenju značaja dobijenih rezultata u svetu mezenhimskih matičnih ćelija. Takođe, Sergeju dugujem neizmernu zahvalnost na podršci, razumevanju, strpljenju i ohrabivanju koje mi je pružio tokom izrade ove doktorske teze.

*Profesorki dr Veri Todorović* izražavam najdublje poštovanje i veliku zahvalnost na svesrdnoj pomoći i saradnji tokom istraživanja koja su sprovedena u toku izrade ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem *profesorki dr Dragani Vučević* na značajnoj stručnoj pomoći i prijateljskim savetima koje mi je pružala tokom višegodišnjeg rada na ovoj tezi.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja *dr Saši Vasiljiću, dr Petru Milosavljeviću* i *Ivani Majstorović* na stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove teze.

Svojim kolegama doktorantima, *dr Tanji Džopalić, dr Ivanu Rajkoviću, dr Ani Dragičević, dr Dušanu Mihajloviću* i *Milanu Markoviću* se zahvaljujem na prijateljskim savetima od samog početka do finalizacije ove teze.

*Svim svojim prijateljima* se zahvaljujem na razumevanju i podršci koja mi je izuzetno značila.

Neizmernu zahvalnost dugujem *svojim roditeljima* i *svom bratu* na podršci, razumevanju, strpljenju i ohrabivanju tokom mog celokupnog školovanja.

*Barbari,*

*mom najvećem uspehu...*

## **Karakterizacija i ispitivanje imunomodulatornih svojstava mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz dentalnog tkiva čoveka**

Mezenhimske matične ćelije (engl. mesenchymal stem cells, MSC) izolovane iz različitih tkiva se sve više ispituju kao potencijalno sredstvo u terapiji oštećenja tkiva i/ili inflamacijskih bolesti. U poređenju sa MSC iz kostne srži, MSC iz dentalnih tkiva su znatno pristupačnije. Međutim, potencijal za primenu MSC iz dentalnih tkiva u ćelijskoj terapiji je još nedovoljno ispitan, obzirom na to da se MSC iz različitih dentalnih tkiva razlikuju po potencijalu za diferencijaciju, i da podaci o njihovim imunomodulatornim osobinama gotovo da ne postoje. Stoga je cilj ove teze bio da se uporede fenotipske osobine, sposobnost diferencijacije i imunomodulatorne osobine MSC iz različitih dentalnih tkiva zdravih donora. Takođe, nije poznato da li faktori inflamacije i infekcije mogu modifikovati imunomodulatorne osobine ovih MSC, i koji mehanizmi su uključeni u ove procese. U tom smislu je ispitivano da li su imunomodulatorne osobine MSC izolovanih iz zdravih dentalnih tkiva podložne modulaciji agonistima Toll-u sličnih receptora (TLR), važnim inicijatorima imunskog odgovora u tkivu. Pored toga, jedan od ciljeva je bio ispitati da li su fenotip, sposobnost za diferencijaciju i imunomodulatorne osobine MSC izolovanih iz hronične inflamacije, kakva je periapeksna lezija (PL), izmenjene u odnosu na MSC iz zdravih dentalnih tkiva. Takođe, nije poznato kakve efekte PL-MSK ostvaruju na inflamacijske ćelije periapeksne lezije, i koji su potencijalni mehanizmi odgovorni za njihov efekat. U tom smislu bi proučavanje interakcije PL-MSK sa dendritskih ćelijama (DC), ključnim inicijatorima i regulatorima imunskog odgovora, značajno doprinelo razumevanju imunoregulatornih mehanizama MSC u inflamaciji, zbog čega je ispitivanje ovih interakcija bio važan cilj naših istraživanja.

U svrhu ovih ispitivanja humane MSC su izolovane kao adherentne ćelije nakon kolagenazno/DNKznog tretmana dentalne pulpe (DP) i dentalnog folikula (DF) zdravog trećeg molara, i periapeksne lezije. Kapacitet za samo-obnavljanje DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK je ispitan na osnovu njihove sposobnosti za formiranje kolonija nalik

fibroblastima, i vremena potrebnog za dupliranje populacije. Nakon indukcije adipogeneze, osteogeneze i hondrogenoze diferencijacioni potencijal MSC je ispitivan imunohistohemijskim i imunocitohemijskim metodama. Pomoću protočne citofluorimetrije i imunocitohemijske analize je, na osnovu ekspresije CD29, CD90, CD73, CD105, CD44, CD46, CD166, CD146, CD271, STRO-1, i odsustva ekspresije HLA-DR, CD19, CD14, CD45, CD34 na DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC, potvrđeno da ove ćelijske linije ispoljavaju fenotip karakterističan za MSC. Imunomodulatorni potencijal DP-MSC i DF-MSC, pre i nakon aktivacije sa TLR3 i TLR4 agonistima, kao i imunomodulatorni potencijal PL-MSC, je ispitivan u ko-kulturi sa mitogenom aktiviranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Uloga solubilnih molekula produkovanih od strane PL-MSC u efektima na inflamacijske mononuklearne ćelije izolovane iz periapeksne lezije (engl. periapical lesions inflammatory cells, PL-IC) je ispitivana u ko-kulturama sa direktnim međućelijskim kontaktom ili sa umetnutom poroznom membranom (engl. Transwell system). Na presecima periapeksnih lezija je, na konfokalnom mikroskopu, analizirana distribucija i ko-lokalizacija MSC, obeleženih monoklonskim antitelima na STRO-1 i CD146, i DC, obeleženih monoklonskim antitelima na CD83, CD209, CD11c i HLA-DR. Efekti PL-MSC na diferencijaciju, sazrevanje i funkcije DC poreklom od monocita, je ispitivan u direktnim i indirektnim ko-kulturama. Nakon diferencijacije indukovane sa GM-CSF/IL-4 i sazrevanja indukovano citokinima, fenotip kontrolnih DC ili DC ko-kultivisanih sa PL-MSC, je analiziran citofluorimetrijom, dok je funkcija ovih ćelija ispitivana analizom produkcije citokina, i analizom njihovog alostimulatornog i polarizacionog kapaciteta u alogenoj ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima.

Naša istraživanja su pokazala da DF-MSC i DP-MSC imaju fenotipske osobine MSC, s tim da DF-MSC imaju nešto veći potencijal za samo-obnavljanje i izraženiji adipogeni potencijal, u poređenju sa DP-MSC koje su pokazale snažniji osteo/hondrogeni potencijal. DP-MSC su, za razliku od DF-MSC, ispoljavale TGF- $\beta$ -zavisan anti-proliferativni efekat na fitohemaglutininom stimulisane PBMC u ko-kulturi, iako su nakon transplantacije u neonatalne miševе, oba tipa ćelija izazvala formiranje granulomatoznog tkiva. Tretman TLR3 agonistom je pojačao imunosupresivnu aktivnost DP-MSC i indukovao



imunosupresivnu aktivnost DF-MSC, stimulacijom produkcije TGF- $\beta$  od strane ovih ćelija. Aktivacija TLR4 na DF-MSC indukovala je produkciju TGF- $\beta$  i imunosupresivnu aktivnost ovih ćelija, dok su DP-MSC nakon ovog tretmana značajno slabije ispoljavale indolamin-2,3-dioksigenazu-1 (IDO-1), TGF- $\beta$ , i imunosupresivne efekte. PL-MSC ispoljavaju fenotip karakterističan za MSC, poseduju naj snažniji osteo/hondrogeni kapacitet, ali i slabiji kapacitet za samo-obnavljanje, u poređenju sa DP-MSC i DF-MSC iz zdravih tkiva. PL-MSC su bez dodatnih tretmana ispoljile anti-proliferativni efekat na stimulisane PBMC i delovale supresivno na produkciju IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-5, dok su istovremeno stimulisale produkciju TGF- $\beta$  u ko-kulturi. Sem toga, PL-MSC su u ko-kulturi sa PL-IC, posredstvom solubilnih molekula, inhibirale produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, i u direktnom ćelijskom kontaktu produkciju IL-8. Pokazano je da DC, koje imaju ključnu ulogu u razvoju i održavanju PL, dolaze u blizak kontakt sa PL-MSC *in situ*. Koristeći *in vitro* model dobijanja DC iz monocita periferne krvi, nađeno je da, iako PL-MSC inhibiraju proces diferencijacije DC iz monocita, to ne ometa njihovo sazrevanje. Nakon tretmana pro-inflamacijskim citokinima, ovako dobijene zrele DC favorizuju razvoj snažnijeg Th2/Th17 odgovora u ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima, u poređenju sa kontrolnim zrelim DC. DC koje su samo tokom faze sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC su ispoljile snažniju alostimulatornu sposobnost i indukovale značajno jači Th1 odgovor u poređenju sa kontrolom. Nasuprot tome, DC ko-kultivisane sa PL-MSC i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja su pokazale tolerogene osobine. Naime, ovako dobijene DC su, iako fenotipski zrele, imale značajno slabiju alostimulatornu sposobnost, stimulisale su Th2 odgovor, indukovale anergiju CD4<sup>+</sup>T limfocita, i posredstvom ILT3, ILT4 i IDO-1 indukovale diferencijaciju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD39<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> regulatornih T ćelija.

U zaključku se može istaći da ćelije izolovane metodom adherence iz dentalne pulpe, dentalnog folikula i periapeksnih lezija, u uslovima kulture poseduju karakteristike MSC, ali se razlikuju po kapacitetu za samo-obnavljanje, fenotipu i potencijalu za diferencijaciju. Takođe, DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC poseduju različit imunomodulatorni potencijal, koji je povezan sa produkcijom solubilnih molekula od strane ovih MSC *in vitro*. Imunomodulatorni efekti DP-MSC i DF-MSC se različito menjaju pod uticajem TLR

agonista, što može biti značajno za njihov terapijski potencijal. Iako PL-MSK ispoljavaju supresivni efekat na funkciju inflamacijskih ćelija periapeksne lezije, njihov efekat na DC zavisi od faze razvoja DC. PL-MSK indukuju razvoj DC sa pro-inflamacijskim osobinama, koje bi mogle biti ključne u inicijaciji i održavanju lokalnog imunskog odgovora, ili DC sa tolerogenim osobinama, koje bi mogle učestvovati u rezoluciji inflamacije.

**Ključne reči:** mezenhimske matične ćelije, dentalna tkiva, periapeksna lezija, inflamacija, imunomodulacija, dendritske ćelije

Naučna oblast: Fiziologija životinja i čoveka

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK: 616-097:[602:611.013.39]:[611.314+616.314.17](043.3)

## **Characterisation and analysis of the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues**

Mesenchymal stem cells (MSC) isolated from various tissues, are increasingly investigated as a potent tool for the therapy of damaged tissues and/or inflammatory diseases. Compared to bone marrow MSC, MSC from dental tissues are more accessible. However, the therapeutic potential of MSC from dental tissues is not investigated enough, since a body of evidence suggests that the MSC isolated from various dental tissues differ in their differentiation potential, whereas the studies on their immunomodulatory properties are largely missing. Therefore, the aim of this thesis was to compare the phenotypic characteristics, differentiation potential and immunomodulatory properties of MSC isolated from different dental tissues of healthy donors. Further, it is not known whether the factors present at the site of inflammation and infection can modify the immunomodulatory properties of these MSC, and what mechanisms are involved in these processes. Regarding this, we examined whether the immunomodulatory properties of MSC isolated from healthy dental tissues are susceptible to modulation with Toll-like receptor (TLR) agonists, major initiators of the immune response in a tissue. In addition, one of the aims was to examine whether the phenotype, differentiation potential and immunomodulatory properties of MSC isolated from a chronic inflammation, such as periapical lesion (PL), is altered, in comparison to MSC from healthy dental tissues. It is also unknown what effects do PL-MSC exert on the inflammatory cells of PL, and what potential mechanisms are involved in these effects. In this sense, investigation of the interaction between PL-MSCs and dendritic cells (DC), the key initiators and regulators of the immune response, would significantly contribute to the understanding of immunoregulatory mechanisms of MSC in inflammation, so the analysis of this interaction was of immense importance in our research.

To investigate this, human MSC were isolated as adherent cells upon collagenase/DNAse treatment of dental pulp (DP) and dental follicle (DF) from the third healthy molar, and

periapical lesions. Self-renewal capacity of DP-MSC, DF-MSC and PL-MSC were analysed on the bases of their potential to form colony forming units-like fibroblast, and the time needed for doubling of their population. After the induction of adipogenesis, osteogenesis and hondrogenesis, the differentiation potential of MSC was analysed by imunohistochemistry and immunocytochemistry. Using the flow cytometry and immunocytochemical methods, which revealed the presence of CD29, CD90, CD73, CD105, CD44, CD46, CD166, CD146, CD271 and STRO-1 expression, as well as the absence of HLA-DR, CD19, CD14, CD45, CD34 expression by DP-MSC, DF-MSC and PL-MSC, it was confirmed that these cell lines express the phenotype characteristic for MSC. Immunomodulatory potential of DP-MSC and DF-MSC, either before or after the treatment with TLR4 and TLR3 agonists, and the immunomodulatory potential of PL-MSC, was analysed in co-culture with mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The role of soluble molecules produced by PL-MSC, in their effects on inflammatory mononuclear cells from periapical lesions (PL-IC), was analysed in a direct co-culture, or in a Transwell system. The distribution and co-localization of MSC, labelled with anti-STRO-1 and anti-CD146 monoclonal antibodies, and DC, labelled with anti-CD83, anti-CD209, anti-CD11c and anti-HLA-DR monoclonal antibodies, was analysed on cross-sections of PLs using the confocal microscopy. The effects of PL-MSCs on differentiation, maturation and functions of DC derived from peripheral blood monocytes, were investigated in a direct, or indirect co-cultures. After the differentiation of DCs induced by GM-CSF/IL-4, and their maturation induced by cytokines, the phenotype of control DC, and DC co-cultivated with PL-MSC, was analysed by using flow cytometry, whereas their functions were tested by analysing the production of cytokines, their allostimulatory capacity and polarisation capability in a co-culture with allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells.

Our investigation showed that DP-MSC and DF-MSC express phenotype which is a characteristic of MSC, but DF-MSCs had a higher self-renewal potential and exhibited a higher potential to form adipocytes, compared with DP-MSCs, which possessed a stronger osteo/chondrogenic potential. DP-MSCs, unlike DF-MSC, possessed TGF- $\beta$ -dependent

anti-proliferative effect on phytohemagglutinine-stimulated PBMC in co-culture, although the transplantation of both cell types in neonatal mice, induced the formation of granulomatous tissue. TLR3-agonist treatment, augmented the suppressive potential of DP-MSC, and induced the immunosuppressive activity of DF-MSC, by stimulating their production of TGF- $\beta$ . Activation of TLR4 on DF-MSC induced their production of TGF- $\beta$  and immunosuppressive activity of these cells, but abrogated the immunosuppressive activity of DP-MSCs, by inhibiting TGF- $\beta$  production and the expression of indolamine-2,3-dioxygenase-1 (IDO-1). PL-MSC were characterized by a typical MSC phenotype, the strongest osteo/chondrogenic capacity, but the lowest self-renewal rate, compared to DF-MSC and DP-MSC from healthy tissues. PL-MSC, even without an additional treatment, inhibited the proliferation of activated PBMC, suppressed their production of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-5 and stimulated the production of TGF- $\beta$  in the co-culture. Furthermore, PL-MSC suppressed the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  by PL-IC via soluble mediators, whereas the suppression of IL-8 production required a direct cell-to-cell contact. It was shown that DC, which have a crucial role in the development of PL, co-localized with PL-MSC *in situ*. Accordingly, using a model of monocyte-derived DC, we showed that, although PL-MSCs inhibited the differentiation of DCs from monocytes, this does not interfere with the subsequent maturation of DCs. Such DC treated with with pro-inflammatory cytokines, favoured the production of Th2/Th17 cytokines in the co-culture with allogeneic CD4<sup>+</sup> lymphocytes, compared to control mature DCs. DCs cultivated with PL-MSCs only during the maturation, exhibited an increased allostimulatory capability and induced a stronger Th1 polarisation compared to control. In contrast, DCs both differentiated and matured with PL-MSCs, acquired tolerogenic properties upon maturation with proinflammatory cytokines. Such DC, although phenotypically mature, exhibited a poor allostimulatory activity, stimulated Th2 polarisation, induced CD4<sup>+</sup> T cell anergy, and via differentiation of suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> Treg cells via IDO-1, ILT-3, and ILT-4.

In conclusion, the cells isolated by adherence from dental pulp, dental follicle and periapical lesions, posses MSC properties in culture, although they differ mutually in the

self-renewal capacity, phenotype and differentiation potential. Furthermore, DP-MSC, DF-MSC and PL-MSC differ in their immunomodulatory potential, which is predominantly mediated by soluble molecules produced by these cells *in vitro*. Immunomodulatory effects of DP-MSC and DF-MSC are differentially modified by TLR ligation. Although PL-MSC exhibit suppressive effects on PL-ICs, their effect depend on the DCs' development stage. PL-MSCs induce the development of DCs with pro-inflammatory properties that could be crucial for the initiation and maintaining of the local immune response, or DCs with tolerogenic properties that could contribute to the resolution of inflammation.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, dental tissues, periapical lesions, inflammation, immunomodulation, dendritic cells

Scientific field: Animal and human physiology

Narrower scientific field: Immunology

UDC: 616-097:[602:611.013.39]:[611.314+616.314.17](043.3)

## - SADRŽAJ -

<b>1.UVOD</b> .....	1
<b>1.1. MATIČNE ĆELIJE</b> .....	1
1.1.1. Mezenhimske matične ćelije.....	3
1.1.1.1. Fenotipske karakteristike MSC.....	5
1.1.1.2. Potencijal MSC za samo-obnavljanje .....	8
1.1.1.3. Potencijal MSC za diferencijaciju.....	11
1.1.1.3.1. Hondrogeneza.....	14
1.1.1.3.2. Osteogeneza.....	17
1.1.1.3.3. Adipogeneza.....	19
1.1.2. Razviće zuba i MSC poreklom iz zdravih dentalnih tkiva.....	20
1.1.2.1. MSC izolovane iz dentalne pulpe zdravih stalnih zuba.....	24
1.1.2.2. MSC izolovane iz dentalne pulpe zdravih mlečnih zuba.....	25
1.1.2.3. MSC izolovane iz zdravog periodontalnog ligamenta.....	26
1.1.2.4. MSC izolovane iz zdrave apikalne papile.....	26

1.1.2.5. <b>MSC izolovane iz zdravog dentalnog folikula</b> .....	27
1.1.3. Toll-u slični receptori i uticaj njihovih agonista na osobine MSC.....	28
1.1.3.1. <b>Uticaj agonista TLR na osobine MSC</b> .....	32
1.1.3.2. <b>Uloga TLR i inflamacije u razvoju periapiksne lezije</b> .....	35
1.1.3.3. <b>MSC izolovane sa mesta inflamacije</b> .....	37
1.1.4. <b>Imunomodulacijska svojstva MSC</b> .....	38
1.1.4.1. <b>Interakcija MSC sa komponentama urođenog imunskog sistema</b> .....	40
1.1.4.2. <b>Dendritske ćelije, T limfociti i MSC: U komunikaciji urođenog i adaptivnog imunskog sistema</b> .....	41
1.1.4.2.1. <i>Dobijanje dendritskih ćelija in vitro</i> .....	41
1.1.4.2.2. <i>Tri signala u interakciji dendritskih ćelija i T limfocita</i> .....	42
1.1.4.2.3. <i>Polarizacija odgovora pomoćničkih T limfocita u Th1, Th2 i Th17 pravcu</i> .....	43
1.1.4.2.4. <i>Polarizacija odgovora pomoćničkih T limfocita u pravcu odgovora regulatornih T limfocita</i> .....	46
1.1.4.2.5. <i>Interakcija MSC sa T limfocitima</i> .....	48
1.1.4.2.6. <i>Osobine tolerogenih dendritskih ćelija</i> .....	51



1.1.4.2.7. Interakcije MSC sa dendritskim ćelijama.....	53
1.1.4.2.8. Mehanizmi delovanja solubilnih molekula koji posreduju u imunomodulatornim efektima MSC, tolerogenih dendritskih ćelija i regulatornih T limfocita .....	54
1.1.4.2.8.1. Indolamin-2, 3-dioksigenaza-1.....	54
1.1.4.2.8.2. TGF-β.....	56
1.1.4.2.8.3. IL-6.....	59
1.1.4.2.8.4. IL-10.....	60
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI.....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1. IZOLACIJA TKIVA I ĆELIJA .....</b>	<b>64</b>
3.1.1. Izolacija i uspostavljanje linija MSC.....	65
3.1.2. Izolacija mononuklearne frakcije ćelija na gustinskom gradijentu.....	66
3.1.3. Izdvajanje pojedinačnih ćelijskih tipova korišćenjem magnetnog sortiranja.....	67
3.1.4. Brojanje ćelija.....	68
<b>3.2. KARAKTERIZACIJA ĆELIJA IZOLOVANIH IZ</b>	

<b>TKIVA ZDRAVOG ZUBA I PERIAPEKSNE LEZIJE.....</b>	<b>68</b>
3.2.1. Potencijal za samo-obnavljanje.....	69
3.2.1.1. Formiranje kolonija nalik fibroblastima.....	69
3.2.1.2. Vreme dupliranja populacije.....	69
3.2.2. Analiza fenotipa na protočnom citofluorimetru.....	70
3.2.3. Analiza fenotipa ćelija imunocitohemijskom metodom i detekcija pojedinačnih ćelijskih tipova unutar tkiva imunohistohemijskom metodom.....	73
3.2.4. Detekcija ko-lokalizacije DC i MSC unutar periapeksne lezije.....	75
3.2.5. Sposobnost diferencijacije MSC u ćelijske tipove mezenhimskog porekla <i>in vitro</i> .....	75
3.2.6. Transplantacija MSC u ksenogenog domaćina.....	77
<b>3.3. ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNE SPOSOBNOSTI MSC IZ ZUBA I PERIAPEKSNE LEZIJE.....</b>	<b>78</b>
3.3.1.1. Kulture DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC sa mononuklearima periferne krvi .....	79
3.3.1. Kulture PL-MSC sa inflamacijskim ćelijama periapeksne lezije.....	80
3.3.2. Efekat PL-MSC na proces dobijanja dendritskih	

ćelija <i>in vitro</i> .....	81
3.3.3. Mešana leukocitna reakcija.....	83
3.3.4. Proliferativni odgovor ćelija.....	84
3.3.5. Određivanje nivoa produkovanih citokina u kulturama i ko-kulturama ćelija.....	85
3.3.6. Analiza ekspresije indolamin-2,3-dioksigenaze-1, Foxp3 i IL-10.....	86
3.3.7. Izolacija RNK.....	86
3.3.8. Revrzna transkripcija-PCR.....	87
<b>3.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....</b>	<b>88</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA ĆELIJSKIH LINIJA IZOLOVANIH IZ DELOVA ZDRAVOG ZUBA I PERIAPEKSNE LEZIJE KAO MSC.....</b>	<b>89</b>
4.1.1. Morfološke karakteristike i sposobnost za samo-obnavljanje DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC.....	89
4.1.2. Fenotipske karakteristike DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC.....	93
4.1.3. Potencijal DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC za diferencijaciju.....	100
4.1.4. Transplantacija MSC u ksenogenog domaćina.....	104

<b>4.2. IMUNOMODULATORNE KARAKTERISTIKE</b>	
<b>MSC IZOLOVANIH IZ ZDRAVOG DENTALNOG TKIVA....</b>	<b>108</b>
4.2.1. Efekat DP-MSC i DF-MSC na proliferaciju alogenih mononuklearnih ćelija periferne krvi <i>in vitro</i> .....	108
4.2.2. Mehanizmi koji posreduju u imunosupresivnom efektu DP-MSC i DF-MSC na mononuklearne ćelije periferne krvi <i>in vitro</i> .....	111
<b>4.3. IMUNOMODULATORNE KARAKTERISTIKE PL-MSC.....</b>	<b>115</b>
4.3.1. Efekat PL-MSC na proliferaciju i produkciju citokina od strane alogenih mononuklearnih ćelija periferne krvi <i>in vitro</i> .....	115
4.3.2. Efekat PL-MSC na produkciju citokina od strane alogenih inflamacijskih ćelija periapeksne lezije <i>in vitro</i> .....	118
4.3.3. Interakcije između PL-MSC i dendritskih ćelija.....	121
<b>4.3.3.1. Ko-lokalizacija MSC i dendritskih ćelija unutar periapeksne lezije.....</b>	<b>121</b>
<b>4.3.3.2. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces diferencijacije dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi <i>in vitro</i>.....</b>	<b>126</b>
<b>4.3.3.3. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces sazrevanja dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi <i>in vitro</i>.....</b>	<b>134</b>

4.3.3.4. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces diferencijacije i sazrevanja dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi <i>in vitro</i> .....	138
4.3.3.5. Dendritske ćelije dobijene u prisustvu PL-MSC indukuju anergiju i funkcionalne Treg populacije mehanizmima koji uključujuIDO-1, ILT-3 i ILT-4. ....	146
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	156
<b>5.1. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC SE RAZLIKUJU PO FENOTIPU</b> .....	158
5.1.1. Ćelijske populacije izolovane iz dentalne pulpe, dentalnog folikula i periapeksne lezije ne ispoljavaju markere karakteristične za antigen prezentujuće ćelije, B limfocite, monocite i hematopoetske matične ćelije.....	161
<b>5.2. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC SE MEĐUSOBNO RAZLIKUJU PO POTENCIJALU ZA SAMO-OBNAVLJANJE</b> .....	162
<b>5.3. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC SE MEĐUSOBNO RAZLIKUJU PO SPOSOBNOSTI ZA DIFERENCIJACIJU U ĆELIJSKE TIPOVE MEZENHIMSKOG POREKLA</b> .....	164
<b>5.4. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC IZAZIVAJU TRANSPLANTACIJSKU REAKCIJU NAKON IN VIVO PRIMENE KOD NEONATALNIH MIŠEVA</b> .....	166

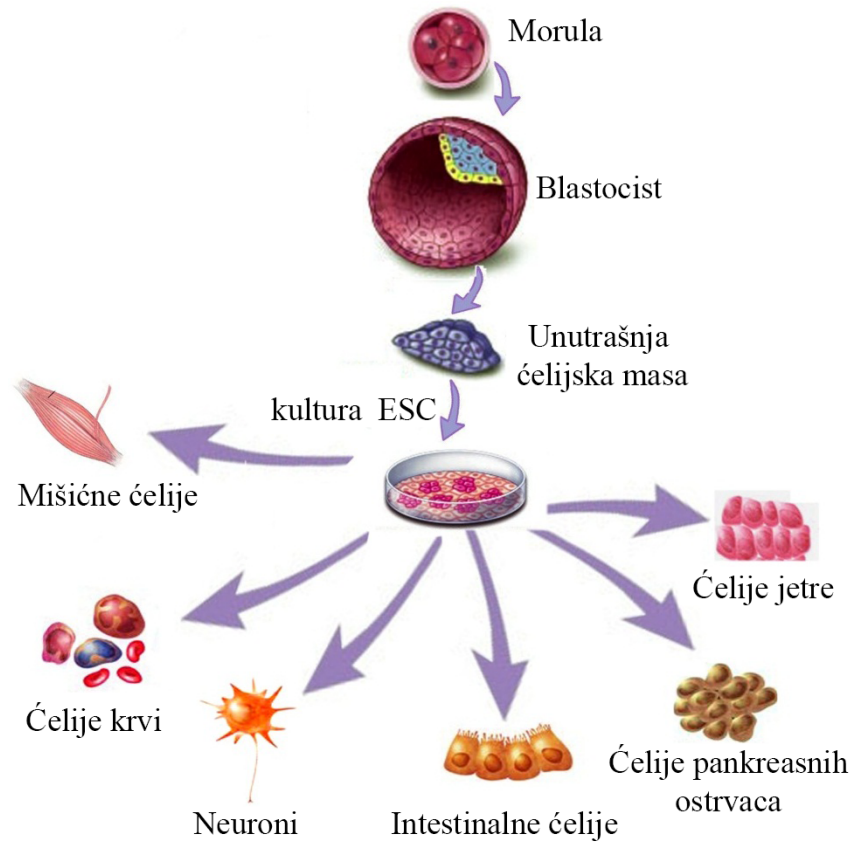
<b>5.5. DP-MSC, ZA RAZLIKU OD DF-MSC, POSEDUJU IMUNOSUPRESIVNE OSOBINE.....</b>	<b>167</b>
<b>5.6. AGONISTI TLR MENJAJU IMUNOMODULATORNE OSOBINE DP-MSC I DF-MSC.....</b>	<b>169</b>
<b>5.7. IMUNOSUPRESIVNI MEHANIZMI DP-MSC I DF-MSC SU PODLOŽNI MODULACIJI TLR AGONISTIMA.....</b>	<b>171</b>
<b>5.8. PL-MSC ISPOLJAVAJU ANTI-PROLIFERATIVNI I ANTI-INFLAMATORNI EFEKAT NA MONONUKLEARE PERIFERNE KRVI <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>176</b>
<b>5.9. PL-MSC ISPOLJAVAJU ANTI-INFLAMATORNI EFEKAT NA MONONUKLEARE IZOLOVANE IZ PERIAPEKSNE LEZIJE <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>177</b>
<b>5.10. PL-MSC RAZLIČITO UTIČU NA PROCES DOBIJANJA DENDRITSKIH ĆELIJA IZ MONOCITA PERIFERNE KRVI <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>178</b>
5.10.1. PL-MSC deluju inhibitorno na diferencijaciju dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi <i>in vitro</i> .....	179
5.10.2. Dendritske ćelije diferencirane u prisustvu PL-MSC, nakon faze sazrevanja indukuju Th2/Th17 odgovor.....	180
5.10.3. Dendritske ćelije čije je sazrevanje indukovano u prisustvu PL-MSC indukuju snažniji Th1 odgovor.....	181

5.10.4. Dendritske ćelije koje su i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja bile izložene direktnom uticaju PL-MSK stiču imunosupresivne karakteristike.....	182
6. Zaključci.....	185
7. Literatura.....	188
8. Prilozi.....	220
9. Biografija.....	265

# 1.UVOD

## 1.1. MATIČNE ČELIJE

Matične ćelije poseduju nekoliko karakteristika po kojima se razlikuju od drugih ćelija. Na prvom mestu, one su nespecijalizovane i poseduju sposobnost samo-obnavljanja. Po stupnju razvića u kom nastaju se mogu razlikovati embrionalne matične ćelije (*engl.* embryonic stem cells, ESC) i post-natalne matične ćelije. Po stupnju diferenciranosti, odnosno po potencijalu za diferencijaciju ćelije mogu biti totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne. Totipotentne ćelije nastaju neposredno nakon oplodjenja jajne ćelije, a pre formiranja embrionalnih tkiva. Totipotentne ćelije se kultivacijom u



**Slika 1.1.** Poreklo i potencijal za diferencijaciju pluripotentnih ESC. Preuzeto i obrađeno iz Meregalli i sar. [1].



indukcionim medijumima mogu diferencirati u sve ćelijske tipove odraslog organizma koji vode poreklo od tri embrionalna tkiva [2-4], kao i u ekstraembrionalna tkiva [5-10]. U uslovima kultivacije bez stimulusa za diferencijaciju, ove ćelije ostaju nediferencirane i zadržavaju totipotentnost [11]. Međutim, totipotentnost je zapravo osobina koju poseduje samo oplodena jajna ćelija, i već njene ćerke ćelije se ne odlikuju ovakvim potencijalom za diferencijaciju [12]. Na osnovu ovoga se oplodena jajna ćelija i ne može smatrati matičnom ćelijom jer ne poseduje sposobnost samo-obnavljanja.

Pluripotentne ESC nastaju iz unutrašnje ćelijske mase blastocista [13] (Slika 1.1.), i one su izgubile sposobnost diferencijacije u ekstraembrionalna tkiva. Neki od mnogobrojnih markera koji se koriste za identifikaciju ESC su SSEA (*engl.* stage-specific embryonic antigen)-4, SSEA-1, Oct-4 (*engl.* octamer binding transcription factor-4), Notch, Nanog i drugi. Ovi molekuli direktno su uključeni u regulaciju potencijala za diferencijaciju i samo-obnavljanje ovih ćelija. Od otkrića do danas, pluripotentne ESC su ostale neiscrpan predmet istraživanja u različitim oblastima medicine, pre svega regenerativne medicine.

Za razliku od ESC, post-natalne matične ćelije imaju ograničen potencijal za diferencijaciju. Među ovim matičnim ćelijama, koje se mogu izolovati na različitim stupnjevima razvića u post-natalnom periodu, mogu se razlikovati ćelije sa različitim stepenom diferenciranosti. Kako je izolacija ESC iz humanih embriona u vezi sa mnogim etičkim pitanjima, i pošto ove ćelije nakon primene imaju potencijal za formiranje tumora [14], veoma su aktuelna ispitivanja kliničke primene matičnih ćelija koje se mogu izolovati iz tkiva odraslog čoveka [15]. Iz adultnih tkiva mogu se izolovati multipotentne ćelije, koje mogu dati sve tipove konačno diferenciranih ćelija koje vode poreklo iz jednog od tri embrionalna tkiva (mezoderm, ektoderm i endoderm). Adultne matične ćelije se samo-obnavljaju simetričnim deobama, dok asimetričnom deobom daju progenitorske ćelije. Potencijal za samo-obnavljanje nastalih progenitorskih ćelija je značajno ograničen, i u prisustvu određenog spoljašnjeg stimulusa one se diferenciraju u potpuno diferencirane ćelijske tipove koji više ne poseduju sposobnost mitoze [11, 16]. Prvo otkrivene, i do danas najviše istraživane adultne matične ćelije su hematopoetske matične ćelije (*engl.* hematopoietic stem cells, HSC) kostne srži, koje diferencijacijom daju sve ćelijske tipove krvi.

### 1.1.1. Mezenhimske matične ćelije

Prvi podaci o postojanju osteogene populacije matičnih ćelija u kostnoj srži odraslog organizma potiču još iz eksperimenata *Tavassoli i Crosby* iz 1968. godine [17]. Nedugo posle, *Fridenstein i saradnici* [18] su prvi put pokazali da ovakav potencijal poseduje jedna mala subpopulacija ćelija kostne srži morskog praseta (*Cavia porcellus*). Ova populacija ćelija takođe poseduje osobinu da raste u jednom sloju i njihovo potomstvo formira kolonije nalik kolonijama fibroblasta (*engl.* colony forming unit - like fibroblast, CFU-F) što po prvi put ukazuje na njihovo stromalno poreklo. Tokom naredne dve decenije *Fridenstein i kolege* su uradili niz *in vivo* transplantacija koje su dovele do saznanja da potomstvo jedne stromalne ćelije kostne srži može generisati različita mezenhimska tkiva (kost, hrskavicu, masno tkivo, i fibrozno tkivo) [19]. Ova otkrića su u početku imala značaj samo u eksperimentalnoj hematologiji, dok je tek kasnije uočen njihov značaj u biologiji skeletnog sistema i sa njim povezanih bolesti. Prvi koncept o posebnoj populaciji stromalnih ćelija koje regulišu HSC u slezini, dao je Schofield, 1978. godine [20]. Ovaj koncept podržan je i od strane istraživača koji su pokazali ulogu ćelijskih komponenti strome kostne srži u regulaciji HSC [21-22] i tako je nastala hipoteza o nišama matičnih ćelija u kostnoj srži, odnosno pretpostavci da je biologija HSC regulisana fizičkim kontaktom sa posebnim ćelijskim komponentama u kostnoj srži. U narednim istraživanjima pokazano je da su ove stromalne ćelije kostne srži uobičajeni prekursori tkiva mezenhinskog porekla. Zbog ove osobine, kao i zbog potencijala za samo-obnavljanje, 1991. godine *Caplan i saradnici* [23] su po prvi put, ovakve ćelije poreklom iz kostne srži, nazvali matičnim ćelijama, i to mezenhinskim matičnim ćelijama kostne srži (*engl.* bone marrow-mesenchymal stem cells, BM-MSC). Iako je ideja o postojanju mezenhimske populacije matičnih ćelija u stromi kostne srži, koja ima i regulatornu ulogu u biologiji HSC, bila dobro potkrepljena rezultatima svih ovih istraživača, ona je doživela značajniji uticaj tek nakon što su *Pittenger i saradnici*, objavili slične rezultate u okviru studije sprovedene pod pokroviteljstvom Osiris Therapeutics, Inc., 1999. godine [24].

Od ovog trenutka pokrenut je niz istraživanja sa ciljem primene MSC u regenerativnoj medicini. Ovim ćelijama ne bave se samo laboratorije sa iskustvom istraživanja u oblasti

matičnih ćelija, već su ove ćelije privukle i mnoge nove istraživače, što bez sumnje ubrzava proces naučnih otkrića i razvoj nove ćelijske terapije. Međutim, ovakav povećan interes istraživača iz različitih oblasti istraživanja, doveo je do mnogobrojnih nejasnoća i nesaglasnosti u vezi biologije MSC. Postoje mnoge protivrečnosti u definisanju osobina MSC među istraživačima. Mnoge istraživačke grupe razvile su metode izolacije i održavanja MSC, koje se često malo, ali ponekad i veoma značajno razlikuju međusobno. Osim toga, neprijatan postupak uzorkovanja kostne srži pacijenata, i mali prinos BM-MSC (0.001-0.002% ćelija kostne srži), podstakao je istraživanje alternativnih izvora ovih ćelija. Tako su do danas MSC izolovane iz krvi pupčane vrpce (*engl.* umbilical cord-blood derived MSC, UCB-MSC) [25], želatinozne mase koja okružuje krvne sudove pupčane vrpce nazvane Wharton Jelly (WJ-MSC), zuba [26], masnog tkiva (*engl.* adipose tissue-MSC, AT-MSC) [27], kože [28], mišića [29], jetre [30], sinovijalne membrane [31], pankreasa [32], pluća [33], amnijske tečnosti [34], placente [35], periferne krvi [36] i drugih tkiva. Uzimajući u obzir da se MSC mogu izolovati iz svih tkiva organizma u post-natalnom periodu, kao i razlike u metodologiji koja se koristi za njihovu izolaciju i održavanje *in vitro*, postavlja se pitanje da li su ćelije koje se dobijaju dovoljno slične da bi njihove osobine i rezultati eksperimenata opisani od strane različitih istraživačkih grupa, mogli biti direktno upoređivani, a posebno u smislu ćelijske terapije. Da bi se prevazišao ovaj problem, *Internacionalno udruženje za ćelijsku terapiju* (The International Society for Cellular Therapy, ISCT) je 2006. godine postavilo kriterijume koje treba da poseduju ćelije da bi se okarakterisale kao MSC [37] (Tabela 1). Prvu osobinu koju ćelije moraju da poseduju da bi se okarakterisale kao MSC je da, u standardnim uslovima kultivacije adheriraju na plastičnoj površini. Iako je pokazano da MSC mogu da se održavaju, i verovatno umnožavaju bez adherence, protokoli koji se u ovim postavkama primenjuju podrazumevaju veoma specifične uslove kultivacije [38], i očekuje se da i ove ćelije, kada se održavaju u standardnim uslovima poseduju osobinu adherence da bi se smatrale populacijom MSC. Osim osobine adherence, MSC ispoljavaju određenu kombinaciju površinskih molekula i imaju potencijal za diferencijaciju u osteoblaste, hondroblaste i adipocite.

**Tabela 1.** Kriterijumi za karakterizaciju MSC

(preuzeto od Dominici i saradnika [37], i prevedeno)

1. Adherenca za plastične površine u standardnim uslovima kultivacije		
2. Fenotip	<u>Pozitivne (<math>\geq 95\%</math>)</u>	<u>Negativne (<math>\leq 2\%</math>)</u>
	CD90	CD45
	CD73	CD34
	CD105	CD14 ili CD11b
		CD79 $\alpha$ ili CD19
		HLA-DR
3. Kapacitet za diferencijaciju u adipocite, hondroblaste i osteoblaste u <i>in vitro</i> uslovima (dokazuje se bojenjem <i>in vitro</i> ćelijskih kultura)		

### 1.1.1.1. Fenotipske karakteristike MSC

ISCT je predložila da je za karakterizaciju jedne ćelijske linije kao linije MSC neophodno da ćelije ispoljavaju karakterističnu kombinaciju tri markera: CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) i CD90. CD105 je protein koji ulazi u kompleks TGF- $\beta$  receptora III, koji sa visokim afinitetom vezuje TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2. *Spiropoulos i saradnici* [39] su pokazali da se sortiranjem ukupne populacije BM-MSC na osnovu ekspresije CD105, korišćenjem komercijalnog kita za obogaćivanje MSC, povećava procenat multipotentnih ćelija koje imaju visoku stopu proliferacije. U skladu sa tim, *Jin i saradnici* [40] su pokazali da ekspresija CD105 kod UCB-MSC opada sa procesom diferencijacije ovih ćelija. CD73 je ekto-5'-nukleotidaza, čijom aktivnošću nastaje adenzin koji može aktivirati široko rasprostranjen adenzinski receptor, zbog čega su *Barry i saradnici* [41] pretpostavili da je ovaj molekul uključen u interakcije BM-MSC sa drugim ćelijama strome kostne srži. Obzirom na imunosupresivne efekte adenzina ovaj molekul može biti uključen u imunomodulatorne aktivnosti MSC [42]. Nedavno je pokazano i da u toku mehaničkog opterećenja MSC dolazi do smanjenja migratorne sposobnosti MSC, i do značajnog smanjenja ekspresije CD73 i CD29, što ukazuje na to da ovi molekuli imaju važnu ulogu u migraciji MSC [43]. Uloga CD90 je slabije poznata. Pretpostavljeno je da ovaj molekul ima

ulogu u ćelijskoj interakciji [44-45], da je uključen u adheziju monocita i leukocita za ćelije endotela i fibroblaste [46-47], i da može imati ulogu u adherenci CD34<sup>+</sup> ćelija strome [48]. MSC u kulturi uniformno i snažno ispoljavaju CD105, CD90 i CD73, a ekspresija ovih markera se ne menja tokom kultivacije [24, 49]. Na osnovu ovih podataka se pretpostavlja da je kombinacija ovih markera dobra za karakterizaciju MSC. Međutim, fibroblasti kože, koji u odnosu na BM-MSC imaju značajno smanjen kapacitet proliferacije i predstavljaju konačno diferencirane ćelije [50-51], takođe ispoljavaju CD105 i CD73 [24, 51]. Ćelije endotela umbilikalne vene, koje slično kao i MSC adheriraju na plastične površine i mogu proliferisati *in vitro*, takođe su pozitivne za CD105 i CD73 [52-53]. Ovi rezultati su pokazali da ekspresija CD105 i CD73, bez ekspresije CD90, na adherentnim ćelijama u kulturi se ne može smatrati dovoljnom za karakterizaciju ćelija kao MSC. Činjenica da se ekspresija CD105, CD73 i CD90 ne menja sa povećanjem pasaža, iako se menjaju osobine MSC, takođe smanjuje značaj ove kombinacije markera kao zlatnog pravila za karakterizaciju MSC. Sem toga, značaj kombinacije ovih markera za karakterizaciju MSC je umanjen rezultatom koji su još *Pittenger i sardnici* [24] pokazali, da sve MSC dobijene iz jedne kolonije ispoljavaju CD73 i CD105, iako se samo 1/3 ovih ćelija odlikuje multipotentnošću. Ovi podaci su inicirali potragu za novim jedinstvenim markerom MSC. Međutim, do danas nije otkriven univerzalni marker MSC. Ovo nije začuđujuće ako se uzme u obzir intrapopulaciona heterogenost ćelija u populaciji MSC dobijenih metodom adherence. Na ovaj način izolovana populacija MSC sadrži ćelije koje se međusobno razlikuju po ekspresiji većine do danas ispitivanih markera, što je u vezi sa razlikama u potencijalu za samo-obnavljanje, diferencijaciju, migraciju i drugim osobinama ovih ćelija [54]. Zbog toga cilj pronalaženja novog markera MSC nije samo da omogući razlikovanje MSC od drugih ne-mezenhimskih ćelija, već da omogući čistiju izolaciju subpopulacija MSC sa određenim karakteristikama. Neki od markera koji se često koriste u karakterizaciji MSC su STRO-1, CD146, CD44, CD56, CD106 (*engl.* vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), CD166 (ALCAM), CD271.

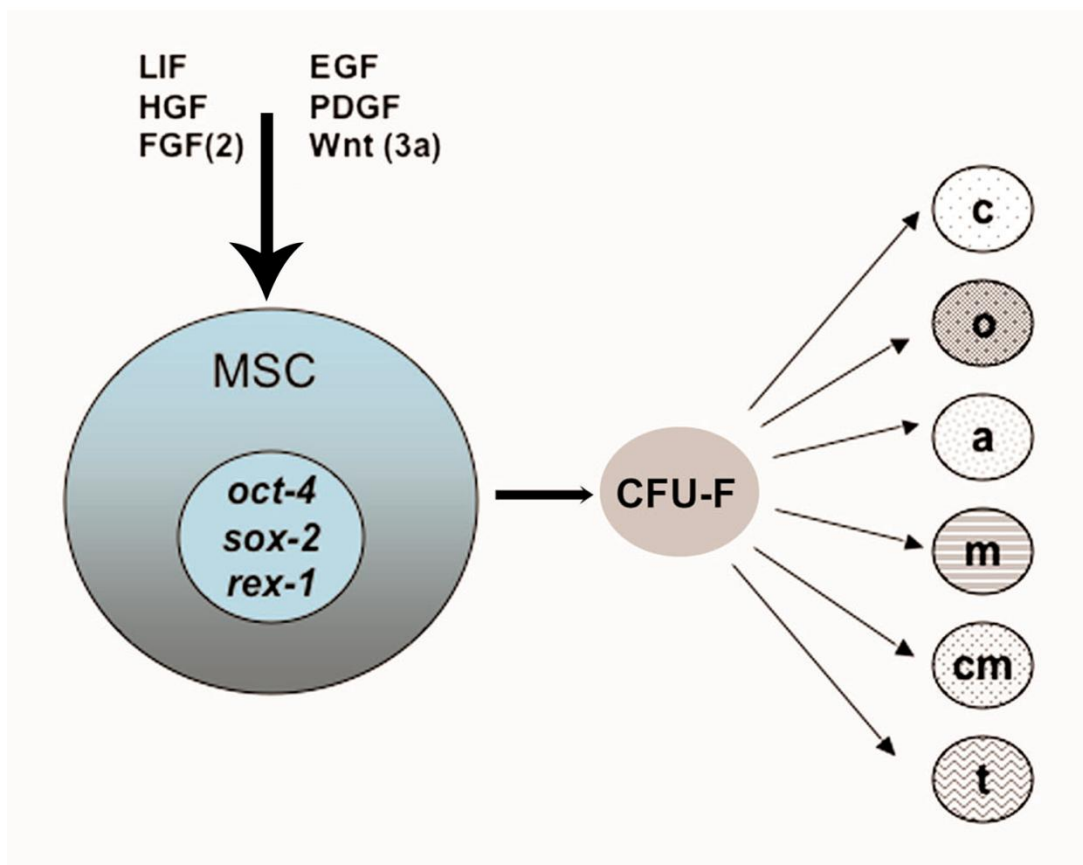
Pored kombinacije markera koju ćelije treba da ispoljavaju da bi se okarakterisale kao MSC, ISCT je 2006. predložila da kulture heterogenih MSC moraju biti testirane na

prisustvo drugih ćelijskih tipova koji se često mogu naći u ovim kulturama. Tako ćelije u kulturama MSC ne smeju da ispoljavaju CD34, marker HSC i endotelnih ćelija, CD45, univerzalni marker leukocita, CD14 i CD11b, marker monocita i makrofaga koje najčešće mogu biti prisutne u kulturama MSC, CD79 $\alpha$  i CD19, markere B limfocita koji mogu adherirati na MSC, i na taj način, dugo opstati u kulturama zahvaljujući faktorima rasta koje proizvode MSC. Takođe, po standardima ISCT netretirane MSC ne smeju da ispoljavaju HLA-DR.

Pored markera karakterističnih za adultne ćelije, često je ispitivana i ekspresija molekula koji se koriste za identifikaciju ESC. Na primer, transkripcioni faktori Oct-4, Nanog i SOX2 regulišu održavanje pluripotentnog stanja ESC, pa je pretpostavljeno da sličnu ulogu imaju i kod adultnih matičnih ćelija. *Riekstina i saradnici* [55] su pokazali da se kultivisane MSC, izolovane iz različitih tkiva, razlikuju po ekspresiji molekula karakterističnih za ESC: BM-MSK ispoljavaju Oct4, Nanog, alkalnu fosfatazu i površinski molekul SSEA-4, AT-MSK i MSK izolovane iz dermisa ispoljavaju Oct4, Nanog, SOX2, alkalnu fosfatazu i SSEA-4, dok MSK izolovane iz srca ispoljavaju Oct4, Nanog, SOX2 i SSEA-4. Nasuprot ovim podacima, *Pierantozzi i saradnici* [56] su pokazali da sveže izolovane BM-MSK, AT-MSK, i MSK izolovane iz srca, ne ispoljavaju Nanog već da počinju da ispoljavaju ovaj molekul tek u kulturi. Sem toga, ovi autori su pokazali da je upravo Nanog ispoljen samo u MSK koje aktivno proliferišu, dok se njegova ekspresija gubi nakon indukcije diferencijacije MSK. Ekspresija ovog molekula karakteristična je za rani period kultivacije MSK, i u kasnim pasażima opada kod svih ispitivanih MSK osim kod BM-MSK. Međutim, na kraju rada ovi autori su zaključili da ekspresija ovog markera ne ukazuje na kapacitet MSK za samo-obnavljanje ili diferencijaciju, već je povezan sa adaptacijom MSK na prelazak iz stanja mirovanja, u kom se nalazi *in vivo*, u stanje u kom je podstaknut njihov rast u medijumu za kultivaciju.

### 1.1.1.2. Potencijal MSC za samo-obnavljanje

Održavanje matičnih ćelija u nediferenciranom stanju i održavanje pula matičnih ćelija u organizmu omogućeno je procesom nazvanim samo-obnavljanje.



**Slika 1.2.** Samo-obnavljanje i potencijal za diferencijaciju MSC. Ekstracelularni faktori, uključujući faktore rasta i citokine podstiču i/ili održavaju potencijal za samo-obnavljanje MSC *in vitro*. Među najvažnijim genima koji regulišu ovu osobinu su *oct-4*, *sox-2* i *rex-1*. LIF- inhibitorni faktor leukemije, EGF- epidermalni faktor rasta, HGF- faktor rasta hepatocita, PDGF- faktor rasta poreklom od trombocita, FGF- faktor rasta fibroblasta, CFU-F- kolonije nalik fibroblastima; c-hondroblasti; o-osteoblasti; a-adipociti; m-mieloblasti; cm-kardiomioblasti; t-tenoblasti. Preuzeto od Kolf i saradnika [57], i prevedeno.

Samo-obnavljanje je ključna osobina matičnih ćelija, koja im omogućava da se tokom života jedinke umnožavaju i budu prisutne u tkivima odraslog organizma, gde mogu da dovedu do regeneracije i oporavka tkiva nakon eventualne povrede. Za održavanje strukture i funkcije svakog tkiva odraslog organizma potrebno je da budu usklađeni mnogobrojni signali koji podstiču, ograničavaju i održavaju samo-obnavljanje lokalnih matičnih ćelija. Poremećaji u ovoj signalizaciji mogu dovesti do oslabljene sposobnosti matičnih ćelija za samo-obnavljanje i, posledično tome, do usporenog obnavljanja tkiva ili starenja, kao i do pojačane stimulacije deobe matičnih ćelija što vodi nastanku kancera [58].

Termin samo-obnavljanje često se meša sa terminom proliferacije, jer oba procesa podrazumevaju deobu ćelije. Osnovna razlika između ova dva procesa je što nakon deobe ćelije u procesu samo-obnavljanja barem jedna od dve ćerke ćelije zadržava karakteristike roditeljske ćelije, među kojima i sposobnost samo-obnavljanja, a druga se diferencira, dok ovo ne važi za proces proliferacije. Dakle proces samo-obnavljanja podrazumeva asimetričnu deobu ćelije, a da bi došlo do ovakve deobe neophodno je da membrana, citoplazma i jedarni materijal, kao što su jedarni proteini i DNK, ćelije koja se deli budu polarizovano segmentisani. Ovi procesi su dobro opisani kod nižih organizama [59], a izgleda da su zadržani i kod sisara [60]. Međutim, veoma je teško pokazati proces asimetrične deobe ćelije tokom samo-obnavljanja sisarskih adultnih matičnih ćelija *in vitro* [61]. Na primer, kapacitet za samo-obnavljanje HSC se procenjuje skoro isključivo u esejima repopulacije *in vivo*, jer još uvek nisu osmišljeni uslovi kultivacije koji bi omogućili neprekidno samo-obnavljanje ovih ćelija *in vitro*. Slično, tome pokazano je da MSC *in vivo* poseduju kapacitet da iznova generišu heterotopično okoštavanje i tako se samo-obnavljaju [62-63]. Međutim veoma je teško ispitivanje mehanizama odgovornih za ovu sposobnost adultnih matičnih ćelija *in vitro*. U nameri da se prevaziđu ove poteškoće, u novije vreme često se proces samo-obnavljanja izjednačava sa neprekidnom, visokom stopom proliferacije ćelija *in vitro*. Kao posledica ovoga, postoji trend da se zaključuje o kapacitetu za samo-obnavljanje MSC na osnovu njihovog produženog rasta u kulturi i trilinearnog potencijala za diferencijaciju. Međutim, na osnovu ovih osobina ne može se



napraviti razlika između progenitorskih ćelija i ćelija koje zaista poseduju potencijala za samo-obnavljanje.

I pored ovih poteškoća, dobro su opisani signalni putevi koji su uključeni u održavanje HSC. Najvažniji mehanizmi koji regulišu proces samo-obnavljanja HSC uključuju molekule Notch, Wnt, i protein morfogeneze kosti (*engl.* bone morphogenetic protein, BMP). Međutim, mali broj literaturnih podataka je napisan na temu faktora koji regulišu proces samo-obnavljanja kod MSC (Slika 1.2.). Na primer, pokazano je da inhibitorni faktor leukemije (*engl.* leukemia inhibitory factor, LIF) mehanizmom koji uključuje parakrinu stimulaciju između susednih ćelija [64], učestvuje u održavanju potencijala za samo-obnavljanje MSC [65], i drugih matičnih ćelija [66]. *Tsutsumi i saradnici* [67] su pokazali da fibroblastni faktor rasta-2 (*engl.* fibroblast growth factor, FGF-2) značajno produžava preživljavanje MSC u kulturi, i to najverovatnije kroz autokrinu stimulaciju [68]. Svakako, kada se govori o mehanizmima regulacije samo-obnavljanja MSC moraju se pomenuti Wnt proteini. Ovi proteini su dobro poznati regulatori razvića, proliferacije, pokretljivosti i polarizacije ćelija [69].

Wnt se vezuju za serpentinske receptore Frizzled familije na plazma membrani. Aktivacija ovih receptora sa Wnt1, 2, 3, 3a, 8 i 8b pokreće kanonske signalne puteve koji se odvijaju preko  $\beta$ -katenina, dok aktivacija istih receptora sa Wnt4, 5, 5b, 6, 7a, i 11 pokreće nekanonske puteve koji ne uključuju aktivaciju ovog molekula. *Boland i saradnici* [70] su pokazali da Wnt3a tretman podstiče proces samo-obnavljanja MSC, tako što stimuliše njihovu proliferaciju i sprečava apoptozu aktivacijom ciklina D1 i c-myc. Pored stimulativnog efekta na samo-obnavljanje MSC, dodavanje Wnt3a u kulturu ovih ćelija istovremeno inhibira njihov potencijal za osteogenu diferencijaciju.

Iako je inicijalno pokazano da MSC mogu veoma dugo da se propagiraju *in vitro*, *Digirolamao i saradnici* [71] su pokazali da se sa povećanjem pasaža smanjuje procenat ćelija koje imaju sposobnost formiranja CFU-F. Ovaj fenomen je povezan sa „erozijom“ telomera [72], i kasnije je opisan kao „starenje MSC *in vitro*“ [73].

### 1.1.1.3. Potencijal MSC za diferencijaciju

Tokom asimetrične deobe jedne MSC, osim jedne ćerke ćelije koja zadržava potencijal za samo-obnavljanje, nastaje i jedna ćerka ćelija koja poseduje osobine progenitorske ćelije i čije će potomstvo u narednim deobama u procesu diferencijacije dati krajnje diferencirane ćelije. MSC su multipotentne ćelije odnosno poseduju sposobnost za diferencijaciju u ćelije mezenhimskog porekla (Slika 1.3.). Međutim, pored potencijala za diferencijaciju u različite ćelijske tipove mezenhimskog porekla, pokazano je da pod uticajem različitih uslova kultivacije i stimulusa, MSC pokazuju sposobnost za transdiferencijaciju. Još su *Woodbury i saradnici*, 2002. godine [74] pokazali da populacije kao i linije klonova MSC ispoljavaju ektodermalne, endodermalne i mezodermalne gene, na osnovu čega se može pretpostaviti da one imaju mnogo veću plastičnost za diferencijaciju od tri-linijskog potencijala. Ova pretpostavka je podržana mnogim radovima koji su pokazali da MSC kada se tretiraju određenim kombinacijama faktora rasta na određenom substratu mogu dati različite ćelije mezodermalnog porekla (hondroblaste, adipocite, osteoblaste, kardiomiocite i endotelne ćelije krvnih sudova), ćelije ektodermalnog porekla (nervne ćelije i ćelije kože), i ćelije endodermalnog porekla (hepatocite, ćelije pluća i intestinuma) [75-80].

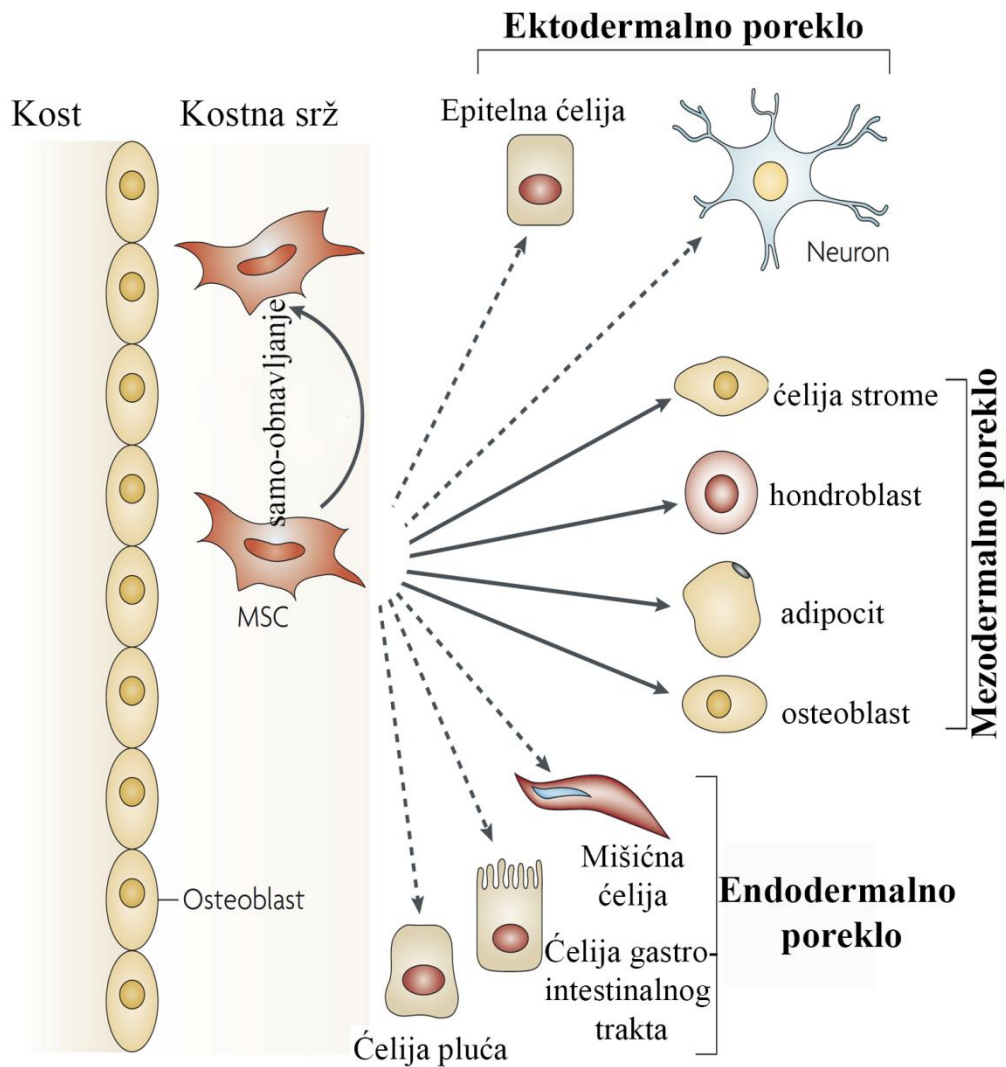
Pored *in vitro* dokaza da MSC mogu biti transdiferencirane u ćelijske tipove koji vode poreklo iz druga dva embrionalna tkiva, pokazano je više puta da MSC dovode do bržeg oporavka pacijenata nakon moždanog udara [81-82], povrede kičmene moždine [83] i njihovo terapeutsko dejstvo objašnjeno je njihovim potencijalom za diferencijaciju u ćelije oštećenog tkiva.

Nekoliko studija koje su se bavile ispitivanjem potencijala za diferencijaciju MSC u tri ćelijska tipa mezenhimskog porekla pokazale su da se MSC odlikuju velikom intrapopulacionom funkcionalnom heterogenošću. *Muraglia i saradnici* [84] su pokazali na osnovu analize 185 ne-imortalizovanih humanih BM-MSK klonova da u populacijama ovih ćelija 1/3 ćelija su tri-potentni, 60-80% osteo-hondrogeni i osteogeni progenitori, dok uopšte nisu bili prisutni klonovi koji imaju isključivo osteo-adipogeni, adipo-hondrogeni, samo adipogeni ili samo hondrogeni potencijal za diferencijaciju. Ovo ukazuje na to da

klonovi MSC sa povećanjem broja deoba progresivno gube sposobnost za adipogenezu i hondrogenezu. Na osnovu ovih podataka autori su pretpostavili model po kome je potencijal za diferencijaciju BM-MSC predodređen, pri čemu se stupanj BM-MSC na kome se ona može diferencirati u sve tri linije mezenhimskog porekla može smatrati stupnjem ranog mezenhimskog progenitora, koji tokom vremena gubi multipotentnost, i iz njega nastaju osteo-hondrogeni progenitori, koji na kraju daju osteogene prekursore. U narednoj studiji, *Okamoto i saradnici* [85] su identifikovali sedam od osam mogućih kategorija prekursora tokom diferencijacije imortalizovanih humanih BM-MSC u tri linije mezenhimskog porekla. Samo klonovi koji imaju adipo-hondrogeni potencijal nisu detektovani. Nasuprot prethodnoj studiji, u ovoj studiji je pokazano da je samo 5% klonova ovih BM-MSC multipotentno, dok 66% klonova uopšte nema potencijal za diferencijaciju. *Russell i saradnici* [86] su razvili uslove kultivacije za koje su pokazali da omogućavaju uspostavljanje svih osam mogućih prekursorskih linija tokom diferencijacije humanih BM-MSC u tri ćelijske linije mezenhimskog porekla. Ova studija je, analizom BM-MSC od dva različita donora, pokazala da najveći procenat ćelija ima tri-potentni (50%), osteo-hondrogeni i osteogeni potencijal za diferencijaciju, dok samo 5% ćelija nema potencijal za diferencijaciju, što je u skladu sa nalazima *Muraglia i saradnika* i drugih istraživačkih grupa [24, 84, 87]. Ista grupa autora je 2011. godine objavila da tri-potentni klonovi poseduju značajno veću stopu proliferacije i nižu stopu apoptoze u odnosu na uni-potentne progenitore [88].

Uzimajući sve ove studije u obzir, može se zaključiti da unutar populacije BM-MSC postoji hijerarhija ćelija u odnosu na potencijal za diferencijaciju u tri linije ćelija mezenhimskog porekla. Ovaj zaključak je potvrđen i kompjuterskim modelom *Sengers i saradnika* [89], koji je pokazao da su varijacije u stopi rasta sekundarnih kolonija uspostavljenih od primarnih humanih BM-MSC klonova rezultat ovakve hijerarhijske strukture.

Do sada je funkcionalna heterogenost MSC pokazana samo u odnosu na potencijal ovih ćelija za diferencijaciju. Obzirom na podatke dobijene RT-PCR analizom koji su pokazali da je produkcija mnogih transkripcionih faktora, signalnih molekula, kao i molekula koji su uključeni u imuno-supresivne i anti-inflamacijske mehanizme ograničena samo na određene klonove BM-MSC [61], može se pretpostaviti da slična intrapopulaciona



**Slika 1.3.** Potencijal za diferencijaciju MSC u ćelije mezodermalnog porekla i transdiferencijaciju u ćelije koje vode poreklo od druga dva embrionalna tkiva. Preuzeto iz Ucceli i saradnika [90] i prevedeno.

hijerarhija unutar MSC postoji i u odnosu na druge karakteristike kao što je imunomodulacija.

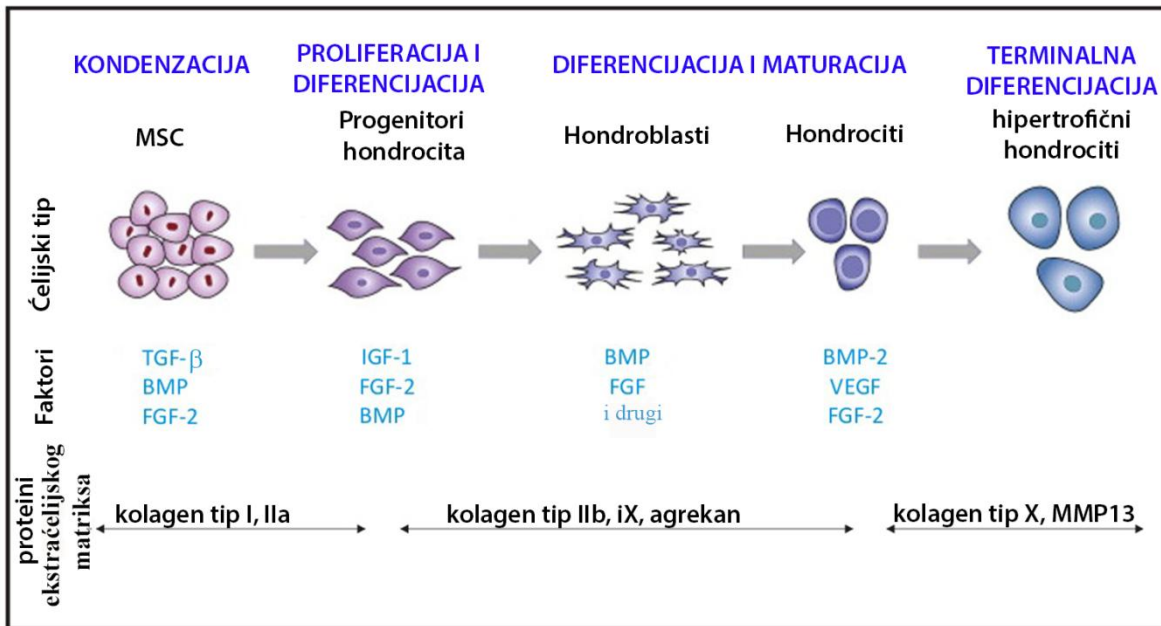
Puno studija je ukazalo na povezanost fenotipske i funkcionalne intrapopulacione heterogenosti, pri čemu su korišćene različite strategije za obogaćivanje populacije MSC ćelijama koje poseduju određeni potencijal za diferencijaciju ili neku drugu osobinu [54]. Izdvajanje subpopulacija MSC sa određenom osobinom jedan je od načina da se obezbedi kvalitetna i sigurna primena MSC u terapiji.

*In vitro* diferencijacija u određenu ćelijsku liniju zahteva tretman ćelija odgovarajućom mešavinom specifičnih faktora diferencijacije. Osim specifične mešavine faktora diferencijacije, na proces diferencijacije značajno utiču i osnovni nutrienti, gustina ćelija, prostorna organizacija, mehanički stimuli, faktori rasta i citokini. Da bi diferencijacija bila efikasna svaki faktor mora biti optimiziran. Da bi se postigli najoptimalniji uslovi za *in vitro* diferencijaciju neophodno je poznavanje mehanizama uključenih u proces diferencijacije. Takođe poznavanje egzogenih i endogenih faktora koji utiču na procese diferencijacije kao i kaskada signalnih molekula koje ovi faktori aktiviraju nakon stimulacije MSC je preduslov za napredak na ovom polju istraživanja.

#### 1.1.1.3.1. Hondrogeneza

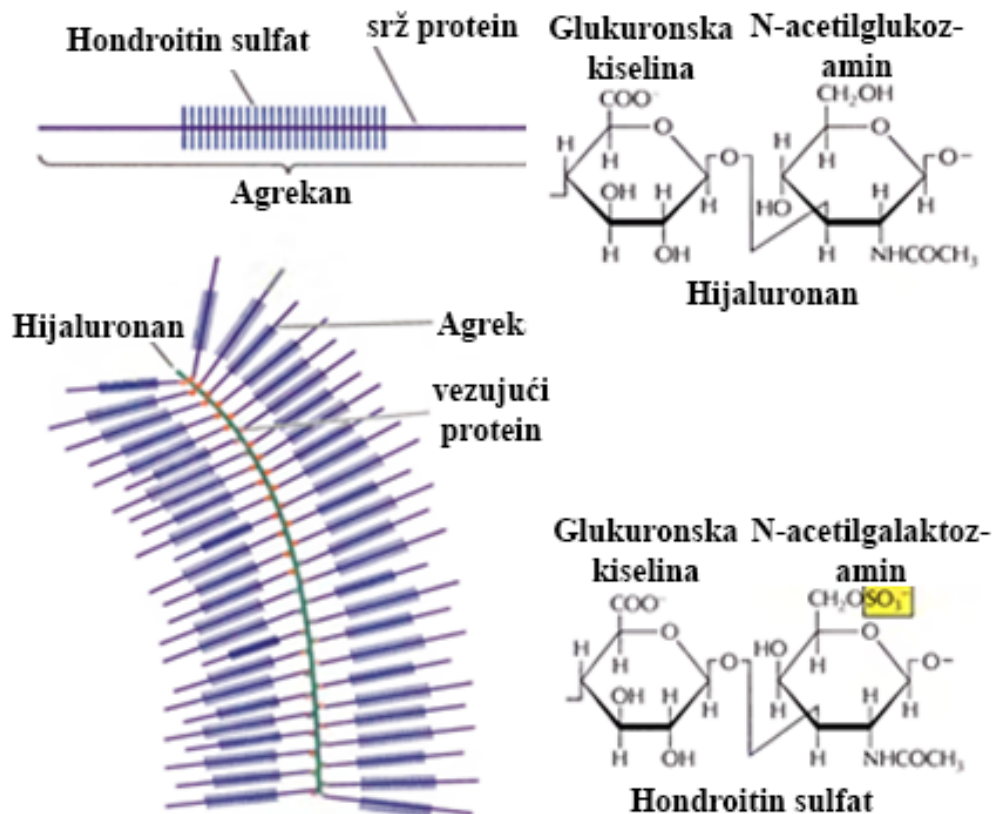
U studijama koje su se bavile ispitivanjem procesa hondrogeneze kod MSC iz različitih izvora [91-93], pokazano je da je jedan od neophodnih faktora za indukciju diferencijacije MSC u smeru hondroblasta FGF-2 [94-95].

Osim FGF-2, nekoliko drugih molekula učestvuje u regulaciji procesa hondrogeneze, među kojima su faktor rasta tumora (*engl.* tumor growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) [96], BMP i faktor rasta i diferencijacije (*engl.* growth and differentiation factor, GDF) [97]. Tretman MSC različitog porekla pojedinačnim rekombinantnim proteinima TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3, BMP-2 [98], BMP-4 [99], BMP-6 [100], BMP-12 [101], BMP-13 [102], i GDF-5 izaziva hondrovenu diferencijaciju ovih ćelija [103] (Slika 1.4.).



**Slika 1.4.** Shematski prikaz stupnjeva u hondrogenezi MSC. Prikazani su faktori koji imaju važnu ulogu u određenim stupnjevima hondrogeneze i karakteristične promene ekstracelularnog matriksa. Preuzeto iz Kelc i saradnici [104], i prevedeno.

Nakon vezivanja za receptore, TGF- $\beta$  i BMP pokreću signalne puteve preko specifičnih intracelularnih Smad proteina i mitogenom aktivirane protein kinaze (*engl.* Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) koji onda zajedno indukuju nastanak transkripcionih faktora odgovornih za proces hondrogeneze [105]. Različiti transkripcioni faktori imaju važnu ulogu u kontroli procesa hondrogeneze MSC uključujući SOX9, SOX5, SOX6, Slug, TRSP1, i GDF5 [106-109]. Proces hondrogeneze regulisan je proteinima Wnt familije [110]. Među ovim proteinima je pokazano da su Wnt4 i Wnt14 visoko ispoljeni na mestu formiranja zglobova, što ukazuje na stimulativnu ulogu ovih molekula na proces hondrogeneze [111]. Osim ovih Wnt, pokazano je da kod ljudi, prolazno povećanje Wnt7a stimuliše hondrogenezu kroz različite TGF- $\beta$ 1-MAPK-zavisne signalne puteve, dok produženo izlaganje molekulu Wnt7a deluje inhibitorno na ovaj proces [112]. Uslovi kultivacije MSC takođe utiču na proces hondrogeneze. Tako dužina propagacije utiče na sposobnost MSC da se diferenciraju u hondrocite, pa je pokazano da je hondrogeni potencijal najizraženiji kod ćelija između 3. i 6. pasaža [113].



**Slika 1.5.** Kompleks agrekana i hijaluronana. Agrekan (gore levo) je veliki proteoglikan koji se sastoji od stotine molekula hondroitin sulfata (dole desno) spojenih preko centralnog proteina. Više agrekanskih kompleksa se vezuje za dugački lanac hijaluronske kiseline (gore desno) i formira ekstracelularni matriks hrskavice (dole levo). Stabilizacija ovog kompleksa omogućena je zahvaljujući vezujućim proteinima. Preuzeto od Cooper i Hausman [114], i modificovano.

Takođe, proces hondrogeneze MSC podstiču i posebni uslovi kultivacije, kao što je kultivacija u medijumu bez seruma [115], u uslovima kada se ćelije kultiviraju bez kontakta sa podlogom (kultura mikromase u polipropilenskim sudovima) [116], u uslovima hipoksije (2-5% O<sub>2</sub>) [117], i u uslovima mehaničke stimulacije [118].

Indukcija hondrogeneze u mikromasi favorizuje inicijaciju prve faze diferencijacije, koja se karakteriše kondenzacijom ćelija, uspostavljanjem međućelijskih kontakata i interakcijom

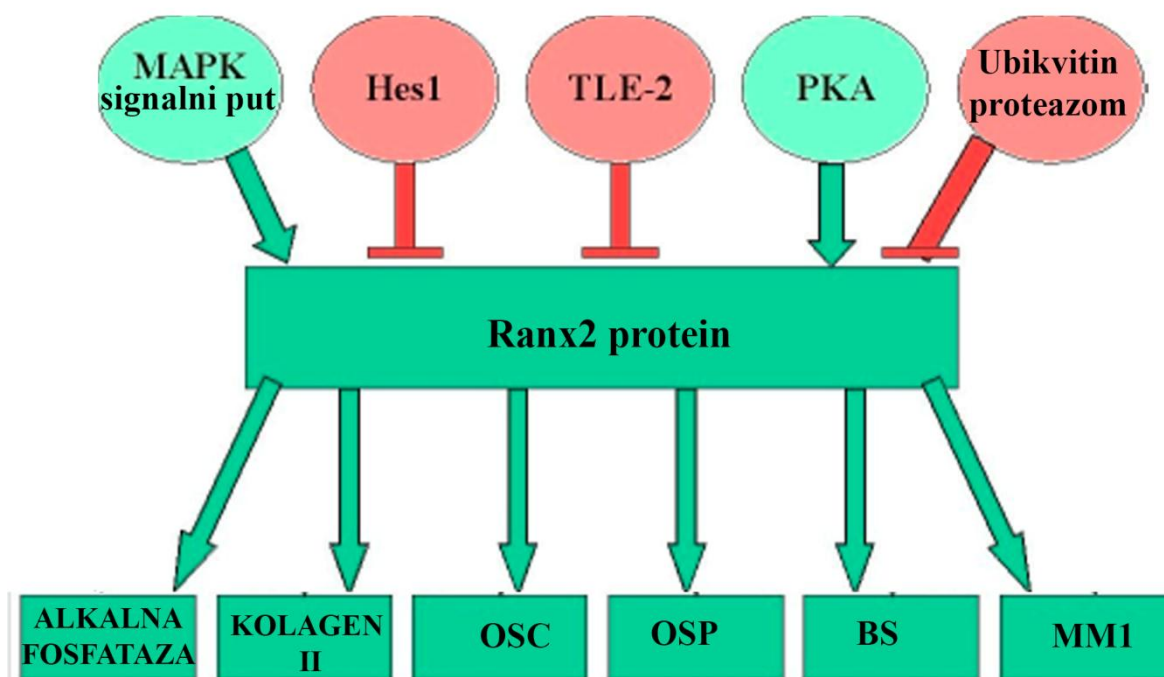
ćelija sa ekstraćelijskim matriksom [113, 115]. Nakon toga, ćelije prelaze u fazu u kojoj imaju visoku stopu proliferacije i počinju da produkuju komponente tipične za matriks hrskavice: kolagen tip II i IX, agrekan (Slika 1.5.), biglikan, dekorin i oligomerni protein matriksa hrskavice [119-120]. U završnoj fazi diferencijacije ćelije dobijaju zaobljen oblik i počinju da ispoljavaju kolagen X i MMP13.

#### 1.1.1.3.2. Osteogeneza

Diferencijacija osteoblasta može biti indukovana pod uticajem dva osnovna faktora: hemijskih signala i mehaničkih stimulusa, koji aktiviraju specifične signalne puteve. Jedan od puteva uključenih u proces osteogeneze vodi preko MEK/ekstracelularnim signalima regulisane kinaze (*engl.* Extracellular signal-regulated kinases, ERK) grane MAPK kinaznog puta. Ovaj put predstavlja vezu između odgovora ćelija na mehaničku stimulaciju integrina na njihovoj površini molekulima ekstraćelijskog matriksa sa jedne strane, i aktivacije Runx2 (runt-related transcription factor 2), najvažnijeg gena u procesu osteogeneze, sa druge strane [121]. Protein kinaza A (PKA) je takođe uključena u signalne puteve koji regulišu aktivnosti Runx2 (Slika 1.6.). Najčešći protokol za indukciju osteogeneze MSC *in vitro* podrazumeva inkubaciju konfluentnog sloja MSC u prisustvu  $\beta$ -glicerofosfata, askorbinske kiseline i deksametazona, tokom 2-3 nedelje [122]. Osteogena diferencijacija BM-MSK je regulisana i sistemskim hormonima, kao što su paratirodini hormon (PTH), estrogen, i glukokortikoidi, i lokalnim faktorima rasta uključujući BMP familiju, TGF- $\beta$ , i FGF-2 [123]. Ovi faktori aktiviraju specifične signalne puteve u ćeliji koji dovode do diferencijacije osteoblasta. BMP-2 snažno podstiče osteogenezu MSC [97, 124], tako što, preko p300 histon-acetiltransferaze, aktivira ekspresiju Runx2 gena. Deacetilaze 4 i 5 su specifične za deacetilaciju Runx2 gena, čime se istovremeno podstiče degradacija Runx2 proteina u koju su uključeni Smurf1 i Smurf2, i E3 ubikvitin ligaze [125]. Pored aktivacije Runx2 gena, BMP-2 inhibira Smurf proteine i tako inhibira degradaciju već sintetisanog Runx2 proteina. Runx2 zajedno sa proteinom za koji je vezan CBF $\beta$  [126-128] interaguje sa drugim proteinima: C/EBR $\delta$ , tumor supresor proteinom pRB, Ets1, Smad faktorom i LEF-1 (*engl.* lymphoid enhancer binding factor)-1 [129-130]. Ovaj multi-komponentni kompleks interaguje sa promoterskim regionima najvažnijih gena



specifičnih za osteogenezu kao što su geni za osteokalcin, osteopontin, kolagen II, kolagenazu 3 (matriksna metaloproteinaza 1, MMP1), kostni sijaloprotein kosti, alkalnu fosfatazu, TGF- $\beta$  receptor I, C/EBP $\delta$ , i receptor aktivator liganda za nuklearni faktor kappa B (*engl.* receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL) [131-137] (Slika 1.6.).



**Slika 1.6.** Regulacija transkripcije Runx2 gena i njegovo delovanje. Molekuli koji stimulišeekspresiju Runx2 gena su obojeni zeleno, dok transkripcioni faktori obojeni crveno inhibiraju ekspresiju ovog gena. OSC- osteokalcin, OSP- osteopontin, BS- kostni sijaloprotein, MM1- matriksna metaloproteinaza 1 (kolagenaza 3). Slika je preuzeta od Kirkham i saradnika [138] i prevedena.

Međutim, ovakav način regulacije osteogeneze, preko nivoa Runx2 proteina, je karakterističan za ne-humane modele, dok se tokom *in vitro* diferencijacije humanih osteoblasta nivo Runx2 proteina značajnije ne menja. Istovremeno se drastično menja nivo ekspresije nishodnih regulisanih gena karakterističnih za proces osteogeneze, kao što su geni za kostni sijaloprotein i alkalnu fosfatazu [139-140]. Imunoprecipitacijom je pokazano

da, iako nivo Runx2 proteina ostaje nepromenjen tokom procesa osteogeneze, značajno se povećava nivo njegove fosforilacije, što je verovatno način regulacije aktivnosti ovog proteina kod ljudi.

Takođe, tokom procesa osteogeneze povećava se vezivanje Runx2 za promotorske regione gena uključenih u proces osteogeneze. Mnogi drugi proteini su karakteristično ispoljeni u procesu osteogeneze, kao transkripcioni faktori, matriksni proteini ili proteini čija funkcija još uvek nije poznata [138].

Jedan od važnih proteina za osteogenezu je protein Osterix (Osx) koji reguliše veliki broj gena koji kodiraju proteine karakteristične za osteoblaste: osteokalcin, osteonektin, osteopontin, kostni sijaloprotein i kolagen tip I [141-142]. Alkalna fosfataza je prisutna u svim ćelijama, ali se njen nivo značajno povećava u odgovoru na mehanički stimulus, i već nakon dva dana od početka stimulacije osteogeneze [139, 143]. Osteoprotegrin je član TNF-superfamilije i predstavlja ekskretorni protein koga produkuju osteoblasti. Ovaj protein ima ulogu solubilnog receptora-mamca koji vezuje RANKL i tako sprečava aktivaciju NF- $\kappa$ B i JNK [144], sprečavajući formiranje osteoklasta i resorpciju kosti [145]. Među matriksnim proteinima u kosti je najzastupljeniji kolagen tip I, zatim osteokalcin, osteopontin i kostni sijaloprotein.

Signalni putevi aktivirani Wnt molekulima imaju važnu regulatornu funkciju u procesu osteogeneze. Eksperimenti na knockout miševima za pojedine Wnt proteine, kod kojih su primenjene različite doze proteina koji im nedostaje, pokazali su da visok nivo endogenih Wnt snažno podstiče osteogenezu, dok je ovaj proces inhibiran niskim nivoom Wnt [146]. Kod ćelijske linije embrionalnih mišijih matičnih ćelija (C3H10T1/2) i mišijih osteoprogenitora je pokazano da kanonski Wnt signalni put pokretanjem signalne kaskade  $\beta$ -katenin / LEF / TCF1 ( *engl.* T-cell factor 1) direktno aktivira ekspresiju Runx2 gena [147]. Međutim, kod humanih MSC kanonski Wnt signalni put inhibira osteogenezu [70].

#### 1.1.1.3.3. Adipogeneza

*In vitro* adipogeneza može biti indukovana tretiranjem MSC koktelom hormona koji sadrži deksametazon, izobutil metil ksantin i indometacin [148-149]. S druge strane Wnt10b [150], GATA-2 i GATA-3 [151] inhibiraju proces adipogeneze. Tokom procesa

adipogeneze matičnih ćelija mogu se razlikovati dve faze. Prva faza konačno određuje smer diferencijacije matične ćelije u preadipocitu, ali se ova prekursorska ćelija još uvek ne može razlikovati po morfologiji od ćelije iz koje je nastala. Nastali preadipocit gubi sposobnost diferencijacije u druge ćelijske tipove. U drugoj, završnoj fazi diferencijacije, preadipociti stiču karakteristike zrelih adipocita i mašineriju koja im je neophodna za transport i sintezu lipida, signalne molekule uključene u efekte insulina, i sposobnost za sekreciju specifičnih proteina [152]. Najvažniji regulator adipogeneze koji podstiče proces diferencijacije MSC u adipocite i istovremeno inhibira osteogenezu je receptor aktiviran proliferacijom peroksizoma (*engl.* peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)- $\gamma$  [153]. Vezivanje PPAR- $\gamma$  za različite ligande, među kojima su masne kiseline dugog lanca, indukuje transaktivaciju ovog molekula. Zanimljiva je uloga TAZ (*engl.* transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) proteina koji funkcioniše kao koaktivator Runx2 i kao korepresor PPAR- $\gamma$ , i tako stimuliše osteogenezu, dok istovremeno inhibira adipogenezu [154].

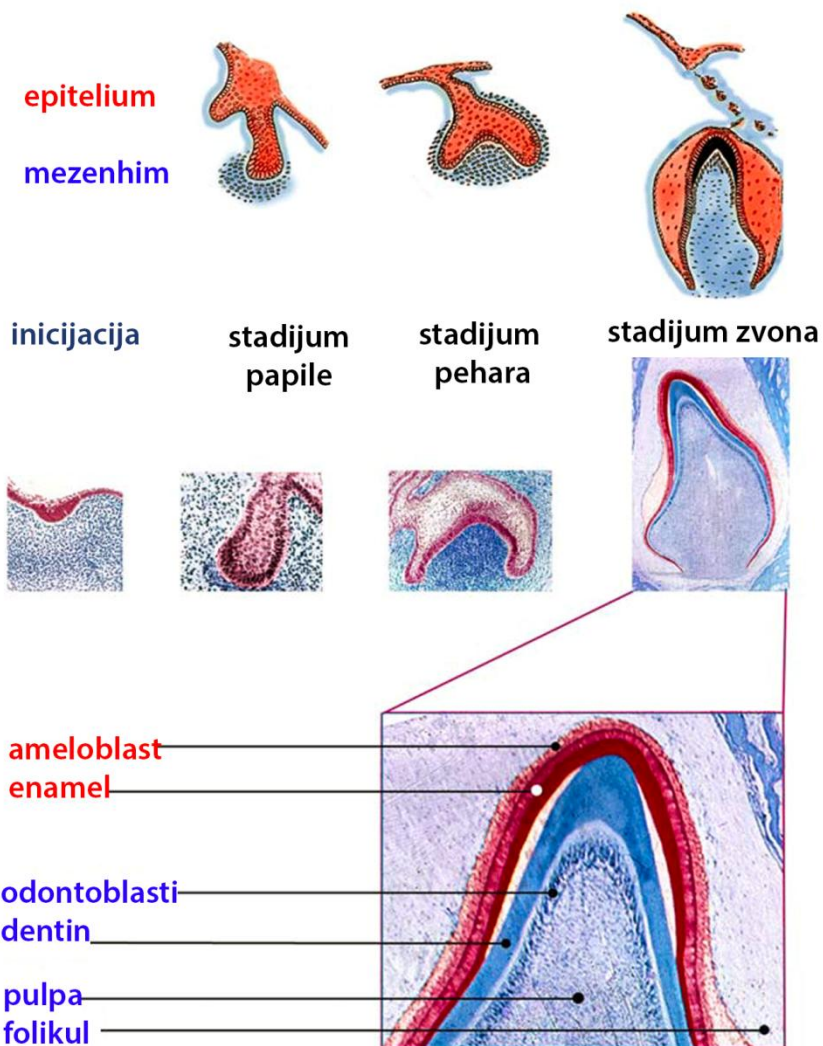
Na eksperimentima sa embrionalnim mezenhimskim ćelijama pluća miša je pokazano da TAZ predstavlja bitan faktor koji odlučuje o usmeravanju diferencijacije ovih ćelija u odgovoru na silu rastezanja. Signalni put koji detektuje postojanje/nepostojanje ove sile uključuje različite proteine indukovane/inhibirane tenzijom (*engl.* tension induced/inhibited proteins, TIP) [155]. Ako ne deluje sila rastezanja ispoljava se TIP-1 i favorizuje se adipogeneza, a ako su ćelije izložene istezanju aktivira se TIP-3 koji vodi ka miogenezi. Takođe, TIP-1 je uključen i u indukciju adipogeneze preko RhoA, pri čemu formiranje okruglih ćelija povezanih sa odsustvom tenzije indukuje RhoA signalnu kaskadu koja vodi adipogenezi [156]. Ovi podaci pokazuju vezu na molekularnom nivou između mehaničkih stimulusa, ćelijske morfologije, citoskeletne signalizacije, i transkripcije određenih proteina u procesu indukcije adipogeneze MSC.

### 1.1.2. Razviće zuba i MSC poreklom iz zdravih dentalnih tkiva

Zub je vioko mineralizovan organ koji nastaje kao posledica uzastopnih i recipročnih interakcija između oralnog epitela i mezenhima koji nastaje iz neuralne kreste [157] (Slika 1.7.). Eksperimenti rekombinacije tkiva su pokazali da oralni epitel poseduje sposobnost

indukcije odontogeneze. Na ovaj način omogućava se stvaranje uslova za diferencijaciju mezenhima, koji povratno reguliše diferencijaciju epitelnih ćelija. U eksperimentima u kojima je transplantacija mišije neuralne kreste u embrion pileta dovela do razvića zuba u embrionu pileta ukazali su na važnost ćelija koje nastaju iz kranijalne neuralne kreste za proces odontogeneze [158]. Mnogi faktori rasta takođe imaju ulogu u različitim embrionalnim stupnjevima razvića zuba. Članovi TGF- $\beta$  superfamilije kao što su BMP-2 i BMP-4 imaju ključnu ulogu u regulaciji interakcije između epitla i mezenhima tokom odontogeneze [159-161]. Takođe, FGF-3, FGF-4, FGF-8 i FGF-10 su uključeni u proces proliferacije ćelija i regulaciju ekspresije gena specifičnih za razviće zuba [162-163]. Proteini Wnt familije, kao što su Wnt-3, Wnt-7b, Wnt-10a i Wnt-10b imaju esencijalnu ulogu u regulaciji proliferacije, migracije i diferencijacije ćelija tokom inicijacije razvića zuba i morfogeneze [164].

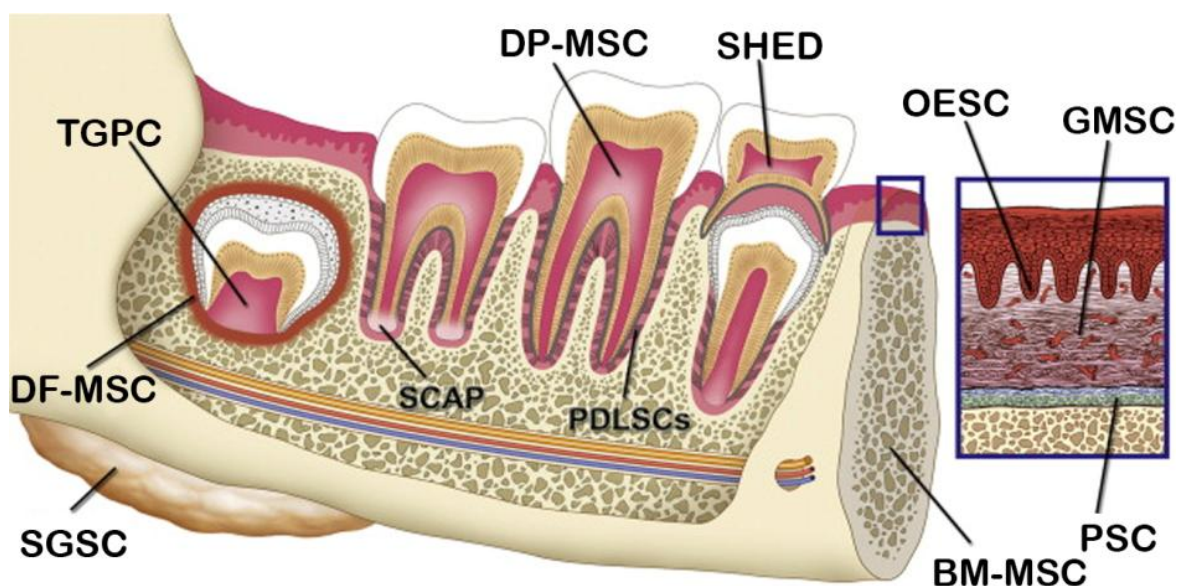
Dva najvažnija ćelijska tipa su uključena u formiranje dentalnog čvrstog tkiva: odontoblasti poreklom od mezenhima koji su odgovorni za produkciju dentina, i ameloblasti poreklom od epitelijuma koji formiraju gleđ zuba (enamel) (Slika 1.7.). Odontoblasti su post-mitotske ćelije koje formiraju sloj u kontaktu sa dentinom. Nastavci koji se formiraju na distalnom delu odontoblasta, ulaze u dentin i učestvuju u sekreciji matriksa i minerala u dentinu. Matriks je sastavljen od kolagena (90%), i nekolagenskih proteina kao što su dentinski sijalofosfoprotein (DSPP) i dentinski matriksni protein-1 (DMP-1). Depozicija minerala apatita na ovom matriksu dovodi do povećanja zrelog kalcifikovanog dentina. Gleđ, sa druge strane, sekretuju ameloblasti na prelazu dentina u gleđ. Gleđ je sačinjen od hidrofobnih proteina kao što su amelogenin, ameloblastin, enamelin, amelotin, tuftelin i ODAM [165]. Odmah nakon stvaranja gleđi, počinje formiranje korena zuba i to kao



**Slika 1.7.** Shematski prikaz i presek tkiva pokazuju različite stupnjeve u razviću zuba kod ljudi. Presek tkiva je obojen hematoksilinom. Crvenom bojom označeno je epitelno tkivo i derivati epitela (ameloblasti i enamel (gleđ)), dok su plavom bojom označena mezenhimska tkiva i derivati mezenhima (odontoblasti, dentin, dentalna pulpa i dentalni folikul). Preuzeto od Bluteau i saradnika [166], i prevedeno.

posledica proliferacije ćelija unutrašnjeg i spoljašnjeg dentalnog epitela u oblasti cervikalne petlje. Ćelije dentalnog folikula diferenciraju se u cementoblaste (ćelije koje formiraju cementum koji pokriva dentin u korenu), ćelije nalik fibroblastima (ćelije koje daju periodontalni ligament) i osteoblaste (ćelije koje daju alveolarnu kost). Cementum, periodontalni ligament i alveolarna kost su periodontalna tkiva koja daju potporu zubu u oralnoj šupljini.

Dentalna tkiva se za razliku od skeletnih tkiva ne obnavljaju kontinuirano. Zbog toga je pretpostavljeno da bi potencijal za diferencijaciju matičnih/progenitorskih ćelija izolovanih iz različitih dentalnih tkiva mogao da bude više ograničen u odnosu na BM-MSC.



**Slika 1.8.** Shematski prikaz dentalnih tkiva iz kojih se mogu izolovati populacije MSC. Preuzeto sa <http://doctordipascua.wordpress.com/2012/10/15/celulas-madre-a-partir-de-la-pulpa-dental>, i modifikovano.

Uzimajući ovo u obzir, *Huang i saradnici* [26] su pretpostavili da bi gore opisan važan uticaj epitela na proces embrionalnog razvića mezenhimskih dentalnih tkiva mogao bitno da utiče i na kapacitet MSC izolovanih iz dentalnih tkiva za diferencijaciju.

Prvobitno je pokazano da u dentalnoj pulpi stalnih zuba postoji populacija ćelija nalik odontoblastima koje su sposobne da formiraju kompleks dentina i pulpe *in vivo* [167].

*In vitro*, ove ćelije izolovane iz dentalne pulpe poseduju adipogeni, hondrogeni i neurogeni potencijal, na osnovu čega su okarakterisane kao populacija MSC iz dentalne pulpe (DP-MS) [168]. Sem iz pulpe stalnih zuba, izolovana je i populacija MSC iz dentalne pulpe mlečnih zuba (*engl.* stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED) [169]. Za SHED je pokazano da imaju sličan potencijal za diferencijaciju u adipocite, osteoblaste, odontoblaste, i ćelije nalik nervnim ćelijama, ali i da poseduju značajno veći proliferativni kapacitet, u poređenju sa DP-MS.

Ova otkrića su pokazala da dentalna tkiva mogu biti značajan izvor matičnih ćelija sa osobinama koje mogu biti iskorišćene u tkivnom inženjeringu i regenerativnoj medicini, posebno za popravku oštećenja zuba i tkiva koje ih okružuje [166].

Ubrzo su MSC izolovane iz svih dentalnih tkiva uključujući apikalnu papilu, gingivu, dentalni folikul i periodontalni ligament [170]. Populacije MSC izolovane iz različitih dentalnih tkiva (Slika 1.8.) imaju mnogo zajedničkih osobina, ali i nekoliko specifičnih.

#### **1.1.2.1. MSC izolovane iz dentalne pulpe zdravih stalnih zuba**

DP-MS, u kulturi formiraju CFU-F sa različitim karakteristikama [167, 171]. Ćelije unutar jedne populacije DP-MS se razlikuju po gustini formiranih CFU-F, što ukazuje na to da se ćelije koje prave kolonije međusobno razlikuju po potencijalu za samo-obnavljanje [172]. Takođe, razlike u morfologiji i veličini postoje i između ćelija unutar iste kolonije. Subpopulacije DP-MS, u *in vitro* uslovima, poseduju sposobnost diferencijacije u adipocite i ćelije nalik nervnim ćelijama [172], kao i osteogeni, hondrogeni i miogeni potencijal [173-175]. U interakciji sa dentinom, DP-MS se diferenciraju u ćelije nalik odontoblastima sa polarizovanim ćelijskim telima i ćelijskim nastavcima koji ulaze u postojeće dentinske tubule [171]. DP-MS na nosačima od hidroksi-apatit trikalcijum fosfata (HAP) ili dentinu, primenjene kod imunokompromitovanih miševa, formiraju ektopične komplekse tkiva nalik dentinu i pulpi [167, 176]. Na ovom modelu, heterogena populacija DP-MS *in vivo* formira vaskularizovano tkivo nalik pulpi koje okružuje sloj ćelija nalik odontoblastima. DP-MS nalik osteoblastima počinju da ispoljavaju DSPP i

formiraju dentinske tubule. Ove tubule sadrže dentin slično prirodnom dentinu. Oko dve trećine DP-MSC dobijenih iz jedne klonogenične ćelije u kulturi ima potencijal za formiranje dentina nalik ćelijama dobijenim iz kulture više kolonija, dok jedna trećina ćelija dobijenih iz jedne klonogenične ćelije ima sasvim ograničen potencijal za formiranje dentina [172]. *Carinci i saradnici* [177] su, pokazali značajne razlike u ekspresiji gena između osteoblasta u kostnom tkivu dobijenom diferencijacijom DP-MSC, i odontoblasta prirodnog kostnog tkiva.

### **1.1.2.2. MSC izolovane iz dentalne pulpe zdravih mlečnih zuba**

*Miura i saradnici* [169] su pokazali da se SHED, u odnosu na DP-MSC, mogu duže vreme održavati kao aktivno proliferišuće ćelije u kulturi, pri čemu su ovi autori pokazali da se SHED mogu podeliti i do 140 puta, DP-MSC oko 100 puta, a BM-MSC samo oko 40 puta. Kultura pojedinačnih ćelija nalik fibroblastima može se uspostaviti zasejavanjem pojedinačnih sferičnih klastera na površini suda obloženoj želatinom. Ove ćelije poseduju adipogeni i osteogeni potencijal u *in vivo* uslovima. U medijumu za indukciju neurogeneze visoko proliferišuće SHED formiraju klasterne sfernog oblika nalik neuroblastima, koje se takođe karakterišu visokim stepenom proliferacije. U medijumu za indukciju neurogeneze, ili injekcijom u hipokampus imunokompromitovanih miševa, povećava se ekspresija nekih neuronskih markera na ovim ćelijama, kao što su  $\beta$ III-tubulin, GAD, NeuN, i one zadobijaju morfologiju nalik neuronskim ćelijama sa karakterističnim citoplazmatskim nastavcima [169]. Nakon što su Kerkis i saradnici [178] po prvi put izolovali SHED i nazvali ih nezrele DP-MSC, pokazano je da upravo ove ćelije poseduju osobinu formiranja sferičnih klastera, da ispoljavaju embrionalne markere Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, i imaju miogeni i hondrogeni potencijal. *Ex vivo* umnožene SHED nakon primene u imunokompromitovanim miševima, formiraju ćelije nalik odontoblastima koje se povezuju sa dentinskim strukturama i ispoljavaju DSPP protein. Međutim, za razliku od DP-MSC, SHED nemaju sposobnost formiranja kompletnih struktura nalik kompleksima dentina i pulpe, i imaju značajno manji potencijal za formiranje ektopičnog dentinskog tkiva [169]. Jedinstvena osobina SHED je nakon primene u imunokompromitovanim miševima pokazuju sposobnost da privuku ćelije domaćina sposobne za diferencijaciju u osteoblaste, i



indukuju stvaranje kostnog tkiva [169]. Primena SHED kod miševa sa skeletnim defektima dovodi do regeneracije kosti [179]. Ove karakteristike SHED ukazuju na to, da one imaju potencijal za privlačenje i navođenje ćelija sa osteogenim potencijalom na mesto gde će se formirati trajni zub, kao i na to da SHED imaju direktnu ulogu u indukciji formiranja trajnih zuba.

### **1.1.2.3. MSC izolovane iz zdravog periodontalnog ligamenta**

Periodontalni ligament nastaje iz dentalnog folikula i predstavlja visoko specijalizovano ćelijsko vezivno tkivo koje je locirano između korena zuba i alveolarne kosti koja ga okružuje, čime obezbeđuje stabilnost i funkciju zuba [180-182]. Ovo dentalno tkivo se sastoji iz različitih ćelijskih tipova: fibroblasta, osteoblasta, cementoblasta, ostatka epitelnih ćelija nazvanih Malasezova ostrvca [183-184], i progenitorskih ćelija koje su zadržale sposobnost diferencijacije u ćelije nalik osteoblastima ili cementoblastima i formiraju mineralizovana (čvrsta) tkiva [185-188]. MSC izolovane iz ovog tkiva (PDLSC) poseduju sposobnost za samo-obnavljanje i formiraju CFU-F u kulturi. Nekoliko studija pokazalo je da ove ćelije ispoljavaju kombinaciju molekula karakterističnih za adultne MSC [170, 189-191], kao i pojedine embrionalne markere [192]. Humane PDLSC primenjene kod imunokompromitovanim miševima formiraju mineralizovane strukture nalik cementumu i kondenzovana kolagenska vlakna (Sharpey-ova vlakna). Primenjene kod periodontalnih defekata imunokompromitovanih miševa, PDLSC se integrišu u periodontalno tkivo i čvrsto se naslanjaju na površinu alveolarne kosti i zuba [170]. Zbog ovakvog kapaciteta za diferencijaciju, pretpostavlja se da bi PDLSC mogle biti ćelije koje su odgovorne za održavanje i regeneraciju strukture i funkcije periodontalnih tkiva [183].

### **1.1.2.4. MSC izolovane iz zdrave apikalne papile**

Apikalna papila predstavlja meko tkivo koje okružuje apeks stalnih zuba tokom razvoja [181, 193]. MSC izolovane iz apikalne papile (*engl.* Stem cells derived from apical papilla, SCAP) takođe poseduju sposobnost odontogene diferencijacije *in vitro*. U poređenju sa DP-MSK, SCAP ispoljavaju značajno niži nivo DSPP, ekstracelularnog fosfolipoproteina matriksa (MEPE), TGFβRII, FGFR3, FGFR1, Flt-1 (VEGFR1) i

CD146. Sa druge strane, ove ćelije ispoljavaju CD24, marker karakterističan za neuroblaste, koji nije detektovan na DP-MSC. Zanimljivo je to da u *in vitro* uslovima, i u odsustvu medijuma za neurogenu diferencijaciju, SCAP ispoljavaju i druge markere neuronskih ćelija [194], a nakon indukcije neurogeneze ispoljavaju i markere glijalnih ćelija GAD, NeuN, NFM, NSE [193]. Pored toga, ove ćelije imaju sposobnost za diferencijaciju u adipocite u *in vitro* uslovima [181, 194]. U imunokompromitovanim miševima, primenjene SCAP daju tipične komplekse dentina i pulpe [181, 193]. Pošto iz apikalne papile tokom erupcije stalnih zuba nastaje radikularna pulpa, može se reći da su SCAP slične matičnim ćelijama dentalne pulpe koje daju koronarne odontoblaste odgovorne za produkciju dentina. Još uvek nije potpuno razjašnjeno da li DP-MSC, koje se mogu izolovati iz pulpe stalnog zuba nakon erupcije i završenog rasta, predstavljaju konvertovane ili zaostale SCAP, ili su možda DP-MSC nastale od različitih populacija matičnih ćelija. Najverovatnije je da SCAP predstavljaju izvor primarnih odontoblasta koje formiraju dentin korena, dok su DP-MSC izvor odontoblasta koje imaju ulogu u popravci oštećenog dentina [195].

#### **1.1.2.5. MSC izolovane iz zdravog dentalnog folikula**

Dentalni folikul je tkivo ektomezenhinskog porekla, koje okružuje gleđni organ i dentalnu papilu začetka zuba tokom razvića, pre erupcije. Iz ovog tkiva formiraće se parodontium kog čine cementum, periodontalni ligament i alveolarna kost. U ovom tkivu nalaze se ćelije koje ispoljavaju embrionalne markere Notch-1 i Nestin, što ukazuje na postojanje nediferenciranih ćelija u ovoj ćelijskoj populaciji. MSC se mogu izolovati iz humanog dentalnog folikula trećeg molara pre erupcije (DF-MSC), [182]. Nakon izolacije ovog tkiva, mali broj ćelija adherira na plastičnoj površini i formira mali broj adherentnih CFU-F. DF-MSC u kulturi imaju morfologiju nalik fibroblastima i, osim Notch i Nestin, ispoljavaju kolagen tip I, kostni sijaloprotein, osteokalcin, i FGF receptor 1-IIIc [182]. U osteogenom indukcionom medijumu ove ćelije ispoljavaju kapacitet za diferencijaciju u osteoblaste. Ćelije dentalnog folikula *in vivo* ispoljavaju STRO-1 i receptor za BMP. DF-MSC počinju da ispoljavaju markere cementoblasta pod uticajem rekombinantnih humanih BMP-2 i BMP-7. Korišćenje oba proteina je odobreno od starne FDA za regeneraciju kosti

u ortopediji. Sem toga, DF-MSK ispoljavaju markere cementoblasta pod uticajem derivata matriksa gleđnog organa (EMD) [196]. *Morsczeck i saradnici* [182, 197] su pokazali da se kod DF-MSK nakon primene kod imunokompromitovanih miševa, povećava ekspresija gena za kostni sjialoprotein i osteokalcin više od 100 puta, pri čemu se smanjuje ekspresija gena koji kodira kolagen tip I. Implantirane DF-MSK formiraju strukture sastavljene od fibroznih i čvrstih tkiva, ali u eksperimentima nije uočeno formiranje dentina, cementuma ili kostnog tkiva *in vivo*.

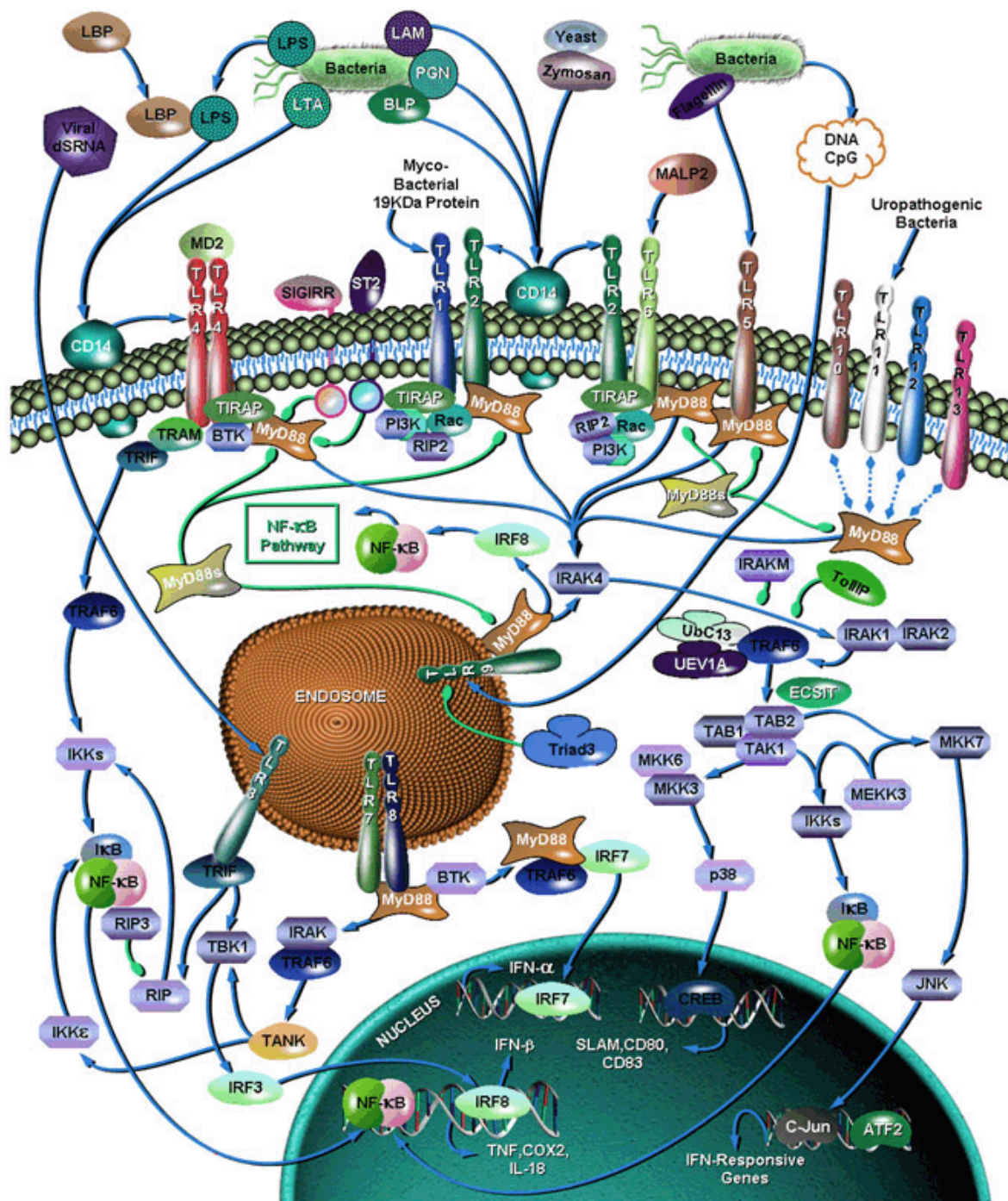
### 1.1.3. Toll-u slični receptori i uticaj njihovih agonista na osobine MSC

Ćelije adaptivnog imunskog sistema prepoznaju specifične epitope svojim receptorima koji se odlikuju visokom varijabilnošću usled rearanžmana kodirajućih gena i somatskih mutacija. Sa druge strane ćelije urođene imunosti prepoznaju molekulske obrasce karakteristične za grupe patogena. Za inicijalno prepoznavanje grupa patogena, ćelije urođene imunosti koriste receptore za prepoznavanje molekulskih obrazaca (*engl.* pattern recognition receptors, PRR). PRR se odlikuju evolutivnom konzerviranošću, odnosno izuzetno niskom varijabilnošću gena koji ih kodiraju. Tako je analog jedne grupe ovih receptora, protein Toll, inicijalno otkriven kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) kao protein koji ima bitnu ulogu u uspostavljanju dorzoventralne ose u ranoj embriogenezi. Kasnija istraživanja su pokazala da Toll ima bitnu ulogu u urodjenom imunskom odgovoru insekata protiv infekcije gljivama [198]. Toll-u slični receptori (*engl.* Toll like receptors, TLR) su ostali skoro nepromenjeni tokom evolucije još od zajedničkog pretka crva *Caenorhabditis elegans* i sisara [199-201]. Do danas je kod sisara identifikovano 12 članova TLR familije. Kod ljudi je otkriveno deset članova ove familije, a za devet su opisani prirodni i sintetički ligandi. TLR2 prepoznaje bakterijske lipoproteine, peptidoglikane (PGN), i lipoteihoičnu kiselinu Gram-pozitivnih bakterija. Heterodimerizacija TLR2 sa drugim TLR doprinosi specifičnijem prepoznavanju liganda. Tako, heterodimer TLR1/2 prepoznaje specifično triacetilovane bakterijske lipopeptide, dok kompleks TLR2/6 specifično prepoznaje diacetilovane lipopeptide poreklom od *Mycoplasma*. TLR-3 prepoznaje dvolančanu RNK poreklom od virusa i sintetski analog poliinozinsku : policitidinsku kiselinu (polyI:C); TLR4 prepoznaje lipopolisaharide (LPS)

poreklom od Gram-negativnih bakterija; TLR5 prepoznaje bakterijski flagelin; TLR7 i TLR8 prepoznaju jednolančanu RNK i sintetske molekule na bazi guanozina (loksoribin), dok TLR9 prepoznaje CpG motive bakterijske DNK.

Različita lokalizacija pojedinih TLR je u korelaciji sa lokalizacijom njihovih liganda. Tako se TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 nalaze na površini ćelije i sakupljaju se u fagozome nakon aktivacije određenim ligandom, dok se TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 koji prepoznaju molekule nukleinskih kiselina, nalaze u različitim odeljcima unutar ćelije. Aktivacijom različitih TLR pokreće se kaskada različitih signalnih događaja što vodi razvijanju posebnog biološkog odgovora na određenu grupu mikroorganizama uključujući maturaciju DC, produkciju određenih citokina i razvoju adaptivnog imunskog odgovora [202].

TLR pripadaju tipu I transmembranskih glikoproteina i sastoje se od ekstracelularnog regiona sastavljenog iz velikog broja ponovaka bogatih leucinom, i intracelularnog domena koji sadrži terminalno invertovani region (TIR) homolog regionu IL-1R [203-204] (Slika 1.10.). Mikrobijalnim komponentama aktivirani TLR pokreću aktivaciju signalne kaskade čiji je krajnji cilj aktivacija gena čiji produkti učestvuju u borbi domaćina od određenog mikroba. Nakon vezivanja liganda za TLR ovi receptori dimerizuju i podležu konformacionim promenama koje su neophodne za vezivanje adapterskih proteina. Nakon aktivacije TLR, TIR domen dolazi u interakciju sa nekoliko adapterskih molekula koji poseduju TIR domene (*engl.* Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88; Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein, TIRAP; TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , TRIF i TRIF-related adaptor molecule, TRAM), što dovodi do aktivacije kaskade signalnih događaja koji pokreću indukciju transkripcionih faktora [205]. Interakcija sa adapterskim molekulom MyD88 karakteristična je za sve TLR osim TLR3, s tim što se interakcija TLR4 i TLR2 sa MyD88 ostvaruje preko adapterskog molekula TIRAP, dok se ostali TLR vezuju direktno za MyD88 [202]. MyD88/TLR kompleks aktivira naredne molekule u signalnoj kaskadi, kinazu povezanu sa IL-1R (IL-1R-associated kinase, IRAK)-4, IRAK-1 i faktor povezan sa receptorom za TNF (TRAF)-6. Kompleks IRAK-1/TRAF-6 aktivira kinazu TAK1, koja aktivira kompleks kanonske I $\kappa$ B kinaze. Kanonska IKK predstavlja kompleks IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  subjedinica koje čine katalitički



Slika 1.10. Preuzeto sa <http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Toll Like Receptors>, i obrađeno.

kompleks, i NEMO/IKK $\gamma$  subjedinice koja predstavlja regulatora aktivnosti IKK. Aktivacije I $\kappa$ B kinaze dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, i aktivacijom MAPK, aktivira AP-1. Aktivacija NF- $\kappa$ B je zajednička osobina signalnih puteva koji vode sa različitih TLR, i ovaj transkripcioni faktor pokreće ekspresiju gena za pro-inflamacijske citokine, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i drugi. Sem citokina, TLR agonisti mogu pokrenuti i transkripciju tip I IFN, pogotovo oni TLR koji detektuju komponente virusa na površini ćelije ili u endozom. Tip I IFN imaju ključnu ulogu u borbi protiv virusa. Naime, TLR7, TLR8 i TLR9 preko MyD88/IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 sekvence signalnih događaja, nezavisno od IKK $\epsilon$ , već preko TBK1, aktiviraju faktor regulacije IFN (IRF)-7. Nakon translokacije u jedro, IRF-7 aktivira gene koji kodiraju tip I IFN. Za potpunu aktivaciju IRF-7 neophodni su i IKK $\alpha$ , TRAF3 i osteopontin [206-209]. Sa druge strane, TLR3 se vezuje za adapterski molekul TRIF [210-211].

Dalje TRIF aktivira TRAF3 i NAP-1, i homotipski interaguje sa molekulom koji je nazvan protein koji interaguje sa receptorom (RIP)-1. Signalna kaskada preko TRAF3/NAP-1 aktivira nekanonske IKK, TBK1 i IKK $\epsilon$ , koje konačno vode aktivaciji IRF3 [212-215]. Nakon translokacije u jedro, IRF3 inicira ekspresiju gena za IFN- $\beta$ . Pored TBK1/IKK $\epsilon$ , za potpunu aktivaciju IRF3 neophodna je aktivacija fosfatidil-inozitol 3-kinaze (PI3K) koja aktivira Akt kinazu [216]. Sa druge strane kompleks TLR3/TRIF/Rip-1 kao i TLR3/TRIF/TRAF6 vodi aktivaciji NF- $\kappa$ B, ali ne i aktivaciji IRF3. TLR4 ne prepoznaje samo bakterijske već i neke virusne obrasce. Nakon aktivacije, TLR4 osim signalne kaskade koja vodi aktivaciji NF- $\kappa$ B, koristi isti put kao i TLR3, preko adapterskog molekula TRIF, za aktivaciju IRF3 i pokretanje produkcije IFN- $\beta$ . TLR4 interakciju sa molekulom TRIF ostvaruje preko molekula TRAM.

Osim uloge u aktivaciji imunskog sistema u odgovoru na patogene i endogene molekule koji ukazuju na nekrozu ćelija i povredu tkiva, pokazana je i uloga TLR u neimunskim procesima. Tako je pokazano da aktivacija signalnog puta sa TLR doprinosi održavanju homeostaze epitela, tako što podstiče proliferaciju epitelnih ćelija i oporavak tkiva nakon povrede [217]. Hasan i saradnici su pokazali da aktivacija TLR stimuliše ulazak ćelija u ćelijski ciklus i progresiju u fibroblaste [218].

Osim TLR, koji su ispoljeni ili na površini ćelije ili u endozomu, postoje drugi PRR koji imaju ulogu u prepoznavanju produkata patogena (DNK, jednolančane i dvolančane RNK) u citoplazmi ćelije, kao i internalizovanih ili intracelularnih bakterija. Ovi receptori mogu biti grubo podeljeni u dve grupe: receptori nalik genima koje indukuje retinoična kiselina (*engl.* retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors, RLR) [219] i receptori nalik domenima za koje se vezuju nukleotidi tokom oligomerizacije (*engl.* nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors, NLR) [220]. RIG-I i receptor koji kodira gen povezan sa diferencijacijom melanoma 5 (*engl.* melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5) su RNK helikaze koje nakon prepoznavanja citoplazmatske RNK indukuju IFN tip I, i imaju vodeću ulogu anti-viralnoj odbrani [219, 221]. Dva najpoznatija člana NLR familije su NOD1 i NOD2. Oni prepoznaju bakterijske molekule koji nastaju tokom sinteze i degradacije peptidoglikana [220]. NOD1 prepoznaje diaminopimeličnu kiselinu koju proizvode Gram-negativne bakterije [222-223], a NOD2 aktiviraju muramil dipeptidi (MDP), komponente i Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija [224]. Do danas nije sasvim razjašnjeno da li NOD1 i NOD2 detektuju direktno PAMP-ove ili produkte domaćina koji nastaju kao posledica prisustva produkata mikroorganizma u citoplazmi [220].

#### **1.1.3.1. Uticaj agonista TLR na osobine MSC**

Mnogobrojne studije koje su pokazale da BM-MSC ispoljavaju NOD-1 i NOD-2 receptore [225], i da MSC izolovane iz različitih zdravih tkiva ispoljavaju TLR [226-233], dodatno su podržale ideju o MSC kao ćelijama koje mogu da detektuju infekciju ili oštećenje tkiva, i da nakon toga aktivno učestvuju u regulaciji urođenog i adaptivnog imunskog odgovora.

Međutim, iako su noviji rezultati, dobijeni molekularnim tehnikama, pokazali da 700-1000 vrsta bakterija može naseliti oralnu šupljinu [234-235], i tako uticati na ćelije oralnih i dentalnih tkiva, do trenutka objavljivanja radova čiji su rezultati sastavni deo ove teze, nije ispitivana ekspresija niti uloga PRR u biologiji MSC poreklom iz dentalnih tkiva.

Do danas je više puta pokazano da se MSC izolovane iz različitih zdravih tkiva razlikuju po ekspresiji TLR kao i da inflamacijski faktori različito utiču na ekspresiju TLR molekula na MSC u zavisnosti od porekla ovih ćelija [227]. U uslovima hipoksije je značajno povećana ekspresija iRNK za TLR1, 2, 5, 9 i TLR10 [228] na AT-MSC. Pro-inflamacijski koktel (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$ ) značajno povećava ekspresiju TLR2, TLR3 i TLR4, a istovremeno smanjuje ekspresiju TLR6 na humanim BM-MSC [236]. Produžena aktivacija TLR2 i TLR4 specifičnim sintetskim agonistima snižava značajno ekspresiju ovih receptora na MSC [237-238]. Aktivacija TLR na MSC izolovanim iz masnog tkiva pokreće MyD88 zavisnu i MyD88 nezavisnu kaskadu signalnih događaja, što vodi aktivaciji MAPK, PI3K i NF- $\kappa$ B [239].

Istraživanja o uticaju pojedinih sintetskih TLR-agonista na karakteristike MSC pokazala su da agonisti različitih TLR imaju različite efekte, kao i da efekat zavisi od tkiva iz kog su MSC izolovane. Tako je više puta pokazano da aktivacija TLR na MSC ne utiče na sposobnost njihove adipogeneze, bez obzira na njihovo tkivno poreklo, kao i na sposobnost hondrogeneze BM-MSC. Međutim, Pevsner-Fischer i sardnici [229] su pokazali da se aktivacijom TLR2 na MSC iz pupčane vrpce povećava potencijal za hondrogenezu, a da aktivacija ovog receptora na BM-MSC značajno smanjuje sposobnost za diferencijaciju ovih ćelija u adipocite, osteoblaste i hondroblaste. Zanimljivo je da su isti autori pokazali da BM-MSC miševa kojima je inaktiviran gen za Myd88 imaju smanjeni kapacitet za osteogenezu i hondrogenezu. Na osnovu rezultata dobijenih u ovim istraživanjima *Pevsner-Fischer i sardnici* su zaključili da aktivacija TLR2 na MSC omogućava da ove ćelije u toku infekcije ostanu nediferencirane, da zadrže proliferativnu sposobnost i imunosupresivni kapacitet. Dalje, više puta je pokazano da TLR aktivacija snažno utiče na sposobnost MSC za osteogenezu. Potencijal za osteogenezu humanih BM-MSC, AT-MSC i UCB-MSC značajno je povećan aktivacijom TLR4, TLR2 i TLR3 [228, 237], a smanjen aktivacijom TLR9 na AT-MSC [228]. Rezultati *Cho i saradnika* [240] su pokazali da aktivacija NF- $\kappa$ B kod AT-MSC usled tretmana ovih ćelija agonistima TLR3 receptora i TNF- $\alpha$  dovodi do stimulacije osteogeneze ovih ćelija.



Osim efekta koji TLR agonisti mogu ostvariti na potencijal MSC za diferencijaciju, ispitivan je i efekat ovih molekula na sposobnost samo-obnavljanja, preživljavanja i migracije humanih MSC, osobina koje mogu biti ključne za terapijski efekat ovih ćelija. Tako je pokazano da aktivacija TLR na AT-MSK povećava ekspresiju mangan-superoksid dismutaze (MnSOD) [237], za koju je pokazano da štiti ćelije u uslovim oksidativnog stresa [241]. Kako je jedan od osnovnih inicijalnih mehanizama borbe protiv patogenih produkata slobodnih kiseoničnih radikala od strane ćelija imunskog sistema, ovaj efekat aktivacije TLR može zaštititi MSC koje migriraju na mesta inflamacije. Pored mnogobrojnih radova koji su pokazali da TLR agonisti ne menjaju značajno proliferativnu sposobnost humanih MSC, *Cho i saradnici* [240] su pokazali inhibitorni efekat TLR9-agonista na proliferaciju AT-MSK. *Tomchuck i saradnici* [232] su pokazali pozitivan efekat TLR3, a *Nurmenniemi i saradnici* [242] pozitivan efekat TLR9 agonista, na migratornu sposobnost humanih BM-MSK. Ovi rezultati pokazuju da bi TLR agonisti na mestu inflamacije mogli da privuku endogene MSC, kao i MSC primenjene u cilju terapije, na mesto inflamacije. Međutim mehanizmi ovakvog efekta TLR agonista nisu još uvek ispitani.

Podaci o uticaju TLR agonista na imunomodulacijsku funkciju MSC su vrlo kontradiktornih. Pokazano je da aktivacija ovih receptora na humanim MSC iz masnog tkiva i mišijim BM-MSK ne menja značajno njihove imunomodulatorne karakteristike [229], [237]. Za razliku od toga, rezultati dobijeni aktivacijom TLR na humanim BM-MSK su veoma različiti. *Liotta i saradnici* [230] su pokazali da aktivacija TLR3 i TLR4 na humanim BM-MSK smanjuje njihovu sposobnost da inhibiraju proliferaciju T limfocita. Na suprot ovim rezultatima, *Optiz i saradnici* [231] su pokazali da aktivacija TLR3 i TLR4 na humanim BM-MSK povećava imunosupresivnu aktivnost ovih ćelija, i to povećanjem aktivnostiIDO-1 enzima. Autori su takođe pokazali da je povećanje ekspresijeIDO-1 enzima posledica uticajaIFN- $\beta$  na BM-MSK, pri čemu ove ćelije same povećavaju produkciju ovog citokina nakon tretmana TLR3 i TLR4 agonistima. Nasuprot ovim podacima koji ukazuju da TLR3 i TLR4 imaju istovetan efekat na BM-MSK, *Waterman i saradnici* [243] su pokazali da BM-MSK nakon aktivacije TLR4 razvijaju pro-inflamacijski fenotip i nazvali su ih MSC-1, dok tretman TLR3 agonistom potencira njihovu

imunosupresivnu funkciju i ovako tretirane BM-MSK nazvali su MSC-2 po ugledu na APC monocitnog porekla. Konačno, Romieu-Mourez [244] i saradnici su pokazali da aktivacija TLR na MSC koje su već stimulisane visokim koncentracijama IFN- $\gamma$  ili IFN- $\alpha$ , dodatno pojačava njihov pro-inflamacijski fenotip.

### **1.1.3.2. Uloga TLR i inflamacije u razvoju periapeksne lezije**

Periapiksne lezije predstavljaju inflamacijski proces, koji nastaje u okolini apeksa zuba kao odgovor na infekciju. Ovaj inflamacijski proces može biti akutnog karaktera, ili se može razviti hronični inflamacijski odgovor. Prve studije koje su se bavile analizom histoloških preparata pokazale su da je za ranu fazu inflamacijskog procesa, nazvanu gingivitis, karakteristična infiltracija T limfocita i makrofaga, dok u progresivnim lezijama koje vode razvoju hroničnog inflamacijskog stanja, nazvanog periodontitis, dominiraju B ćelije i plazma ćelije [245]. Noviji radovi pokazali su da progresija bolesti od faze rane inflamacije do razvoja hronične periapeksne lezije zavisi od invazivnosti patogenizatora i od genetičke pozadine samog domaćina, koja se ogleda u različitoj sposobnosti imunskog sistema da odgovori i izbori se sa infekcijom. Nivo pro-inflamacijskih molekula (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), različitih MMP i PGE2 se tokom progresije bolesti povećava na mestu inflamacije i dovodi do oštećenja okolnog tkiva, i oštećenja alveolarne kosti kao najteže posledice. Međutim, još uvek nije potpuno razjašnjeno da li je povišen nivo ovih molekula na mestu inflamacije posledica neresponsivnosti gena za ove citokine na regulatorne molekule, ili je, ovakvo snažno pro-inflamacijsko okruženje, posledica upravo poremećaja u produkciji regulatornih molekula kao što su TGF- $\beta$  i IL-10 i inhibitora MMP. Takođe sa novim rezultatima menjao se i stav o ulozi pojedinih efektorskih ćelija imunskog sistema u razvoju ove bolesti. Pre otkrića efektorskih Th limfocita koji dominantno produkuju IL-17, postojala su različita mišljenja o važnosti Th1 i Th2 limfocita za razvoj inflamacijskog odgovora na mestu periapeksne lezije.

Mnogi radovi pokazali su da je najvažniji uzročnik inflamacijskog odgovora u periapeksnoj leziji *Porphyromonas gingivalis*. Ova bakterija poseduje atipičan LPS koji ne stimuliše TLR4 već TLR2. Takođe, iako je poznato da Gram-negativna enterobakterija, može da

aktivira i TLR2 i TLR4 [246], *Kikkert i saradnici* [247] su pokazali da Gram-negativne periodontalne bakterije pre svega aktiviraju TLR2. Među ovim bakterijama, samo su *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Veillonella parvula* sposobne da aktiviraju i TLR2 i TLR4. Čelije zdravog oralnog epitela ispoljavaju i TLR2 i TLR4, i u toku inflamacije ekspresija oba receptora se značajno povećava [248]. Sa druge strane, u hroničnom periodontitisu detektovana je ekspresija oba receptora, dok je u zdravom periodontalnom tkivu TLR2 ispoljen veoma slabo, i nema ekspresije TLR4 [249].

Uzimajući u obzir značajnu ulogu bakterija u razvoju periapeksnih lezija [250], sasvim je razumljivo da je ovo oboljenja veoma često kod ljudi [251].

Konstantno prisustvo posebnog tipa LPS-a i bakterijskog lipopeptida poreklom od *P. gingivalis* aktivira TLR2 na DC u periapeksnoj leziji, što vodi razvoju Th2 odgovora [252-255]. Odgovor u kome dominiraju citokini karakteristični za Th2 odgovor (IL-4, IL-5, IL-13) vodi proliferaciji i aktivaciji B ćelija. Ove ćelije produkuju protektivna antitela i tako doprinose čišćenju patogena. Međutim, B limfociti u periapeksnoj leziji takođe produkuju i antitela niskog afiniteta koja nisu protektivna već stimulišu produkciju IL-1 $\beta$  od strane ovih B ćelija, i tako doprinose resorpciji zubne kosti [256]. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima *Johnson i Serio* [257] koji su pokazali da postoji negativna korelacija između nivoa Th1 citokina (IFN- $\gamma$  i IL-12) i agresivnosti periodontalne bolesti kod ljudi. Nasuprot ovim rezultatima koji idu u prilog stavu da je nestabilan Th1 odgovor odnosno dominacija Th2 odgovora neophodna za progresiju periodontitisa, mnogi radovi pokazali su da su Th1 citokini odgovorni za razviće ove bolesti i gubitak zubne kosti [258-260]. Treća grupa literaturnih podataka ukazuje na nešto komplikovaniji proces razvoja periapeksnih bolesti, pri čemu u ranim, stabilnim fazama dominiraju T limfociti, koji produkcijom IFN- $\gamma$  aktiviraju fagocitne ćelije, neutrofile i makrofage. Nemogućnost neutrofila i makrofaga da se izbore sa infekcijom vodi razvoju Th2 odgovora koji je neophodan za razvoj kasnog, progresivnog periodontitisa [261-267].

Međutim, otkriće Th17 populacije efektorskih pomoćničkih T limfocita izmenilo je stav o važnosti Th1 i Th2 odgovora u razviću mnogih bolesti. IL-17, zajedno sa IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$

indukuje produkciju metaloproteinaza (pro-MMP-1 i MMP-3) i povećava ekspresiju RANKL na osteoblastima što dovodi do formiranja osteoklasta i resorpcije zubne kosti [268]. Međutim, knockout miševi za IL-17R (*IL-17R<sup>-/-</sup>* miševi) su značajno više podložni oštećenju zubne kosti usled periodontitisa izazvanog *P. gingivalis*, što ukazuje na protektivnu ulogu ovog citokina [269]. Rezultati o postojanju korelacije između povećane produkcije IL-17 i IL-8 od strane inflamacijskih ćelija periapsne lezije, koje su Čolić i saradnici objavili 2007. godine [270], takođe idu u prilog hipotezi o doprinosu Th17 ćelija razvoju hronične periapsne lezije. Rezultati koji su pokazali da se Th17 ćelije pod dejstvom IL-12 mogu transdiferencirati u Th1 ćelije, a u prisustvu IL-4 u Th2 ćelije, omogućavaju uklapanje Th17 ćelija u prethodni koncept o ulozi Th1 i Th2 ćelija u razvoju mnogih bolesti [271]. Inflamacijski proces koji se u periapsnoj leziji razvija posredstvom različitih Th limfocita i njihove interakcije sa drugim ćelijama imunskog sistema, regulisan je i Treg limfocitima. Do danas su okarakterisani Treg limfociti izolovani iz periodontitisa i gingivitisa [272-274] i periapsne lezije [275] što govori o bitnoj ulozi ovih ćelija u razvoju inflamacije u dentalnim tkivima. Kako je njihova osnovna karakteristika da inhibiraju odgovor efektorskih T limfocita one mogu delovati u smeru smanjenja oštećenja tkiva [276]. Podaci da se regulatorni T limfociti pod uticajem DC aktiviranih angažovanjem receptora za dektin-1, mogu transformisati u T limfocite koji proizvode IL-17 dodatno usložavaju mrežu molekula i ćelija u periapsnoj leziji.

Obzirom na spregu pro-inflamacijskih i anti-inflamacijskih mehanizama u periapsnoj leziji, ova bolest predstavlja dobar model za ispitivanje uloge pojedinačnih ćelijskih tipova i solubilnih molekula u razvoju hroničnih inflamacijskih oboljenja.

### **1.1.3.3. MSC izolovane sa mesta inflamacije**

Do danas je objavljeno veoma malo radova o osnovnim karakteristikama MSC izolovanih sa mesta inflamacije, a do trenutka objavljivanja radova čiji su rezultati sastavni deo ove teze, samo su Alongi i saradnici [277] okarakterisali smanjeni potencijal za osteogenezu MSC izolovanih iz dentalne pulpe zahvaćene inflamacijom u odnosu na DP-MSK iz zdravog tkiva.

Iako je veoma detaljno ispitivano učešće različitih inflamacijskih ćelija u razvoju periapsne lezije, podaci o ulozi MSC u ovim mehanizmima gotovo da ne postoje. Jedini podatak o postojanju ćelija koje po opisu odgovaraju MSC u periapsnoj leziji, potiče od *Maeda i saradnika* koji su 2004. godine [278] objavili rezultate o postojanju ćelija nalik fibroblastima koje, nakon hiruškog odstranjivanja, migriraju iz periapsnih granulomau u plastiku za kultivaciju, i poseduju osteogeni potencijal. Autori su još tada pretpostavili da bi ovakva populacija ćelija mogla da se na mestu periapsne lezije diferencira u zrele osteoblaste i cementoblaste i doprinese na taj način oporavku tkiva oštećenog u toku procesa inflamacije.

Kako je u *in vitro* studijama pokazano da su MSC izolovane iz zdravih tkiva, veoma senzitivne na pojedine molekule koji posreduju u mehanizmima opisanim u periapsnoj leziji, i da poseduju kapacitet za modulaciju inflamacijskih ćelija, MSC mogu imati značajnu imuno-regulatornu ulogu u razviću ovakvih hroničnih inflamacijskih bolesti.

#### 1.1.4. Imunomodulacijska svojstva MSC

Iako su početni terapijski efekti MSC opisivani kao posledica diferencijacije ovih ćelija u ćelije oštećenog tkiva, otkrićima starim već 10 godina o imunomodulacijskom efektu ovih ćelija [279] započelo je proširivanje spiska mogućih ćelijskih i molekulskih komponenti ne koje MSC nakon primene mogu delovati u organizmu. Tako je sada već široko prihvaćen stav da, iako MSC imaju tri-linijski potencijal za diferencijaciju, njihovi efektorski mehanizmi se manje zasnivaju na diferencijaciji, ili trans-diferencijaciji *in situ*. Terapijski efekti primenjenih MSC više su vezani za njihove parakrine efekte i interakciju sa drugim ćelijama prisutnim u obolelom tkivu [280]. Podaci o trofičkim efektima MSC potiču još iz radova *Caplan i saradnika* [281-282] kao i iz radova koji su po prvi put pokazali efekte ćelijske populacije kostne srži, koja je kasnije okarakterisana kao MSC, na hematopoezu [283]. Skoriji radovi koji su ukazali na moguće perivaskularno poreklo MSC u različitim organima dodatno su naglasili mogućnost da ove ćelije mogu predstavljati izvor trofičkih faktora tokom narušavanja integriteta tkiva [284-286]. Ovo otkriće je posebno značajno za usmeravanje strategije za razvijanje MSC kao modulatora lokalne inflamacije u tkivu i kao

terapeutskog sredstva za bolesti koje su povezane sa nepravilnostima u imunskom odgovoru organizma.

*Bartholomew i saradnici* [279] su pioniri u istraživanjima imunomodulatornih karakteristika MSC. Oni su prvi pokazali da BM-MSC babuna (*Papio anubis*) inhibiraju proliferaciju limfocita *in vitro* i sprečavaju odbacivanje presađene kože *in vivo*. U narednim godinama, na različitim humanim i animalnim modelima *in vitro* i *in vivo* pokazano je da MSC mogu ispoljiti imunosupresivne efekte [287]. Međutim, utvrđeno je da MSC, izolovane iz zdravog tkiva, nisu spontano imunosupresivne, što je na početku istraživanja dovelo do dobijanja konfliktnih podataka. Tako je sa jedne strane pokazano da su MSC efikasne u supresiji prekomernog imunskog odgovora koji uzrokuje bolest kalema protiv domaćina (graft-versus host disease, GvHD) [279, 287-288], i razvoj sistemskog eritemskog lupusa (SLE) [289]. Nasuprot ovim rezultatima, primena MSC sa transplantom alogene kostne srži kod subletalno ozračenih miševa [290], ili u kombinaciji sa ciklosporinom A kod životinja nakon transplantacije [291], neočekivano je dovela do ubrzanog odbacivanja tkiva. Naredni eksperimenti su pokazali da BM-MSC stiču imunosupresivni potencijal tek nakon tretmana sa pro-inflamacijskim molekulima [292-299], što može objasniti izostanak terapeutskog efekta kod animalnih modela koji su u gore pomenutim studijama paralelno tretirani drugim imunosupresivnim sredstvima. Ovi, i rezultati drugih istraživača [300-301] ukazali su na to da inflamacijski status lokalne sredine reguliše osobine MSC i može dovesti do sasvim suprotnih efekata pri njihovom eventualnom korišćenju u terapiji.

Važan koncept koji je nastao na osnovu rezultata velikog broja osnovnih i predkliničkih istraživanju osnovi ima ideju o imunoprivilegovanom statusu MSC nakon transplantacije kod alogenog donora [302]. U najjednostavnijoj formi ovaj koncept podrazumeva da alogene MSC nemaju mogućnost aktivacije urođenog ili pokretanja adaptivnog imunskog odgovora koji bi doveo do odbacivanja ovih alogenih ćelija u odsustvu druge imunosupresivne terapije [303]. Ekstrapolacija jednog dela radova bi, takođe, mogla da znači da primenjene alogene MSC podstiču aktivnu imunološku tolerancu na donorski

MHC i druge aloantigene, čime je dodatno povećana njihova terapijska vrednost za transplantaciju organa i tkiva.

#### **1.1.4.1. Interakcija MSC sa komponentama urođenog imunskog sistema**

Nakon primene MSC kao ćelijske terapije, ove ćelije se prvo susreću sa komponentama urođenog imunskog odgovora koje pružaju efikasnu anti-mikrobijalnu odbranu, ali takođe predstavljaju i barijeru za alogenu i ksenogenu transplantaciju.

Alogene MSC izbegavaju akutno i hiperakutno odbacivanje posredovano komplementom tako što proizvode Faktor H [304]. Ovaj obrambeni mehanizam MSC najverovatnije je podržan proteinima koje ove ćelije ispoljavaju, CD55, CD46 i CD59, a koji su uključeni u kontrolu aktivacije sistema komplementa [305]. Međutim, MSC nisu inertne u odnosu na urođeni imunski sistem, i postoje podaci da anafilatoksin, C3a i C5a, privlače MSC na mesto oštećenja tkiva [306].

Ćelije prirodne ubice (*engl.* natural killer, NK) predstavljaju ćelije urođenog imunskog sistema, koje, sa drugim ćelijama patroliraju organizmom, i kada detektuju tumorsku ili inficiranu ćeliju proizvode molekule koji dovode do liziranja i smrti ćelije. Pored ovog direktnog efekta, NK ćelije proizvode citokine koji aktiviraju ćelije adaptivnog imunskog sistema (T i B limfocite) među kojima je najbitniji interferon (IFN)- $\gamma$ . Neto efekat signala koji stižu sa aktivirajućih i inhibirajućih receptora na NK ćelijama, dovodi do indukcije njihove citotoksične aktivnosti, odnosno do njihove inhibicije [307]. Nekoliko radova je pokazalo da MSC inhibiraju proliferaciju i produkciju IFN- $\gamma$  od strane interleukin (IL)-2 ili IL-15-stimuliranih NK ćelija [307-310], a delimično inhibiraju i njihovu citotoksičnu aktivnost [292]. Sa druge strane, MSC ne inhibiraju citotoksičnu aktivnost sveže izolovanih NK ćelija [309]. *Sotiropoulou i saradnici* [308] su pokazali da MSC ispoljavaju supresivni efekat samo na citotoksičnu aktivnost NK ćelija prema ćelijama koje ispoljavaju MHC klase I, ali ne i prema ciljnim ćelijama koje ga ne ispoljavaju. Takođe je pokazano da MSC, u sistemu u kom je sprečen direktan kontakt između ćelija (Transwell sistem), inhibiraju proliferaciju i produkciju citokina od strane IL-15-stimuliranih NK ćelija posredstvom PGE2 i TGF- $\beta$ . Sa druge strane, pokazano je i to, da je za inhibični efekat MSC na

citotoksičnu aktivnost NK ćelija neophodan ćelijski kontakt. Ranije se smatralo da su alogene MSC imuno-privilegovane u odnosu sa NK ćelijama, odnosno, da ne mogu biti lizirane od strane sveže izolovanih NK ćelija [309, 311]. Međutim postoje podaci [308, 312] da aktivirane NK ćelije imaju sposobnost efikasnog liziranja MSC. Pored toga što MSC ispoljavaju nizak nivo MHC klase I, one istovremeno ispoljavaju i ligande koje prepoznaju aktivirajući NK receptori (NKp30, NKG2D, DNAM-1), i tako mogu indukovati aktivaciju NK ćelija. Tretman humanih MSC IFN- $\gamma$  povećava ekspresiju MHC klase I na ovim ćelijama, čime se smanjuje njihova podložnost liziranju od strane NK ćelija [312].

#### **1.1.4.2. Dendritske ćelije, T limfociti i MSC u komunikaciji urođenog i adaptivnog imunskog sistema**

##### *1.1.4.2.1. Dobijanje dendritskih ćelija in vitro*

Dendritske ćelije (*engl.* dendritic cells, DC) predstavljaju najpotentnije APC, obzirom da nakon sazrevanja mogu efikasno da aktiviraju naivne T limfocite i usmere njihovo razviće u odgovarajućem pravcu. DC u organizmu mogu nastati iz HSC kostne srži i monocita periferne krvi. Dovoljan broj HSC za *in vitro* dobijanje DC može se izolovati i iz krvi pupčane vrpce. DC takođe mogu biti izolovane direktno iz periferne krvi, limfoidnih organa ili perifernih tkiva (na primer Langerhansove ćelije (*engl.* Langerhans cells, LC) iz epidermisa). DC se iz HSC dobijaju kultivacijom HSC u medijumu za kultivaciju sa dodatkom faktora stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i TNF- $\alpha$ , tokom 5 dana. DC se iz CD14<sup>+</sup> monocita periferne krvi dobijaju kultivacijom monocita u medijumu za kultivaciju u prisustvu GM-CSF i IL-4, tokom 5 dana. DC dobijene iz monocita čije se sazrevanje indukuje koktelom pro-inflamacijskih citokina predstavljaju model za ispitivanje osobina inflamacijskih DC koje se pod uticajem pro-inflamacijskih molekula na mestu inflamacije diferenciraju iz monocita pristiglih iz periferne krvi [313-314].



#### 1.1.4.2.2. Tri signala u interakciji dendritskih ćelija i T limfocita

DC su rasprostranjene u perifernim tkivima i, njihovo sazrevanja se pokreće aktivacijom receptora za molekulske obrasce (*engl.* pattern recognition receptors, PRR) koji prepoznaju molekulske obrasce mikroorganizama (*engl.* pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Isti PRR mogu prepoznati i molekule domaćina koje ćelije otpuštaju u uslovima stresa ili oštećenja (*engl.* damage associated molecular patterns, DAMP). Specifična tkivna lokalizacija DC i PRR na njihovoj površini im omogućavaju kontrolu mesta najčešćeg ulaska patogena, i eventualno pokretanje imunskog odgovora nakon angažovanja PRR [315]. Razvoj imunskog odgovora omogućen je time što DC pružaju tri ključna signala naivnim T limfocitima. Naime, nezrele DC kontinuirano preuzimaju materijal iz svoje okoline [316], ispoljavaju nizak nivo MHC klase II, ne ispoljavaju ko-stimulatorne molekule i ne produkuju pro-inflamacijske citokine, zbog čega su slabi aktivatori imunskog odgovora. Aktivacija DC dovodi do obrade fagocitovanog materijala u endozomu i do povećanja prezentacije antigena u kompleksu sa MHC klase II ili MHC klase I na njihovoj površini [317]. Ovo predstavlja prvi signal za indukciju diferencijacije naivnih T limfocita. Pod uticajem citokina sa mesta inflamacije, kao što je prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), DC smanjuju ekspresiju hemokinskih receptora koji ih zadržavaju u perifernim tkivima (CCR5, CCR4, CCR1, CCR2, CXCR1 i CXCR4) i povećavaju ekspresiju migratornog hemokinskog receptora CCR7. Ovaj receptor detektuje hemokine CCL19 i CCL21 čija se koncentracija povećava na putu ka limfnom čvoru. Kao rezultat ovih promena, DC, napuštaju mesto infekcije i odlaze u lokalne limfne čvorove, noseći sa sobom informaciju o lokalnom zapaljenskom tkivu [318-319]. Migriranjem u limfni čvor značajno se povećava verovatnoća susreta antigen-specifične T ćelije i DC koja nosi specifičan antigen. Aktivirane DC povećavaju i ekspresiju ko-stimulatornih molekula CD80 i CD86, drugog signala neophodnog za diferencijaciju T limfocita. Ukoliko se odigra interakcija između DC, koja nosi specifični antigen, i antigen-specifičnog T limfocita, indukuje se interakcija CD40/CD40L, trećeg signala neophodnog za indukciju T ćelijskog odgovora. CD40/CD40L interakcija predstavlja potvrdu o dobro uspostavljenoj vezi

između DC i antigen-specifičnog T limfocita, i indukuje dalje povećanje ekspresije MHC molekula i kostimulatora [320].

#### *1.1.4.2.3. Polarizacija odgovora pomoćničkih T limfocita u Th1, Th2 i Th17 pravcu*

Pored opisanih membranskih signala, u zavisnosti od stimulusa kojem su bile izložene na mestu infekcije, DC proizvode različite imunomodulatorne molekule koji usmeravaju diferencijaciju proliferišućih antigen-specifičnih T limfocita u odgovarajuće efektorske T limfocite [321-323]. Specifična interakcija DC i T limfocita je najzaslužnija za specifičnost i svrsishodnost odgovora imunskog sistema na različite grupe patogena. Takođe, DC su sposobne da, u zavisnosti od dominantnog molekulskog obrasca, karakterističnog za određeni stupanj razvoja patogena, preusmere diferencijaciju jednog tipa efektorskih T ćelija u drugi efikasniji tip. Na taj način DC omogućavaju fino usmeravanje odbrambene reakcije organizma u zavisnosti od faze infekcije patogenom. Osim patogena, koji preko PRR određuju tip imunskog odgovora [324-325], i drugi faktori na mestu infekcije, kao što su solubilni molekuli ili ćelije, mogu indukovati sazrevanje DC i menjati neke od funkcija ovih ćelija. Modulirajući funkciju DC, ovi faktori mogu bitno da promene smer diferencijacije adaptivnog imunskog sistema [326]. U zavisnosti od kombinacije signala koje dobijaju iz lokalne mikrosredine, i načina integracije ovih signala, DC tokom interakcije sa naivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima u limfnom čvoru proizvode citokine koji usmeravaju diferencijaciju ovih ćelija u odgovarajući tip pomoćničkih T limfocita (*engl.* T helper; Th), među kojima su najznačajnije Th1, Th2 i Th17. DC, makrofage i B ćelije stimulirane određenim grupama patogena proizvode pro-inflamacijski citokin IL-12 [327-328], koji predstavlja glavni induktor produkcije IFN- $\gamma$  od strane Th1 ćelija i NK ćelija. Za Th1 diferencijaciju je ključna ekspresija prevodnika signala i aktivatora transkripcije (*engl.* Signal Transducer and Activator of Transkription, STAT)-1, i STAT-4 transkripcionih faktora koji se inicijalno aktiviraju pod uticajem signala nishodno od IL-12 receptora. Kada je jednom aktiviran, ekspresija STAT-1, se najviše povećava pod dejstvom IFN- $\gamma$ . STAT-1, u koordinaciji sa drugim transkripcionim faktorima, koji se aktiviraju signalom sa T ćelijskog receptora (*engl.* T cell receptor, TCR), kao što su nuklearni faktor aktiviranih T limfocita (NFAT), AP-1 i NF- $\kappa$ B, indukuje ekspresiju T-bet, glavnog

transkripcionog faktora u diferencijaciji Th1 ćelija. Inicijalna ekspresija T-bet indukuje ekspresiju IL-12 receptora na T ćelijama i tako pojačava signalnu kaskadu koja vodi preko STAT-4 [329]. U nastavku STAT-4 i T-bet zajedno indukuju ekspresiju Runx3, koji u koordinaciji sa Tbet dovodi do produkcije velike količine IFN- $\gamma$  u Th1 ćelijama [330]. Uspešna borba protiv intracelularnih patogena, kao što su virusi, *Lysteria*, *Mycoplasma* i slično, zasniva se na različitim efektorskim funkcijama Th1 ćelija. U ovoj borbi, Th1 ćelije aktiviraju mnoge ćelije urođenog imunskog odgovora, kao što su klasično aktivirane makrofage. Pod dejstvom IFN- $\gamma$ , makrofage postaju sposobne da ubiju fagocitovane i intracelularne patogene, produkcijom azot monoksida (NO), slobodnih kiseoničnih radikala i slično. Pre pola veka, IFN su otkriveni kao „aktivnost“ koju proizvode ćelije inficirane virusom i koja može da zaštiti druge ćelije od infekcije [331]. Svi IFN su dobili ime po njihovoj sposobnosti da stimulišu sintezu velikog broja anti-viralnih produkata koji ograničavaju replikaciju i širenje virusa [332]. IFN su podeljeni po tipu receptora za koje se vezuju: tip I receptora (IFNAR), u koje spadaju dva subtipa receptora IFNAR1 i IFNAR2 i za koje se vezuju tip I IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), i tip II receptora odnosno receptor za IFN- $\gamma$  (IFNGR). Međutim, jedna studija na miševima ukazala je na različite imunološke osobine dve grupe IFN [333]. U ovoj studiji je pokazano da tip I IFN predominantno indukuju anti-viralnu aktivnost same inficirane ćelije, dok IFN- $\gamma$  pre svega aktivira mikrobicidnu aktivnost makrofaga nakon fagocitoze intracelularnih, ne-virusnih patogena [334]. Efikasan adaptivni imunski odgovor na intracelularne patogene uključuje i aktivaciju B ćelija. Naime, Th1 ćelije aktiviraju i usmeravaju B ćelije da proizvode antitela koja se specifično vezuju za molekule ispoljene na virusima i time ih neutrališu kada su virusi van ćelija. Pored toga, Th1 ćelije preko CD40/CD40L interakcije aktiviraju DC mogu indukovati diferencijaciju naivnih antigen-specifičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita i diferencirati ih u citotoksične T limfocite (CTL) [335-337]. CTL ubijaju ćelije inficirane virusom, koje prepoznaju preko ekspresije specifičnog virusnog antigena na površini, i na ovaj način sprečavaju širenje virusa i ponovnu invaziju drugih ćelija.

Vezivanje IL-4 za svoj receptor (IL-4R) na T limfocitima pokreće signalnu kaskadu u kojoj se aktivira STAT-6 i podstiče diferencijaciju Th2 ćelija. Kao i kod pomenute amplifikacije

produkcije IFN- $\gamma$ , i IL-4 aktivacijom NFAT, AP-1 i NF- $\kappa$ B povećava transkripciju *Il4* gena [338-339]. Ovi signali, takođe povećavaju ekspresiju transkripcionog faktora GATA-3, koji ima glavnu ulogu u diferencijaciji Th2 ćelija [340]. GATA-3 pokreće ekspresiju c-Maf, transkripcionog faktora koji, u koordinaciji sa GATA3, dalje povećava produkciju IL-4 od strane Th2 ćelija. Pored IL-4, GATA3 pokreće ekspresiju i drugih Th2 citokina, kao što su IL-5 i IL-13 [341-343]. Th2 ćelije imaju najznačajniju ulogu u borbi protiv ekstracelularnih patogena, kao što su helminti, gljive i ekstracelularne bakterije. Ove ćelije aktiviraju i usmeravaju B ćelije da produkuju IgG1 i IgE antitela koja neutralizuju toksine patogena, i opsonizujuća antitela specifična za same patogene, što vodi aktivaciji ćelija sa fagocitnom sposobnošću, pokretanju sistema komplementa i sprečavanju adhezije patogena. Iako je još davno prepoznat značaj Th2 ćelija u odgovoru na patogene, i njihove patološke uloge u razvijanju alergijskih reakcija, još uvek nije sasvim razjašnjen mehanizam koji pokreće diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita u Th2 smeru. Nedavno je pokazano, na različitim životinjskim modelima bolesti, da je populacija DC koja na površini ispoljava CD301 molekul, neophodna za pokretanje Th2 odgovora kod miša. Pokazano je da je sposobnost CD301<sup>+</sup> DC koje ispoljavaju i ligand za receptor programirane smrti (engl. programmed death ligand, PDL2) da indukuju diferencijaciju Th2 limfocita zavisna od ekspresije hemokinskog receptora CXCR5 na DC i subpopulaciji T limfocita [344]. Takođe pokazano je da IRF4, transkripcioni faktor koji se ispoljava kod T limfocita u toku Th2 diferencijacije, ispoljen i kod DC gde ima važnu ulogu u kontroli indukcije Th2 diferencijacije [345]. Time je konačno potvrđeno da DC direktno učestvuju u indukciji diferencijacije Th2 ćelija, što je ranije pripisivano ulozi bazofila [346], ili nedostatku Th1 polarizacionih citokina [347].

Nakon prvobitne podele imunskog odgovora na Th1 ili Th2 dominantan, i patološkog efekta koji Th1 ili Th2 ćelije mogu imati [348], otkriveni su i opisani CD4<sup>+</sup> T limfociti koji dominantno produkuju pro-inflamacijski citokin IL-17, a koji je najodgovorniji za pokretanje efektorskih mehanizama neutrofila. DC i makrofage u odgovoru na određene grupe patogena produkuju pro-inflamacijski citokin iz IL-12 familije citokina, IL-23 [349-351], koji ima ključnu ulogu u indukciji produkcije IL-17 i održavanju fenotipa Th17 ćelija.

Međutim, pokazano je takođe da IL-12 ne učestvuje u indukciji diferencijacije naivnih T limfocita u smeru Th17 ćelija [352]. U *in vitro* uslovima, IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23 su potrebni za diferencijaciju naivnih humanih T limfocita u Th17 ćelije i održavanje Th17 fenotipa. Glavni transkripcioni faktori koji posreduju u diferencijaciji Th17 ćelija su ROR $\gamma$ t i STAT3. Aktivnost Th17 ćelija pokazana je nakon infekcije različitim, mnogobrojnim ekstracelularnim i intracelularnim bakterijama, gljivama, i parazitima kao što je *Toxoplasma gondii* [353]. Pojedini podaci ukazuju na to da Th17 ćelije imaju najkraći polu-život i izazivaju prvu inflamacijsku reakciju nezavisno od patogena, i prethode diferencijaciji Th1 i Th2 ćelija. Naime, pokazano je da Th17 ćelije indukuju diferencijaciju Th1 i Th2 ćelija, koje nakon diferencijacije inhibiraju indukciju Th17 ćelija. Još uvek nije potpuno razjašnjena uloga Th17 ćelija tokom razvijanja inflamacijskog odgovora [354-356]. Tako je pokazano da IL-17 ima protektivnu ulogu tokom infekcije, ali takođe da su Th17 ćelije uključene u razvoj hronične inflamacijske reakcije i posledičnog oštećenja tkiva [268]. Pored IL-12 i IL-23, deo radova je pokazao da treći član IL-12 familije citokina, IL-27, takođe ima pro-inflamacijsku ulogu, odnosno da u kombinaciji sa IL-12 i/ili IL-2 može indukovati produkciju IFN- $\gamma$  od strane T limfocita i NK ćelija [357]. Sem toga, opisana je i imunoregulatorna funkcija IL-27. U tom smislu, najveća produkcija IL-27 od strane APC je zabeležena na kraju imunskog odgovora. IL-27 inhibira diferencijaciju Th17 odgovora, i indukcijom c-Maf, indukuje nastanak IL-10-produkujuće Tr1 populacije ćelija nalik na [358-360]. Takođe, različiti stimulusi, uključujući one koji potiču od prirodnih Treg, IFN- $\beta$ , agonisti TLR, i statini, mogu indukovati produkciju IL-27 od strane APC, i tako ograničiti samu indukciju.

#### *1.1.4.2.4. Polarizacija odgovora pomoćničkih T limfocita u pravcu odgovora regulatornih T limfocita*

Efektorske populacije T limfocita i ćelije koje proizvode različite molekule koji doprinose uništavanju patogena, istovremeno oštećuju i ćelije domaćina. Nezavisno od tipa patogena, ključ efikasnog imunskog odgovora je u balansu između aktivnosti ovih efektorskih mehanizama sa jedne strane, i regulatornih mehanizama, koji će inhibirati dalje oštećenje tkiva, sa druge strane. T limfociti, koji ključno učestvuju u održavanju

Tabela 2. Uticaj citokinskog miljea na imunski odgovor preuzeto od Hubell i Thomas [361]					
Odgovor	Citokini koji aktiviraju DC	Citokini koje proizvode aktivirana DC	Citokini koje proizvode aktivirane T ćelije	Efekti na druge ćelije	Prirodna indukcija
Treg	Visok TGF- $\beta$ i IL-10; nizak IL-6 i IL-12	TGF- $\beta$	IL-10	Supresija proliferacije CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> T ćelija	Sopstveni antigeni
Th17	IL-23, visok TGF- $\beta$ i visok IL-6	TNF- $\alpha$	IL-17, IL-22 i IL-6	Aktivacija fibroblasta da proizvode IL-6, G-CSF, GM-CSF, CXCL8 i CXCL12 što privlači neutrofile i makrofage stvarajući Th1 mikrosredinu	Bakterijske i virusne infekcije
Th1	IL-12, IL-18 IL-27	IL-12	IFN- $\gamma$ , IL-2 i IL-1- $\alpha$	Blokira razvoj Th17 i Th2. Aktivira B ćelije da proizvode IgG1 (kod ljudi)	Bakterijske i virusne infekcije
Th2	IL-4 IL-6	IL-1	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13	Indukuju proliferaciju B ćelija i preuključivanje klase antitela; aktivira makrofage alternativnim putem	Infekcije helmintima

regulatornih mehanizama, tolerance na sopstveno, završetka imunskog odgovora i sprečavanju oštećenja sopstvenih ćelija, predstavljaju različite populacije regulatornih T limfocita (Treg). Urođeni Treg nastaju tokom razvića timusa pod uticajem Foxp3 transkripcionog faktora, čija se ekspresija značajno povećava nakon susreta ovih ćelija sa sopstvenim antigenom. Zbog toga, prirodne Treg predstavljaju ključne posrednike u održavanju tolerancije organizma na sopstvene antigene. Aktivnost prirodnih Treg je nezavisna od APC, a isto važi i za  $\gamma\delta$  T limfocite koji regulišu aktivnost efektorskih T limfocita na mestu inflamacije [362-363]. Sa druge strane, indukcija antigen-specifičnih

Treg dešava se tokom interakcije T limfocita sa tolerogenim DC [364], i ove ćelije nazivamo indukovane Treg. Ključna razlika između urođenih i indukovanih Treg je ta da indukovane mogu nastati iz bilo koje naivne T ćelije u odgovarajućim okolnostima, čak i one koja je predodređena za diferencijaciju u Th17 [365]. Treg koriste različite molekule za postizanje imunosupresivnih efekata. Neki od ovih molekula su solubilni TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35, dok su drugi ispoljeni na membrani Treg, kao što su CTLA-4, LAG-3, GITR, CD39 i CD73 [366]. Različite populacije Treg karakterišu se dominantnom produkcijom nekih od ovih molekula i razlikuju se po aspektu imunskog sistema na koji imaju dominantan efekat. Tako, jedna populacija Treg, Tr1 ćelije, proizvode visok nivo IL-10 [363], dok je za Th3 karakteristična visoka produkcija TGF- $\beta$ , i pokazano je da one učestvuju u indukciji oralne tolerancije na komensalnu floru [367].

#### 1.1.4.2.5. Interakcija MSC sa T limfocitima

Prve studije na humanim BM-MSK [368-371], kao i na BM-MSK babuna [279] i glodara [372-373], pokazale su da MSC mogu supresivno delovati na aktivaciju i proliferaciju autologih i alogenih T limfocita *in vitro*. Humane MSC kultivisane *ex vivo* mogu suprimirati proliferaciju T limfocita stimuliranih na različite načine: alo-antigenima [368-370], mitogenima [371] i anti-CD3/anti-CD28 antitelima [369, 372]. Takođe je pokazano da humane MSC u kulturi inhibiraju proliferaciju CTL aktiviranih alo-antigenom, ali nemaju uticaja na njihovu citotoksičnu funkciju [310, 368]. Više puta je pokazano da supresivni efekat humanih i mišijih MSC na T limfocite nije podložan MHC-restrikciji, odnosno ne zavisi od toga da li se u kulturi koriste autologe ili alogene MSC [370-372]. Većina autora se slaže da su solubilni faktori odgovorni za većinu imunosupresivnih efekata humanih MSC na T limfocite aktivirane alo-antigenom [293, 369, 371].

Poreklo MSC može bitno da odredi dominantni mehanizam kojim ove ćelije menjaju funkciju ćelija imunskog sistema. Tako, nakon stimulacije mišijih MSC IFN- $\gamma$  u kombinaciji sa TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ili IL-1 $\alpha$ , ove ćelije ispoljavaju inducibilnu NO sintazu (iNOS) [288, 374]. Visoke koncentracije NO inhibiraju fosforilaciju STAT5 u T limfocitima i indukuju apoptozu *in vitro* [374]. U istim uslovima stimulacije, pro-

inflamacijskim molekulima, humane MSC ispoljavaju visok nivoIDO-1, koji je uključen u supresiju proliferacije T limfocita [297]. Međutim, iako je uticajIDO-1 enzima u supresiji proliferacije poznat od ranije, njegova uloga u supresiji posredovanoj sa humanim MSC nije potpuno razjašnjena [369, 371, 375]. Jedna novija studija je pokazala da humane MSC indukuju apoptozu T limfocita izazvanu nedostatkom triptofana [376], sa druge strane nekoliko drugih studija je ukazalo na to da dodavanje humanih MSC u kulturu T limfocita nema nikakvog značajnog efekta na njihovu apoptozu [370, 377-378].

Humane MSC konstitutivno proizvode PGE2 i produkcija ovog molekula se pojačava nakon ko-kultivacije MSC sa mononuklearnim periferne krvi [369]. Iako je u jednoj od prvih studija pokazano da inhibicija sinteze PGE2 od strane MSC dovodi do ublažavanja njihovog anti-proliferativnog i anti-inflamatornog efekta na T limfocite stimulisane alo-antigenom ili anti-CD28/anti-CD3 antitelima [375], kasnije studije su pokazale drugačije rezultate [369, 379]. Takođe, važno je znati da su efekti PGE2 u imunoregulaciji posredovanoj MSC uvek u vezi sa efektima drugih immunosupresivnih molekula. Tako PGE2 inhibitor, indometacin, i inhibitor NO, nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), sinergistički smanjuju inhibitory efekta mišijih MSC na proliferaciju T limfocita [374]. Takođe pokazano je da u slučaju humanih MSC, PGE2 u kombinaciji saIDO-om deluje inhibitory na proliferaciju T limfocita [380], kao i na proliferaciju, citotoksičnost i produkciju citokina od strane NK ćelija [312, 380].

Nekoliko studija je pokazalo da TGF- $\beta$  posreduje u supresiji proliferacije T limfocita od strane MSC. Takođe je pokazano da TGF- $\beta$  proizveden od strane humanih MSC ovaj efekat često ostvaruje u koordinaciji sa drugim molekulima. Tako su *Di Nicola i saradnici* [371], korišćenjem neutralizirajućih antitela, pokazali ulogu TGF- $\beta$ 1 i HGF kao posrednika u supresivnom efektu humanih BM-MS na proliferaciju T limfocita stimulisanu APC. Međutim, TGF- $\beta$  ne posreduje u supresivnom efektu BM-MS na T limfocite aktivirane mitogenom [377], što ukazuje na to da mehanizam supresije koji MSC koriste može biti različit u zavisnosti od načina aktivacije T limfocita, kao i to da efekat MSC na APC može biti od presudnog značaja. *Nasef i saradnici* [381] su pokazali da TGF- $\beta$  i IL-10 posreduju u supresiji T limfocita. Međutim oni su pokazali da iako je sam anti-proliferativan efekat MSC na T limfocite posredovan ovim solubilnim molekulima, njihov nivo je značajno veći,



i supresivan efekat izraženiji, kada postoji direktan ćelijski kontakt između MSC i T limfocita. Sa druge strane je pokazano da humane MSC, kroz produkciju TGF- $\beta$ , indukuju Treg i tako štite ćelije kancera dojke [382].

U ispitivanjima uticaja MSC na diferencijaciju Th ćelija je pokazano da MSC inhibiraju diferencijaciju Th1 efektorskih ćelija iz naivnih prekursora, time što blokiraju produkciju IFN- $\gamma$ . Takođe, u kulturi sa naivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima, pokazano je da MSC inhibiraju diferencijaciju Th17 ćelija. Sem toga, u kulturi sa već diferenciranim Th17 ćelijama MSC smanjuju produkciju IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  [383].

Pored direktne supresije proliferacije i funkcije T limfocita, MSC mogu indukovati i nastanak Treg, koje onda mogu da ispolje supresivne efekte. U ko-kulturi sa mišijim splenocitima, alogene MSC mogu indukovati formiranje funkcionalnih CD8<sup>+</sup> Treg ćelija [373]. Takođe je pokazano da u ko-kulturi sa mononuklearima periferne krvi stimulisanim mitogenom, humane MSC indukuju diferencijaciju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija [310, 375]. *Nasef i saradnici* [384] su pokazali da humane MSC, nakon kultivacije u mešanoj leukocitnoj reakciji, proizvode povišen nivo LIF-1, i da dodavanje anti-LIF antitela dovodi do delimičnog smanjivanja njihovog supresivnog efekta. Ovi autori su takođe pokazali da LIF produkovan od strane MSC posreduje u indukciji Treg, i zbog toga ne dolazi do povećanja broja CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u PBMC kada se kulturi doda anti-LIF antitelo. Obzirom da je pokazano da WJ-MSK proizvode značajno veći nivo LIF, moguće je da ove ćelije imaju značajnu ulogu u održavanju fetu-maternalne tolerance. Takođe, i u slučaju ovih MSC pokazano je da LIF učestvuje u supresiji proliferacije T limfocita delimično posredstvom indukcije Treg [385]. U skorije vreme je pokazano, da je mehanizam indukcije Treg dejstvom heme oksigenaze-1(HO-1) snažno povezan sa supresijom T limfocita i održanjem periferne tolerance [386]. Iako je do sada više puta pokazano da MSC indukuju diferencijaciju Treg, još uvek nije pokazana direktna uloga HO-1 produkovanog od strane MSC u ovom procesu [382, 387]. Interesantno je da kod pre-aktiviranih MSC (kultivacijom u alogenoj MLR) HO-1 gubi ulogu medijatora u indukciji Treg, promociji IL-10 i supresiji. Međutim, *Krampera i saradnici* [372] su pokazali da, MSC ne indukuju direktno Treg produkcijom solubilnih molekula, već sprečavaju kontakt između T limfocita

i prisutnih APC u ko-kulturi, pri čemu APC stiču tolerogene funkcije i sposobnost da indukuju Treg.

Još jedan mehanizam supresije proliferacije i funkcije T limfocita posredovane sa MSC je indukcija anergije T limfocita. Naime, MSC pod određenim uslovima, kao što su niske koncentracije IFN- $\gamma$ , mogu ispoljiti MHC klasu II, ali ne i kostimulatorne molekule. U kontaktu sa T limfocitima ovaj nedostatak drugog signala za aktivaciju može indukovati anergiju T limfocita [388]. Nekoliko studija na humanim i mišijim MSC je pokazalo da je anergija T limfocita prolazna i da oni ponovo mogu da odgovore na stimulus nakon uklanjanja MSC iz kulture [371-372, 389]. Nasuprot ovim, jedna studija na mišijim MSC je pokazala da MSC indukuju takvo stanje anergije kod T limfocita da nakon njihovog uklanjanja, uprkos restimulaciji i dodavanju IL-2, ne dolazi do oporavka proliferacije T limfocita, iako se značajno oporavlja njihova sposobnost da produkuju IFN- $\gamma$ . Ovaj fenomen je opisan i kao anergija usled stopiranja ćelijskog ciklusa (*engl.* division arrest anergy), i razlikuje se od funkcionalne anergije [390].

Za konačno zaključivanje o mehanizmu supresije proliferacije T limfocita koji MSC koriste, značajno je to da MSC ne moraju konstitutivno proizvoditi supresivne faktore da bi inhibirale proliferaciju T limfocita, već da je za taj efekat dovoljna ko-kultivacija MSC i T limfocita, bez direktnog kontakta [373]. Dakle, presudnu ulogu u inhibiciji proliferacije T ćelija imaju solubilni faktori MSC, koji su indukovani solubilnim faktorima T limfocita u dinamičnim uslovima ko-kulture.

#### *1.1.4.2.6. Osobine tolerogenih dendritskih ćelija*

DC mogu indukovati Treg na nekoliko različitih načina. Najjednostavniji, i prvobitno otkriven mehanizam uključuje nezrele DC koje imaju nisku ekspresiju MHC klase II na površini i ne ispoljavaju ko-stimulatorne molekule i/ili pro-inflamacijske citokine [391-393]. Ovakav fenotip ispoljavaju nezrele DC nakon tretmana sa TNF- $\alpha$  ili IFN- $\alpha$ , ili nakon inhibicije E-kadherina. Takođe, ove DC u ko-kulturi sa nezrelim T limfocitima indukuju Treg [394-395]. Pored toga, populacije nezrelih DC na periferiji mogu da ispolje CCR7, što im omogućava da migriraju u limfne čvorove gde indukuju Treg [396-399]. Pored ovog jednostavnog mehanizma indukcije Treg, koji se zasniva na uskraćivanju signala potrebnih

za indukciju efektorskih T limfocita, fenotipski potpuno zrele DC takođe mogu imati imunoregulatoni efekat.

Tabela 3. Šta čini tolerogenu dendritsku ćeliju? Preuzeto od Morelli i Thomson [400]	
• Sposobnost da prihvate i prezentuju antigen antigen-specifičnim T limfocitima putem direktne, indirektne ili semi direktne prezentacije	
• Nisko konstitutivno ispoljavanje površinskih MHC molekula, nizak odnos ispoljavanja kostimulatornih molekula (CD80 i CD86) u odnosu na koinhibitorne molekule (npr. PDL1)	
• Niska produkcija IL-12 i visoka produkcija IL-10 i ekspresijaIDO	
• Otpornost na sazrevanje u odgovoru na opasni signal kao što su ligandi TLR, HMGB1 ili CD40L	
• Sposobnost da generišu ili stimulišu proliferaciju regulatornih T ćelija	
• Sposobnost da indukuju apoptozu efektorskih T ćelija	
• Sposobnost da odgovore na Treg povećavajući ispoljavanje inhibitornih molekula kao što su IL-10 iliIDO	
• Sposobnost da migriraju u T ćelijske zone sekundarnih limfnih organa ispoljavanjem relevantnih hemokinskih receptora	
• Dugoživeće su i otporne su na ubijanje od strane NK ćelija i CTL	

Ovom tipu pripadaju i iscrpljene DC, koje postaju imunosupresivne nakon produženog perioda izloženosti pro-inflamacijskim stimulusima, kao što je dugotrajna stimulacija

lipopolisaharidom (LPS). Tako, ove ćelije počinju da proizvode IL-10 i, umesto Th1 indukcije, one favorizuju nastanak nediferenciranih memorijskih T limfocita i/ili Th2 odgovor [401-402]. Iako na ovaj način iscrpljene DC sprečavaju produžavanje pro-inflamacijskog Th1 odgovora, nije poznato da li indukuju i nastanak Treg. Tolerogene DC mogu proizvoditi IL-10 i TGF- $\beta$ , čiji su imunoregulatorni mehanizmi dobro poznati. Sem toga, tolerogene DC ispoljavaju i imunoregulatorni enzim IDO-1. Pod određenim okolnostima, DC mogu na svojoj površini da ispolje članove specifične superfamilije receptora koji se odlikuju po domenu sličnom imunoglobulinima (*engl.* Ig-like transcript, ILT) [403-407]. Ovi receptori mogu imati imunostimulatornu, ili imunoregulatornu ulogu, kao što je to karakteristično membranskih ILT2, ILT3, ILT4 i ILT5 [408]. Tako je pokazano da je povećanje ekspresije ILT3 i ILT4 na različitim APC povezano sa tolerogenom funkcijom ovih ćelija [403-404, 408-410]. Takođe, pokazano je da je povećana ekspresija ILT3 na DC neophodna za indukciju CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg [404, 406, 410].

#### 1.1.4.2.7. Interakcije MSC sa dendritskim ćelijama

*Jiang i saradnici* [411] su među prvima pokazali da alogene humane MSC značajno inhibiraju proces diferencijacije DC iz monocita periferne krvi. Morfologija monocita diferenciranih u prisustvu MSC je slična makrofagoj. Ovakve DC imaju visoko ispoljen CD14 molekul, i nema CD1a molekula na površini [412], što je takođe odraz poremećene diferencijacije. Pored efekta na proces diferencijacije, pokazano je da MSC supresivno deluju i na LPS indukovano sazrevanje DC već diferenciranih iz monocita periferne krvi. MSC deluju supresivno na ekspresiju molekula povezanih sa funkcijama zrelih pro-inflamacijskih DC, kao što su CD83, MHC klase II, CD80 i CD86, i na produkciju IL-12p70 [411] i TNF- $\alpha$  [375]. Sem toga, MSC smanjuju sposobnost DC da indukuju proliferaciju alogeničkih limfocita u kulturi [411]. *Li i saradnici* [413] su pokazali da humane MSC reverzibilno sprečavaju diferencijaciju CD34<sup>+</sup> HSC do Langerhansovih ćelija (*engl.* Langerhans cells, LC) aktiviranjem Notch signala u ovim ćelijama, ali da ne utiču na proces sazrevanja već diferenciranih DC. Međutim, *Nauta i saradnici* [412] su pokazali da MSC ne remete diferencijaciju CD1a<sup>+</sup> prekursora u LC, kao i to da nije poremećeno ispoljavanje markera sazrevanja nakon stimulacije LC. Međutim, oni su takođe pokazali da MSC i u

kontakt nezavisnom sistemu pokazuju inhibitorni efekat na proces diferencijacije CD34<sup>+</sup> HSC do DC, na osnovu čega je pretpostavljeno da je za ovaj efekat odgovoran neki solubilni molekul.

Pokazano je da IL-6 produkovan od strane humanih MSC ima ulogu u inhibiciji diferencijacije DC, što rezultuje smanjenom proliferacijom T limfocita u mešanoj leukocitnoj reakciji (MLR) sa MSC [414]. Ovaj efekat IL-6 otkrili su *Park i saradnici* [415] još pre 10 godina, kada je pokazano da IL-6 održava DC u nezrelom stanju, sprečavajući njihovu maturaciju preko STAT3, i time omogućava kontrolu odgovora T limfocita *in vivo*. Pored uloge IL-6, postoji više objavljenih podataka o tome da ako se blokira produkcija PGE2 od strane MSC one gube supresivni efekat na proces diferencijacije monocita u DC [416], i na funkciju DC koje indukuju Th1 odgovor (DC1) [375].

Kako je pokazano da DC imaju važnu ulogu u razvoju periapeksne lezije [417-418], može se pretpostaviti da MSC na mestu inflamacije svoje imunomodulatorne efekte mogu ostvariti i delovanjem na DC. Međutim, do danas nije ispitivan uticaj MSC izolovanih sa mesta inflamacije, kao što je periapeksna lezija, na osobine DC.

#### *1.1.4.2.8. Mehanizmi delovanja solubilnih molekula koji posreduju u imunomodulatornim efektima MSC, tolerogenih dendritskih ćelija i regulatornih T limfocita*

##### *1.1.4.2.8.1. Indolamin-2, 3-dioksigenaza-1*

Indolamin-2, 3-dioksigenaza-1 (IDO-1) i solubilni produkti triptofana koji nastaju aktivnošću ovog enzima su u novije vreme pokazani kao kritični regulatori indukcije imunske tolerance i supresije [419]. Triptofan je esencijalna aminokiselina, neophodna za rast i funkcionisanje ćelija. Primarni put metabolizma triptofana je kinureninski put, koji je regulisan od strane tri enzima: IDO-1, IDO-2 i triptofan 2, 3-dioksigenaza (TDO) [420]. Ekperimentalni podaci dobijeni u poslednjoj deceniji pokazali su da IDO-1, ali ne i TDO, ima bitnu imunosupresivnu ulogu u imunskoj toleranci i regulaciji Th1/Th2 odnosa. Smatra se da dva mehanizma imaju ulogu u IDO-1-posredovanoj regulaciji imunskog sistema. Prvi mehanizam je IDO-1-posredovana potrošnja triptofana koja direktno pogađa preživljavanje i funkciju proliferišućih imunskih ćelija, i indukuje stres aktivirajući poseban kinazni put

(*engl.* general control nonrepressed 2 (GCN2) kinase pathway) [421]. Ovaj put je posredovan serin/treonin kinazama koje se aktiviraju nakon prepoznavanja tRNK sa nevezanim aminokiselinama. Ispitivanjima kod *Saccharomyces cerevisiae* je pokazano da se aktivacijom ovih kinaza blokira opšta sinteza proteina, a stimuliše transkripcija GCN4 transkripcionog faktora, koji nakon toga pokreće transkripciju gena uključenih u biosintezu svih 20 aminokiselina. Drugi mehanizam dejstva IDO i TDO uključuje citotoksične i imunoregulatorne efekte kataboličkih produkta triptofana, nastalih u toku kinureninskog metaboličkog puta. Veliki broj radova je pokazao da su ovi katabolički produkti triptofana bitni kao regulatori funkcije Th1 i Th2 ćelija kod miša, mada su Th2 ćelije manje osjetljive [422]. Takođe je pokazano, da IDO aktivira GCN kinazni put i inhibira produkciju IL-6 od strane mišijih plazmocitoidnih DC (pDC), i tako sprečava konverziju Treg u Th17 [423-425]. Mišije i humane Treg mogu da indukuju ekspresiju IDO-1 u DC, i to ili interakcijom CTLA-4 na Treg i CD80/CD86 na DC [426], ili citokinima koje Treg proizvode [427]. Za uzvrat, IDO<sup>+</sup> DC mogu aktivacijom metaboličkog puta triptofana, da indukuju *de novo* diferencijaciju Treg iz naivnih T limfocita, u okviru mehanizama širenja imunske tolerance. Ovaj put indukcije Treg regulisan je IFN tipa I [428], ne-konkavnim putem aktivacije NF- $\kappa$ B [429-430] i mehanizmima koji uključuju IL-10 [431-432]. CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T ćelije se mogu diferencirati iz naivnih T limfocita u ko-kulturi sa IDO<sup>+</sup>DC miša ili IDO<sup>+</sup> ćelijama humane mijeloidne leukemije, kao i dodavanjem kinurenina u medijum sa smanjenom koncentracijom triptofana [433-434]. Jedna grupa autora objavila je rezultate koji pokazuju vezu između kinureninskog puta posredovanog IDO-1, i puta koji posredstvom aril-hidrokarbon receptora (AHR) indukuje Treg ćelije kod miša [435]. Oni su pokazali da kinurenin, vezujući se za AHR, indukuje nastanak Treg, pri čemu je direktna uloga TGF- $\beta$  u indukciji ekspresije AHR. Pored toga, aktivacija AHR u plazmocitoidnim DC povećava ekspresiju IDO, što ovim ćelijama omogućava da, bez kontakta sa naivnim T limfocitima, indukuju njihovu diferencijaciju u Treg. Citoplazmatska neaktivna forma AHR se nalazi u kompleksu sa šaperonom Hsp90 i košaperonom AHR-interagujućim proteinom i fosfoproteinom p23 [436]. Ligandi za AHR difunduju u ćeliju i vezuju se za citosolni AHR nakon čega dolazi do translokacije ovog kompleksa u nukleus. U nukleusu se AHR-ligand kompleks vezuje za AHR nuklearni translokator i ovaj kompleks se vezuje za različite

genske elemente, uključujući i represor za AHR, ali i za promotorski region FoxP3 gena [437]. Kako se Foxp3 indukuje i u toku diferencijacije Th17 i Treg, pokazano je da, u prisustvu IL-6 i TGF- $\beta$ , aktivacija AHR ligandom, TCDD (tetrahlorodibenzo p dioksin), indukuje razvoj Th17, a aktivacija AHR fotoproduktima triptofana indukuje diferencijaciju Treg.

#### 1.1.4.2.8.2. TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor) je regulatorni molekul sa plejotropnim efektom na proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i preživljavanje ćelija, što utiče na mnoge biološke procese kao što su razviće, kancerogeneza, fibroza, zarastanje rana i imunski odgovor [438]. Kod sisara postoje tri homologe izoforme ovog proteina, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, koje kodiraju različiti geni [439]. TGF- $\beta$ 1 je dominantna forma i ispoljavaju je sve ćelije imunskog sistema, ali sve tri izoforme imaju slične osobine *in vitro*. TGF- $\beta$  superfamilija ostvaruje svoje biološke funkcije preko dva tipa receptora, tip I i tip II transmembranskih serin/treonin kinaznih receptora. TGF- $\beta$  se vezuje za TGF- $\beta$  receptor II-ALK5 kompleks i fosforiliše intraćelijske Smad proteine. Do sada je opisano pet Smad proteina povezanih sa ovim receptorom, R-Smad 1, 2, 3, 5 i 8. Jedan Smad protein zajednički je za oba tipa receptora (Co-Smad 4), a dva Smad proteina inhibiraju signal sa TGF- $\beta$  receptora (I-Smad 6 i 7). Nakon aktivacije receptora, ALK5 fosforiliše R-Smad 2 i 3 nakon čega se oni sa Co-Smad4 translociraju u nukleus i vezuju za odgovarajuće genske elemente. I-Smad7 suprimira TGF- $\beta$  signalizaciju kompetativnim vezivanjem za ALK5 umesto R-Smad i aktiviranjem Smurf/E3 ubikvitinaze koja degradira ALK5. Smad kompleksi u jedru interaguju sa histon-acetil transferazama (HAT, npr. CBP/p300) ili deacetilazama (HDAC, npr. Sno/Ski) čime aktiviraju, odnosno suprimiraju gensku ekspresiju. Sem Smad-zavisne signalizacije, opisana je i Smad-nezavisna signalizacija koja uključuje Ras-Erk, TAK-MKK4-JNK, TAK-MKK3/6-p38, Rho-Rac-cdc42 MAPK I PI3K-Akt signalne puteve [440]. Najveći uticaj među ćelijama imunskog sistema (Slika 1.9.) TGF- $\beta$  ima na T limfocite [441]. TGF- $\beta$  koristi različite mehanizme tokom inhibicije proliferacije T limfocita uključujući (a) inhibiciju ekspresije IL-2 preko supresije njegove transkripcije, (b) povećanje ekspresije inhibitora ciklin-zavisnih kinaza (p15, p21, p27)

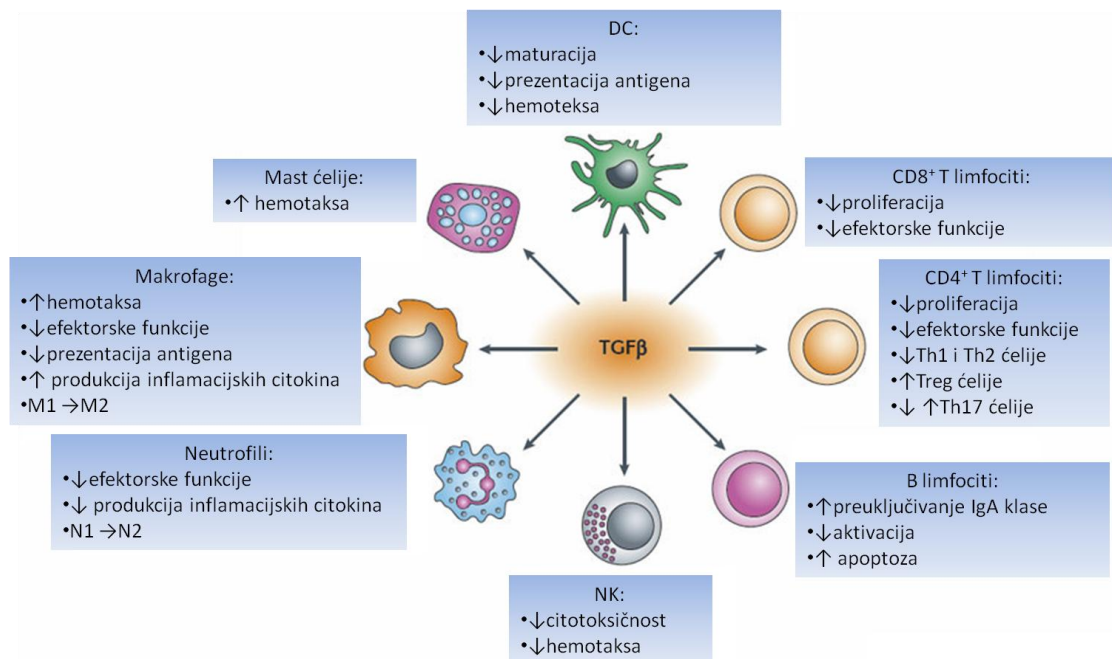
[442-445] i (c) smanjenje ekspresije c-myc, ciklina D2 i ciklina E u T limfocitima, što direktno inhibira ćelijski ciklus T limfocita [446-448]. Međutim, anti-proliferativni efekat TGF- $\beta$  u mnogome zavisi od statusa diferenciranosti T limfocita i uticaja signala koji dolaze preko drugih citokina i ko-stimulatornih molekula. Tako, iako TGF- $\beta$  deluje inhibitorno na proliferaciju naivnih humanih ili mišijih T limfocita, njegov efekat je minimalan na aktivirane T limfocite, što je u korelaciji sa smanjenom ekspresijom TGF- $\beta$  receptora II na ovim ćelijama [449]. Razlog za ovakvu razliku u efektu je taj što kostimulacija sa CD28 značajno umanjuje TGF- $\beta$  indukovanu inhibiciju proliferacije naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita [450]. Tako, u prisustvu CD28, TGF- $\beta$  inhibira apoptozu T limfocita, podržava ekspanziju ovih ćelija i preživljavanje T limfocita sa memorijskim/efektorskim fenotipom [449-454]. Takođe, IL-2 i TGF- $\beta$  sinergistički blokiraju aktivacijom-indukovanu ćelijsku smrt Th1 i Th2 ćelija [451, 453, 455-456], dok TGF- $\beta$ , čak i u prisustvu IL-2, inhibira diferencijaciju efektorskih T limfocita i funkciju Th ćelija [457], ali ne i proliferaciju T limfocita [458]. Ovo pokazuje da TGF- $\beta$  može da utiče nezavisno na procese proliferacije i diferencijacije T limfocita. Pored proliferacije, TGF- $\beta$  inhibira i citotoksičnu funkciju CD8<sup>+</sup> T limfocita [459], tako što inhibira ekspresiju perforina [460] i Fas liganda [447] u ovim ćelijama. Takođe, pokazana je zanimljiva dualistička uloga TGF- $\beta$  u diferencijaciji dva alternativna tipa mišijih T limfocita, Th17 i Treg, čije su funkcije u imunskom odgovoru potpuno suprotne [268, 352, 461-462].

Diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita u smeru Th17 ćelija indukuju citokini koje proizvode ćelije urođene imunosti nakon detekcije patogenih organizama. IL-6, koga proizvode DC, indukuje diferencijaciju Th17, ali ovaj efekat IL-6 ostvaruje u saradnji sa TGF- $\beta$ . U odsustvu IL-6, odnosno odsustvu stimulusa od strane ćelija urođene imunosti, TGF- $\beta$  indukuje diferencijaciju Treg. Zanimljivo je da sam TGF- $\beta$  kod naivnih T limfocita stimuliše ekspresiju dva transkripciona faktora, ROR $\gamma$ t koji je karakterističan za Th17 i Foxp3 koji je marker Treg. Međutim, mišiji T limfociti tretirani samo TGF- $\beta$  proizvode nizak nivo IL-17, i progresivno se smanjuje transkripcija ROR $\gamma$ t, a povećava Foxp3, nakon čega se one diferenciraju u Treg [463-464].

Slično ovome, Th17 ćelije diferencirane u prisustvu TGF- $\beta$  i IL-6, prolazno ispoljavaju i ROR $\gamma$ t i Foxp3, ali se u ovom slučaju smanjuje transkripcija Foxp3, kako napreduje Th17



diferencijacija [464-465]. Dalje je pokazano da se diferencijacija ovih ćelija zasniva na međusobnom prekidu ekspresije između ovih transkripcionih faktora, a to koji će faktor preovladati zavisi od koncentracije TGF- $\beta$ . Visoke doze TGF- $\beta$  povećavaju transkripciju Foxp3 koji potiskuje funkciju ROR $\gamma$ t. Niske doze TGF- $\beta$ , zajedno sa signalima koji dolaze od IL-6, omogućavaju prevazilaženje ovog inhibitorynog efekta Foxp3 na ROR $\gamma$ t [464].



**Slika 1.9.** Efekti TGF- $\beta$  na ćelije imunskog sistema. M1 $\rightarrow$ M2 i N1 $\rightarrow$ N2 znači promena dominacije makrofaga (M) odnosno neutrofila (N) od ćelija sa pro-inflamacijskim (M1, N1) do ćelija sa anti-inflamacijskim osobinama (M2, N2). Preuzeto od Akhurst i saradnika [466] i obrađeno.

Pored IL-6, inhibitoryni efekat Foxp3 može biti smanjen u prisustvu IL-21 i IL-23, jer svi ovi citokini preko STAT-3 puta indukuju Th17 diferencijaciju. Ovi citokini supresivno deluju na ekspresiju Foxp3 i smanjuju njegov efekat u uslovima kada je njegova ekspresija povećana [467]. O efektu TGF- $\beta$  na DC se zna relativno malo. Poznato je da je pored GM-CSF, TNF- $\alpha$  i faktora matičnih ćelija, upravo TGF- $\beta$  neophodan za diferencijaciju LC iz

HSC [468]. Takođe, TGF- $\beta$  u prisustvu IL-4 i GM-CSF, indukuje ekspresiju markera LC kao što su E-kadherin i CD1a na monocitima periferne krvi [469]. Pored indukcije diferencijacije LC, TGF- $\beta$ 1 inhibira apoptozu prekursora LC, najverovatnije posredstvom Smad-nezavisnih signalnih mehanizama. TGF- $\beta$  nokauti nemaju LC, a proces diferencijacije ovih ćelija se oporavlja nakon transplantacije ćelija kostne srži iz donora koji je heterozigot za TGF- $\beta$ 1 [470]. Nezrele DC koje su diferencirane u prisustvu TGF- $\beta$  obično imaju nižu ekspresiju MHC klase II, nizak nivo CD1a i kostimulatornih molekula CD80, CD83 i CD86 u poređenju sa ćelijama diferenciranim bez TGF- $\beta$  [471]. Međutim, moDC diferencirane u prisustvu TGF- $\beta$ , proizvode više IL-23 i stimulišu produkciju IL-17 u ko- kulturama sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Takođe, nakon stimulacije sazrevanja DC pod uticajem pro-inflamacijskog citokinskog koktela, ovakve ćelije mogu inicirati jači Th1 odgovor stimulisan većom produkcijom IL-12 [472]. Efekat TGF- $\beta$  na proces sazrevanja DC u velikoj meri zavisi od stimulusa koji se primenjuje za indukciju sazrevanja. Tako, TGF- $\beta$  inhibira fenotipsko sazrevanje DC u prisustvu LPS-a ili IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  [473], ali ne i u slučaju kada se kao stimulus za sazrevanje koristi CD40L. Obzirom da CD40L signal dolazi od T ćelija koje su prepoznale antigen, uloga TGF- $\beta$  bi u tom smislu bila da se spreči aktivacija DC koje nisu ispoljile odgovarajući antigen. Pokazano je da same LC sintetizuju velike količine TGF- $\beta$ . Kod miša je pokazano da subpopulacija CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup> DC takođe proizvode TGF- $\beta$ . Obzirom da u stanju mirovanja, DC proizvode TGF- $\beta$ , moguće je da autokrinom regulacijom DC održavaju stanje nezrelosti i tolerancije na sopstvene antigene [440].

#### 1.1.4.2.8.3. IL-6

IL-6 je citokin koji nije samo uključen u inflamaciju i odgovor na infekciju već i u regulaciju metaboličkih i regenerativnih procesa. U klasičnom signalnom putu, IL-6 stimuliše ciljne ćelije preko membranskog receptora (mIL6-R), koji se nakon aktivacije vezuje za signalni receptor protein gp130 i signal se dalje šalje unutar ćelije. Interesantno je, da samo nekoliko ćelijskih tipova ispoljava mIL-6R, dok sve ćelije ispoljavaju gp130 na svojoj površini. Ćelije koje nemaju mIL-6R nisu osetljive na IL-6 sve dok se ovaj citokin ne veže za solubilnu formu svog receptora (sIL-6R) koja postoji i u odsustvu stimulacije, i

ceo proces je nazvan *trans*-signalizacija. Značajno je to što su regenerativni, odnosno anti-inflamacijski efekti IL-6 posredovani klasičnim putem, dok se pro-inflamacijski efekti IL-6 ostvaruju *trans*-signalizacijom. Takođe, smena uključivanja dve vrste receptora ključna je za sam tok inflamacije. Tako, na početku inflamacije, endotelne ćelije, aktivirane patogenima, produkuju IL-6 koji aktivira neutrofile vezujući se za mIL-6R ispoljen na njihovoj membrani. Proteolitičko razlaganje mIL-6R od strane aktiviranih neutrofila pokreće IL-6 *trans*-signalizaciju u monocitima koji nemaju ispoljen mIL-6R, čime se završava akutna faza inflamacije i počinje faza dominacije monocita.

IL-6 je primarno identifikovan kao faktor diferencijacije B limfocita koji podstiče produkciju antitela [474]. Pored toga, on ima ključnu ulogu u diferencijaciji naivnih mišijih CD4<sup>+</sup> T limfocita u Th17 i Th2 smeru [352, 475]. IL-6 produkovan od strane humanih fibroblasta dodatih u kulturu sa monocitima, indukuje diferencijaciju monocita u makrofage, tako što povećava ekspresiju receptora za M-CSF od strane monocita [476]. Sa druge strane, kultivacija humanih CD34<sup>+</sup> prekursora, izolovanih iz kostne srži ili periferne krvi, u prisustvu IL-6 stimuliše njihovu ekspanziju, a naknadni tretman sa GM-CSF-om omogućava njihovu diferencijaciju u funkcionalne DC [477].

#### 1.1.4.2.8.4. IL-10

IL-10 je anti-inflamatorni citokin koji ima ključnu ulogu u prevenciji razvijanja inflamatornih i autoimunskih stanja [478-480]. Miševi deficijentni za IL-10 razvijaju inflamatornu bolest creva [481] nakon kolonizacije digestivnog sistema određenim mikroorganizmima [482], a takođe pokazuju i druge prenatlažene inflamatorne odgovore kada se izlože mikroorganizmima. IL-10 receptor (IL-10R) se sastoji od najmanje dve subjedinice iz familije IFNR. IL-10R1 je subjedinica odgovorna za vezivanje IL-10 i sve biološke efekte, obzirom da antitelo na ovaj receptor blokira efekte virusnog ili ćelijskog IL-10 [483-484]. IL-10R2 predstavlja pomoćnu subjedinicu IL-10R koja posreduje u signalizaciji. Miševi koji nemaju ispoljen IL-10R2, slično onima koji ne ispoljavaju IL-10, razvijaju ozbiljan hronični enterokolitis, a njihove ćelije ne mogu da odgovore na IL-10 *in vitro* [485]. Ova subjedinica ne učestvuje u samom vezivanju IL-10, već u aktivaciji Jak kinaze (Tyk2) u signalnom kompleksu [486]. Stoga vezivanje IL-10 za receptor inicira

aktivaciju STAT1 i STAT3 kod makrofaga i STAT5 kod ostalih ćelija. STAT3 predstavlja ključni faktor za biološki odgovor na IL-10. Na primer, pokazano je da je STAT3 jedini dovoljan da inhibira proliferaciju makrofaga nakon tretmana sa IL-10 [487]. Međutim izgleda da STAT3 nije jedini koji posreduje u inhibitornom efektu IL-10 na produkciju proinflamatornih citokina indukovanih sa LPS. Osim SATA3, IL-10 pokreće i druge signalne puteve kao što su aktivacija I $\kappa$ B kinaze (inhibitor NF- $\kappa$ B), AP-1, Bcl-2, c-fos, PI3K, S6K i MAP kinaze [479].

Iako odsustvo IL-10 vodi boljoj eliminaciji nekih patogena bez istovremenog povećanja imunopatologije [488-489], tokom drugih infekcija odsustvo IL-10 omogućava razvoj imunološkog odgovora štetnog po domaćina, pri čemu ne dolazi do promene u koncentraciji patogena [479, 490-492]. Na osnovu ovih podataka se može zaključiti da nedostatak IL-10 ne može biti uvek i potpuno kompenzovan drugim regulatornim mehanizmima, i da IL-10 ima nezamenljivu ulogu u ograničavanju inflamacijskog odgovora *in vivo*. IL-10 kontroliše više različitih stupnjeva imunskog odgovora na više različitih lokacija. Inicijalno je ovaj citokin opisan kao citokin koji proizvode Th2 limfociti [493], ali je kasnije pokazano da ga proizvode Treg [493-496]. Međutim, danas se zna da produkcija IL-10 nije isključivo u vezi sa Th2 niti sa Treg, već ovaj citokin proizvode i mnoge druge ćelije. IL-10 proizvode ćelije koje učestvuju u adaptivnom imunskom odgovoru: Th1, Th2 i Th17, Treg, CD8<sup>+</sup> T i B limfociti [479, 490, 496-498], ali i ćelije urođenog imunskog odgovora uključujući DC, makrofage, mast ćelije, NK ćelije, eozinofili i neutrofilii. Indukcija anti-inflamatornog odgovora posredstvom IL-10 odvija se preko aktivacije STAT3 [479, 499]. Ukupan efekat IL-10 na DC je inhibicija produkcije IL-12 i ekspresije kostimulatornih molekula, a samim tim i njihove alostimulatorne sposobnosti [500-501]. Sem toga, u prisustvu glukokortikosteroida, vitamina D3, prostaglandina ili IFN- $\alpha$  u ko-kokulturi DC i T limfocita povećava se procenat IL-10 proizvodeće Tr1 ćelije [479]. IL-10 inhibira i GM-CSF/IL-4 indukovanu diferencijaciju monocita u DC, pri čemu ovako diferencirane ćelije stiču morfologiju sličnu makrofagama, imaju nisku ekspresiju MHC klase II i kostimulatora, ne proizvode IL-12 i imaju pojačanu fagocitnu sposobnost [502]. Međutim, pokazano je da IL-10 ne ispoljava slične efekte na zrele moDC, kao i da bitnu ulogu u ovoj otpornosti zrelih moDC na IL-10 ima CD83. CD83 ima ulogu u inhibiciji

IL-10-posredovane ubikvitinacije MHC i CD86 molekula [503]. Takođe je pokazano da nezrele moDC i same proizvode značajnu količinu IL-10 [504], kao i da se produkcija IL-10 značajno povećava nakon stimulacije nezrelih DC LPS-om što je mehanizam kojim se sprečava prejak aktivacija DC u odsustvu patogena [505]. IL-10, delujući na DC i makrofage, inhibira razviće Th1 [479], ali takođe dovodi do inhibicije Th2 ćelija i alergijskog odgovora [478]. Osim autokrinog efekata IL-10 na DC i makrofage, Th1, Th2 i Th17 ćelije takođe proizvode ovaj citokin i tako stvaraju povratnu negativnu spregu, ograničavajući funkcije DC i makrofaga i dalju aktivaciju T limfocita. Nasuprot ovome, IL-10 indukuje Treg koje nastavljaju njegovu produkciju i na taj način se stvara pozitivna povratna sprega i održava se pul regulatornih ćelija [478, 506-507].

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI

Na osnovu dosadašnjih saznanja o osobinama i funkcijama MSC izolovanih iz različitih zdravih tkiva, uključujući i MSC iz dentalnih struktura, i nedovoljno poznate funkcije MSC u hroničnim zapaljenskim procesima postavili smo hipoteze:

1. DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC se razlikuju po fenotipskim osobinama, diferencijacionom potencijalu, imunosupresivnim i anti-inflamacijskim svojstvima.
2. PL-MSC ispoljavaju pro- i anti-inflamacijska svojstva u zavisnosti od tipa imunskih ćelija na koje deluju.
3. PL-MSC različito modulišu fenotipska svojstva i funkcije DC obrazovanih *in vitro* od monocita u zavisnosti od stepena zrelosti DC.

U cilju provere ovih hipoteza postavili smo sledeće ciljeve istraživanja:

- Izolovati, ispitati i uporediti fenotip, sposobnost za samo-obnavljanje i potencijal za diferencijaciju MSC iz dentalnog folikula i dentalne pulpe istog donora, kao i MSC izolovanih iz periapiksne lezije, u kulturi.
- Ispitati imunomodulacijske osobine DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC na *in vitro* modelu PBMC stimulisanih fitohemaglutininom.
- Ispitati ekspresiju TLR3 i TLR4 na DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC.
- Ispitati imunomodulacijske karakteristike DP-MSC i DF-MSC nakon tretmana agonistima TLR3 (polyI:C) i TLR4 (LPS) *in vitro*.
- Ispitati imunomodulacijske efekte PL-MSC na PL-IC *in vitro*.
- Ispitati *in vitro* efekte PL-MSC na proces diferencijacije DC iz monocita periferne krvi, kao i na fazu sazrevanja DC.
- Ispitati imunomodulacijski efekat DC ko-kultivisanih sa PL-MSC na polarizaciju imunskog odgovora CD4<sup>+</sup> T limfocita *in vitro*.

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

#### **3.1. IZOLACIJA TKIVA I ČELIJA**

U sprovedenim eksperimentima korišćena su tkiva poreklom od pacijenata i dobrovoljnih zdravih davaoca koji su pristali da njihov biološki materijal bude korišćen u ovim istraživanjima. Pacijenti i dobrovoljni zdravi davaoci upoznati su sa procedurama i ciljevima ovih istraživanja i nakon toga su potpisali Informisani pristanak. Za potrebe istraživanja korišćeni su organi/tkiva ili izolovane ćelije iz trećeg molara, periapeksnih lezija, kostne srži, masnog tkiva i periferne krvi.

Jedan treći molar i osam periapeksnih lezija je izolovano iz ortodontskih razloga na Klinici za Oralnu hirurgiju, Vojnomedicinske Akademije. Treći molar zdravog mladog pacijenta, koji nije imao znake sistemske bolesti, je uklonjen pre erupcije hirurškim putem. Dentalni folikul je izdvojen od mineralizovanog dela zuba i usitnjen skalpelom pod sterilnim uslovima. Nakon toga površina zuba je očišćena i isečena na spoju cementuma i enamela sterilizovanim stomatološkim instrumentima čime je omogućeno izdvajanje dentalne pulpe iz krune i korena [167].

Donori periapeksnih lezija, starosti između 22-54 godine, nisu imali znake sistemske bolesti. Dijagnoza o postojanju periapeksne lezije postavljena je na osnovu radiografskih snimaka. Periapeksne lezije su izolovane tokom hirurškog zahvata odstranjivanja apeksa, apikoektomije. U nekoliko slučajeva periapeksne lezije su izolovane nakon vađenja zuba, kiretažom periodontalnog apikalnog tkiva, ili isecanjem, korišćenjem sterilnih skalpela, periapeksne lezije čvrsto zakačene za koren zuba [508].

Jedno potkožno masno tkivo pacijenta, koji je prethodno potpisao Informisani pristanak, uzorkovano je tokom hirurške intervencije na Vojnomedicinskoj Akademiji. Ovo masno tkivo i periapeksne lezije poreklom od četiri donora su zamrznuti brzim potapanjem u tečni azot i korišćeni dalje za imunohistohemijske analize.

Kostna srž dva zdrava dobrovoljna davaoca, bez znaka sistemske bolesti, uzorkovana je aspiracijom nakon informisanog pristanka, na Klinici za hematologiju, Vojnomedicinske Akademije.

### 3.1.1. Izolacija i uspostavljanje linija MSC

U cilju izolacije MSC iz dentalne pulpe (DP-MSK), dentalnog folikula (DF-MSK) i periapexnih lezija (PL-MSK), tkivo dentalnog folikula, tkivo dentalne pulpe i periapexne lezije poreklom od tri donora su odvojeno tretirana tokom 1h rastvorom kolagenaze tip I (1mg/ml; Sigma) i DNAze (25mg/ml; Sigma) u medijumu za kultivaciju (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Sigma, Munich, Germany) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37°C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%. Dobijene suspenzije ćelija su isprane u DMEM-u. Nakon ispiranja 6000 ćelija je zasađeno po 1cm<sup>2</sup> flaskova za kultivaciju, površine 25 cm<sup>2</sup>, u DMEM-u sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (engl. fetal calf serum, FCS), 1% streptomicina, 1% penicilina i 1% gentamicina (svi kupljeni od Galenike) (DMEM/10%FCS). Neadherentne ćelije su uklonjene pri promeni medijuma za kultivaciju. Nakon dostizanja konfluentnosti od 70% površine flaska, ćelije su odlepljivane i sakupljane korišćenjem fosfatnog pufera sa dodatkom 0.2% tripsina (Sigma) i 0.02% NaEDTA (rastvor tripsina).

MSC izolovane iz kostne srži dobrovoljnih davaoca korišćene su kao pozitivna kontrola tokom karakterizacije ovih ćelijskih linija iz zuba. Mononuklearna frakcija kostne srži, izolovana je korišćenjem Lymphoprep gradijenta (Nycomed, Oslo, Norway) (postupak izolacije opisan je u narednoj sekciji), i kultivisana u DMEM-u na isti način kao i ćelije izolovane iz zuba.



### 3.1.2. Izolacija mononuklearne frakcije ćelija na gustinskom gradijentu

Mononuklearna frakcija ćelija izolovana je iz:

- aspirata ćelija kostne srži, u cilju uspostavljanja linije BM-MSK
- suspenzije ćelija nastale kolagenazno/DNAznim tretmanom periapeksnih lezija poreklom od pet donora. Na ovaj način dobijene su inflamacijske ćelije periapeksne lezije (PL-IC) koje su korišćene u ispitivanju imunomodulatornih osobina MSK.
- sloja periferne krvi (Buffy coat) koji se posle centrifuge krvi (200 x g, 10 minuta) nalazi između gornjeg sloja plazme i donjeg sloja eritrocita. Na ovaj način dobijene su mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC). Ovako dobijene ukupne PBMC su korišćene u ispitivanju imunomodulatornih osobina MSK.

Mononuklearne ćelije izolovane su prateći proceduru priloženu u uputstvu proizvođača Lymphoprep gradijenta, gustine 1.077g/ml (Nycomed, Oslo, Norway). Pre postavljanja na gradijent suspenzija ćelija je razblažena u 0.02% NaEDTA u PBSu (u razmeri 1:2 do 1:4, suspenzija: NaDTA/PBS). Najpre je 3 ml gradijenta naliveno u epruvete, nakon čega je po 7ml suspenzije naneto na površinu gradijenta, pažljivo kako bi se sprečilo mešanje suspenzije i gradijenta. Zatim je mononuklearna frakcija ćelija izdvajana centrifugiranjem na 800 x g, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Tokom centrifugiranja formiraju se slojevi ćelije koji se izdvajaju po gustini. Najpre smo odbacili gornji sloj plazme, vodeći računa da ne pomerimo sloj mononuklearnih ćelija koji se formirao na samoj površini gradijenta. Zatim je sakupljen ovaj sloj mononuklearnih ćelija, vodeći računa da se umanju aspiracija slojeva gradijenta i eritrocita koji se nalaze ispod. Sakupljene ćelije su najpre isprane 0.02% NaEDTA u PBSom centrifugiranjem na 300 x g, 10 minuta kako bi se odstranili ostaci gradijenta. Nakon odstranjivanja gradijenta, suspenzija ćelija je ispirana još četiri puta centrifugiranjem na 400 x g, 8 minuta, uz postupno povećavanje udela medijuma za kultivaciju u rastvoru za ispiranje tako da je na kraju ova ćelijska suspenzija isprana i od tragova NaEDTA.

### 3.1.3. Izdvajanje ćelija korišćenjem magnetnog sortiranja

Monociti periferne krvi (od 7 različitih donora) dobijeni su magnetnim prečišćavanjem (po proceduri koju preporučuje proizvođač proizvoda za sortiranje, Tabela 3.1.) ukupne frakcije PBMC, tako da izolovane ćelije koje se koriste u eksperimentima ostaju neobeležene (negativno sortiranje). Na ovaj način, iz ukupne frakcije PBMC dobijeni su i ukupni CD3<sup>+</sup> T limfociti (od 1 donora), kao i CD4<sup>+</sup> T limfociti (od 3 različita donora), koji su korišćeni u eksperimentima u kojima su ispitivane osobine DC dobijenih iz monocita u prisustvu ili odsustvu PL-MS. Čistoća dobijenih frakcija bila je uvek preko 90% (Prilog 1.). Korišćena procedura je uključivala nekoliko uzastopnih koraka koji su vodili sortiranju ćelija. Nakon brojanja ćelija izdvojen je odgovarajući broj ćelija na osnovu čega je izračunata zapremina antitela potreban za izolaciju. Zatim su ćelije prvo isprane u PBS-u centrifugiranjem na 300 x g, 10 minuta, i nakon toga ćelije su inkubirane 10 minuta u određenoj zapremini pufera (PBS sa dodatkom 2mM EDTA i 0.5% BSA) sa odgovarajućom koncentracijom koktela antitela konjugovanih biotinom, koji sadrži antitela specifična za sve ćelijske tipove u PBMC osim za monocite (spisak antitela je dat u Tabeli 1). Nakon isteka ove inkubacije, ćelije u supenziji su tokom 15 minuta inkubirane u prisustvu anti-biotin antitela konjugovanih sa magnetnim mikrokuglicama. Koktel koji je u ovom koraku korišćen za izolaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita sadržao je i anti-CD61 antitelo za dodatno uklanjanje trombocita. Po isteku ove inkubacije ćelije su isprane i resuspendovane u PBS/EDTA/BSA puferu, nakon čega su postavljene na kolonu za magnetno sortiranje ćelija koja je postavljena na magnet (kolone i magneti su kupljeni od Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Nakon dodatnog ispiranja kolone postavljene na magnetu, ćelije koje nisu zaostale u koloni privučene magnetom su sakupljene i isprane prvo u PBS/EDTA/BSA puferu, a zatim i u medijumu za kultivaciju, Roswell Park Memorial Institute medijumu (RPMI medijum) sa dodatkom 10% FCS, 50µM 2-merkaptetanola i 1% penicilina, 1% streptomocina i 1% gentamicina (RPMI/10%FCS).

Tabela 3.1. Proizvodi korišćeni za magnetno prečišćavanje ćelija

IZOLOVANE ĆELIJE	KOKTEL ANTITELA	NAZIV PROIZVODA	PROIZVOĐAČ
monociti	CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a	Human Monocytes Isolation Kit II	Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
CD3 <sup>+</sup> T limfociti	CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a	Pan-T cell Isolation Kit	Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
CD4 <sup>+</sup> T limfociti	CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , CD235a	CD4 <sup>+</sup> T cell Isolation Kits	Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany

#### 3.1.4. Brojanje ćelija

Ćelije dobijene na različite načine su u kulturama postavljane u određenom broju. Pre postavljanja ćelija u kulturu ćelije su isprane centrifugiranjem na 400 x g, 8 minuta u medijumu za kultivaciju, nakon čega je deo ćelija obojen 0.1% rastvorom tripan-plavog u PBS-u što je omogućilo brojanje ćelija u komori po Bürker-Türk-u na svetlosnom mikroskopu. Vijabilnim ćelijama su smatrane nebojene ćelije, dok su plavo obojene ćelije predstavljale ne-vijabilne ćelije. Nakon brojanja podešavana je zapremina ćelija potrebna za zahteve kultivacije.

### 3.2. KARAKTERIZACIJA ĆELIJA IZOLOVANIH IZ TKIVA ZDRAVOG ZUBA I PERIAPEKSNE LEZIJE

Karakterizacija ćelija izolovanih iz delova zdravog zuba i periapeksne lezije sprovedena je po kriterijumima koje je 2006. godine propisala ISCT [37]. U skladu sa ovim kriterijumima prvo je ispitivan kapacitet DP-MS, DF-MS i PL-MS za samo-obnavljanje i za formiranje CFU-F. Potom je ispitivana ekspresija određene kombinacije molekula

karakterističnih za MSC, kao i potencijal DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC za diferencijaciju u tri ćelijska tipa mezodermalnog porekla (adipocite, osteoblaste i hondroblaste) *in vitro*, kao i potencijal za formiranje mezenhimskih tkiva *in vivo*.

### 3.2.1. Potencijal za samo-obnavljanje

Potencijal za samo-obnavljanje je jedna od osnovnih karakteristika matičnih ćelija. Potencijal DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC za proliferaciju *in vitro* analizirali smo na osnovu sposobnosti ovih ćelija da formiraju CFU-F i na osnovu vremena potrebnog ovim ćelijama za dupliranje populacije (engl. population doubling time, PDT).

#### 3.2.1.1. Formiranje kolonija nalik fibroblastima

DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC između trećeg i osmog pasaža su zasejane u malom broju: 25, 50, 100 i 250 ćelija po bazenu ploče sa šest mesta ( $9.5 \text{ cm}^2$ ) u 2 ml medijuma. Ćelije su kultivisane tokom 14 dana pri čemu je dva puta nedeljno medijum menjan svežim medijumom. Nakon ovog perioda, kulture su isprane PBS-om, osušene na vazduhu, i potom obojene May-Grunwald-Giemsma (MGG) metodom. Najpre su osušeni bazeni inkubirani sa May-Grunwald bojom tokom 5 minuta. Nakon ispiranja pod mlazom vode bazeni su inkubirani tokom 20 minuta sa 1:10 rastvorom Giemsa boje u vodi i nakon toga opet isprani pod mlazom vode. Predmetno stakalce fiksirano je Kanada balzomom. Ovako obojene kulture posmatrane su na svetlosnom mikroskopu pri čemu su izbrojane CFU-F, definisane kao grupe od najmanje 50 ćelija. Procenat ćelija koji ima sposobnost formiranja kolonija izračunat je kao (broj kolonija / broj zasađenih ćelija) x 100.

#### 3.2.1.2. Vreme dupliranja populacije

DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC iz petog i osmog pasaža su zasejane  $1 \times 10^3$  ćelija po bazenu ploče sa 6 mesta u 2 ml medijuma. Ćelije su odlepljivane rastvorom tripsina nakon 3, 6, 9 i 12 dana, bojene rastvorom boje Tripan plavo i brojane na svetlosnom mikroskopu. Za svaki termin ćelije su zasejane u po dva bazena (u duplikatima). Vreme potrebno za dupliranje populacije računato je za svaki interval korišćenjem formule  $T_{1/2} = (t_i - t_{i-1}) \times \lg 2 / \lg (N_i - N_{i-1})$ .

1). U ovoj formuli  $T_{1/2}$  predstavlja vreme potrebno za dupliranje populacije.  $N_i$  i  $N_{i-1}$  predstavljaju broj ćelija sakupljenih u interval "i" i u prethodnom interval "i-1" odnosno u vremenu  $t_i$  odnosno  $t_{i-1}$ .  $N_i$  i  $N_{i-1}$  su izraženi kao srednja vrednost broja ćelija iz duplikata.

### 3.2.2. Analiza fenotipa na protočnom citofluorimetru

Na protočnom citofluorimetru analizirana je:

- ekspresija molekula ispoljenih na površini DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK nakon sakupljanja ćelija iz kultura rastvorom tripsina (spisak antitela sa podacima o specifičnosti i proizvođaču dat je u Tabeli 3.2.). Za potrebe ove analize ćelije u suspenziji su obojene kombinacijom monoklonskih antitela specifičnim za molekule karakteristične za MSK ili druge tipove ćelija, i obeleženih fluorohromima. U analizi ekspresije CD73 i STRO-1 na ovim ćelijama korišćena su primarna neobeležena monoklonska antitela, anti-CD73 i anti-STRO-1, čije je vezivanje za molekule na ćeliji detektovano naknadnom inkubacijom sa sekundarnim anti-mišijim IgG1-FITC monoklonskim antitelom (Serotec).
- ekspresija CD14, CD1a, CD86 i HLA-DR na nezrelim DC, kao i ekspresije CD83, CD86, HLA-DR, CCR7, CD40, ILT3 i ILT4 na zrelim DC dobijenim iz monocita u prisustvu ili odsustvu PL-MSK (spisak antitela sa podacima o specifičnosti i proizvođaču dat je u Tabeli 3.3.). Postavljanje graničnika za analizu ekspresije markera dato je u Prilogu 2.
- ekspresija CD25, CD39 i IL-10 na  $CD4^+$  T limfocitima koji su primarno stimulisani u ko-kulturi sa DC koje su tokom i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja bile izložene direktnom uticaju PL-MSK.

Tabela 3.2. Primarna antitela korišćena za karakterizaciju DP-MSK, DF-MSK, PL-MSK, BM-MSK.

SPECIFIČNOST ANTITELA	KONJUGAT	RAZBLAŽENJE	PROIZVOĐAČ
CD14	FITC	1:10	Immunotools, Friesoythe, Nemačka
CD45	FITC	1:10	
CD29	FITC	1:10	
CD105	FITC	1:10	
CD44	FITC	1:10	
CD19	FITC	1:10	
CD34	PE	1:10	
CD146	FITC	1:10	Serotec, Oxford, UK
CD90	FITC	1:10	
CD106	FITC	1:10	
CD56	FITC	1:10	
HLA-DR	PE	1:10	
CD73	/	1:10	SantaCruz Biotechnology
STRO-1	/	1:5-1:100	Millipore/Chemicon, Billerica, MA,USA

FITC- fluorescein izocijanat, PE- fikoeritrim. Sva antitela poreklom su iz miša.

Tokom pripreme ćelija za ovu analizu ćelije su prvo isprane u PBS-u sa dodatkom 2% FCS i 0.1% Na-azida. Nakon toga, ćelije su inkubirane u PBS/FCS/Na-azidu sa dodatkom primarnog antitela u razblaženju koje je savetovano od strane proizvođača tokom 1h na temperaturi od 48° C. U indirektnoj imunofluorescenci, nakon perioda inkubacije sa primarnim antitelom ćelije su isprane u PBS/FCS/Na-azidu, nakon čega su inkubirane sa sekundarnim antitelom tokom 15-30 min na istoj temperaturi. Na kraju inkubacije sa antitelima ćelije su isprane u PBS/Na-azidu i analizirane na citometru (Coulter XL). Tokom ove analize ekspresija markera merena je na ćelijama uokvirenim na osnovu parametara koji označavaju veličinu i granuliranost ćelija (forward scatter i side scatter).

Tabela 3.3. Primarna antitela korišćena za karakterizaciju DC protočnom citofluorimetrijom

POREKLO	SPECIFIČNOST ANTITELA	KONJUGAT	RAZBLAŽENJA	PROIZVOĐAČ
miš	CD14	FITC	1:10	Serotec, Oxford, UK
miš	CD1a	PE	1:10	
miš	HLA-DR	PE	1:10	
miš	CD86	FITC	1:20	
miš	CD83	FITC	1:10	BD Bioscience
miš	CCR7	FITC	1:10	R&D
miš	CD40	PE	1:10	BD Bioscience
miš	ILT3	PE	1:10	eBioscience
miš	ILT4	PE	1:10	eBioscience
koza	IDO-1	nk	1:20	SantaCruz Biotechnology

FITC- fluorescein izocijanat, PE- fikoeritriinom. nk-nekonjugovano

### 3.2.3. Analiza fenotipa ćelija imunocitohemijskom metodom i detekcija pojedinačnih ćelijskih tipova unutar tkiva imunohistochemijskom metodom

Za analizu rasprostranjenosti DC odnosno MSC u periapeksnoj leziji, i MSC unutar masnog tkiva, iseći tkiva (debljine 7 $\mu$ m, fiksirani u acetonu) su inkubirani sa antitelima za DC (CD209, HLA-DR) odnosno sa antitelima za MSC (CD146, STRO-1). Sva antitela su poreklom od miša i kupljena su i korišćena po protokolu Serotec, Oxford, UK.

Za potrebe analize ekspresije kombinacije markera karakterističnih za MSC, DP-MSC, DF-MSC, PL-MSC i BM-MSC su rastvorom tripsina sakupljene iz kultura i isprane u medijumu za kultivaciju. Od suspenzija ćelija su na mikroskopskim pločicama obloženim poly-L-lizinom napravljeni citospinovi (0.1-1x10<sup>4</sup> ćelija / citospinu). Primarna antitela korišćena u analizi ovih ćelija data su u Tabeli 3.2.

Potencijal DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC za hondrogenezu između ostalog analiziran je na osnovu ekspresije osteopontina. Ćelije su nakon diferencijacije u medijumu za osteogenezu sakupljene rastvorom tripsina. Od suspenzije ovih ćelija su napravljeni citospinovi koji su inkubirani sa primarnim anti-osteopontin antitelom (Dako).

Struktura proteina ćelija na citospinovima fiksirana je inkubacijom uzoraka u 2% rastvoru pararozanilina tokom 2 min na sobnoj temperaturi nakon čega su uzorci ispirani u PBS-u 10 minuta.

U prvom koraku je, inkubacijom citospinova (DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC pre osteogeneze i nakon završetka procesa osteogene indukcije; BM-MSC) i pločica sa presecima tkiva (periapekse lezije i masnog tkiva) u 0.5% rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tokom 10 minuta, blokirana aktivnost endogene peroksidaze u ćelijama. Nakon ovog i svakog sledećeg koraka uzorci su ispirani u fiziološkom rastvoru sa dodatkom tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS, Sigma), 0.5% goveđeg albumina (Sigma), 0.05% Tween-20 (Sigma) (rastvor TBS-a) tokom 5 minuta. Tokom narednih 20 minuta ćelije su izložene kozijem serumu (razblaženom 1:2 u PBS-u, Dako) da bi se sprečilo nespecifično vezivanje sekundarnog antitela koje se koristi za detekciju primarnog antitela u ovoj



metodi. Nakon ovih koraka preduzetih u cilju sprečavanja nespecifične reakcije, i nakon ispiranja, citospinovi su inkubirani tokom 1h u rastvoru TBS-a sa dodatkom odgovarajućeg primarnog antitela (korišćena antitela navedena su gore u ovoj sekciji). Sva antitela korišćena su u razblaženju savetovanom od strane proizvođača. U cilju kontrole metode citospinovi napravljeni od pojedinačnih tipova ćelija su takođe inkubirani sa irelevantnim antitelima ili samo sa PBS-om. Specifično vezivanje primarnih antitela za molekule na ćelijama i u citoplazmi detektovano je korišćenjem EnVision kita (Dako) po uputstvu proizvođača. Citospinovi su nakon ispiranja od ostataka rastvora primarnog antitela inkubirani tokom 30 min u rastvoru TBS-a sa dodatkom sekundarnog antitela koje je konjugovano polimerom horseradish peroksidaze (HRP) (po uputstvu za korišćenje EnVision kita). Nakon ispiranja, za uočavanje pozitivne reakcije korišćen je rastvor hromogena 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (po uputstvu za korišćenje EnVision kita). Na kraju jedra ćelija kontrastirana su hematoksilinom što je omogućilo preciznije razlikovanje ćelija. ekspresija molekula na ćelijama analizirana je na svetlosnom mikroskopu (Olympus IX51) sa kamerom (Nikon DXM1200C Microscope Camera).

Tabela 3.4. Primarna antitela korišćena za analizu lokalizacije DC u periapexnoj leziji imunohistohemijskim metodama

POREKLO	SPECIFIČNOST	KONJUGAT	RAZBLAŽENJA	PROIZVOĐAČ
miš	HLA-DR	PE	1:10	Serotec, Oxford, UK
miš	CD83	Alexa 488	1:10	Biologend
miš	CD11c	Alexa 488	1:10	Biologend
miš	CD209	biotin	1:10	Serotec
zec	S100	nk	1:400	Thermo Scientific

FITC- fluorescein izocijanat, PE- fikoeritriinom. nk-nekonjugovano

### 3.2.4. Detekcija ko-lokalizacije DC i MSC unutar periapeksne lezije

U cilju lokalizacije MSC i DC unutar periapeksnih lezija kao i interakcije između ova dva tipa ćelija, periapeksne lezije, izolovane i zamrznute u tečnom azotu (detalji su opisani u poglavlju 3.1. *Izolacija tkiva*), su isečeni na debljinu od 7  $\mu\text{m}$  korišćenjem kriomikrotona. Struktura tkiva na isečcima je fiksirana inkubacijom uzoraka u hladnom acetonu nakon čega su uzorci isprani u TBS-u. U sledećem koraku uzorci su inkubirani sa primarnim antitelima (spisak korišćenih antitela, sa podacima o specifičnosti i proizvođaču priložen je u Tabeli 3.2. i Tabeli 3.4.) specifičnim za DC (CD11c, CD83, CD209, S100, HLA-DR) ili MSC (STRO-1, CD146) ili kombinacijom antitela (CD11c/STRO-1; CD83/STRO-1; S100/CD146; HLA-DR/CD146; CD209/CD146). Nakon inkubacije preseka sa anti-CD209-biotinom preseci su isprani i inkubirani sa streptavidin-Alexa 546 tokom 15 min. Nakon inkubacije preseka sa anti-S100 preseci su isprani i inkubirani sa donkey anti-rabbit IgG-biotin (Thermo Scientific) 30 min, nakon toga isprani i inkubirani dodatnih 15 min sa streptavidin-Alexa 546 tokom. Preseci inkubirani sa STRO-1 su isprani, inkubirani tokom 30 min sa donkey anti-mouse IgG-Alexa 546. Na kraju svi preseci su isprani u PBS i analizirani na konfokalnom mikroskopu.

### 3.2.5. Sposobnost diferencijacije MSC u ćelijske tipove mezenhinskog porekla *in vitro*

Najznačajnija osobina matičnih ćelija je njihova sposobnost za diferencijaciju, i matične ćelije različitog porekla i na različitom tupu diferenciranosti se ključno razlikuju po ovoj osobini. Mezenhimske matične ćelije svoj naziv su dobile po osobini da se diferenciraju u ćelijske tipove mezenhinskog porekla: adipocite, hondroblasti i osteocite. Potencijal ćelija izolovanih iz delova zdravog zuba kao i ćelija izolovanih iz periapeksnih lezija ispitivali smo *in vitro* i *in vivo* sistemu.

**Adipogeneza.**  $2.5 \times 10^4$  DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC je zasađeno na presterilisane pokrovne ploče postavljene u bazene ploče sa 24 mesta ( $1.9\text{cm}^2$ ) sa 1 ml medijuma za kultivaciju mesenhimskih matičnih ćelija (engl. mesenchymal stem cell growth medium,

MSCG medijum; Lonza, Basel, Switzerland) na 37° C, u uslovima 5% zasićenosti atmosfere sa CO<sub>2</sub>. Čelije su kultivisane do uvećanja broja ćelija koji zauzima 100% površine bazena (2-3 dana). Nakon toga MSCG medijum je zamenjen medijumom za indukciju adipogeneze (engl. adipogenic induction medium, Lonza) i kultivacija je nastavljena tokom 3-4 dana. Medijum za indukciju je zamenjen medijumom za održavanje adipogeneze (engl. adipogenic maintenance medium, Lonza) u kome su ćelije inkubirane narednih 1-3 dana. Proces diferencijacije ćelija u adipocite trajao je 17-25 dana i tokom tog perioda ponavljani su ciklusi indukcije i održavanja adipogeneze. Na kraju ove procedure, diferencijacija ćelija u adipocite u vidu pojave masnih kapi unutar ćelija, detektovana je bojenjem kultura Oil Red O bojom (Sigma). Pokrovne ploče na kojima su kultivisane ćelije su isprane PBS-om, momentalno osušene vakum pumpom, i tretirane 60% rastvorom izopropil alkohola tokom 1 minuta. Nakon toga ćelije su inkubirane tokom 15 minuta u rastvoru Oil Red O boje i zatim analizirane na svetlosnom mikroskopu.

**Hondrogeneza.** DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC su sakupljene rastvorom tripsina, dva puta isprane, i resuspendovane u nekompletnom hondrogenom medijumu (engl. incomplete chondrogenic medium, Lonza). Suspenzija ćelija stavljena je u sterilne polipropilenske tube za koje ove ćelije ne adheriraju čime je omogućena njihova kultivaciju u vidu peleta. Nakon što su ćelije centrifugirane na 150 x g tokom 5 minuta, pažljivo je uklonjen supernatant i ćelije su izvorteksovane. Zatim su ćelije resuspendovane u kompletnom hondrogenom medijumu koji je napravljen dodavanjem 10ng/ml TGF-β3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) u MSCG medijum, centrifugirane na 150g tokom 5 minuta i kultivisane narednih 14-28 dana u vidu peleta. Medijum je menjan svežim medijumom dva puta nedeljno. Kontrolne ćelije su kultivisane na isti način ali samo u MSCG medijumu. Nakon završetka procedure peleti su uronjeni u medijum za smrzavanje (embedding medium, Bio-Optica) i zamrznuti u tečnom azotu. Za potrebe analize na svetlosnom mikroskopu, zamrznuti peleti su isečeni na debljinu od 7 μm korišćenjem kriomikrotona (Leica Cryocut 1850) i obojeni rastvorom Alcian blue boje koja boji glikozaminoglikane, sastojak ekstraćelijskog matriksa koji proizvode hondroblasti.

**Osteogeneza.**  $3 \times 10^3$  DP-MS, DF-MS i PL-MS je zasađeno po bazenu ploče sa 24 mesta ( $1.9\text{cm}^2$ ) u 1 ml MSCG medijuma na  $37^\circ\text{C}$ , u uslovima 5% zasićenosti atmosfere sa  $\text{CO}_2$ . Nakon 24h MSCG medijum je zamenjen medijumom za indukciju osteogeneze (osteogenic induction medium, Lonza) i kultivacija je nastavljena tokom 3-4 nedelje. Medijum je menjan svežim medijumom dva puta nedeljno. Kontrolne ćelije su kultivisane na isti način ali samo u MSCG medijumu. Za analizu formiranja mineralizovanih nodula ćelije u kulturi su obojene 1% rastvorom Alizarin Red boje (Sigma) u destilovanoj vodi. Veličina mineralizovanih nodula i procenat obojene površine u odnosu na totalnu površinu analizirana je na svetlosnom mikroskopu najmanje na 10 različitih vidnih polja. Podaci su obrađeni korišćenjem NIS-element D 2.30 softvera. Pored toga, ćelije su sakupljene rastvorom tripsina, isprane u medijumu i od njih su napravljeni citospinovi. Na citospinovima, stepen diferencijacije ćelija u osteoblaste analiziran je na osnovu aktivnosti alkalne fosfataze u ovim ćelijama. Procedura za detekciju aktivnosti ovog enzima uključivala je inkubaciju citospinova tokom 1h u rastvoru pufera za inkubaciju napravljenog od 1mg/ml Fast Red (Sigma), ravnomerne (1:1) smeše naftol-dimetil formamida (10mg/ml, Sigma) i TRIS-a ( $\text{pH}=8.3$ , Sigma) na temperaturi od  $37^\circ\text{C}$ , u uslovima 5% zasićenosti atmosfere sa  $\text{CO}_2$ . Pored toga analizirana je i ekspresija osteopontina na ovim ćelijama po proceduri opisanoj u odeljku 3.2.3.).

### 3.2.6. Transplantacija MS u ksenogenog domaćina

Eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog Komiteta Vojnomedicinske Akademije (EEC Direktiva 1986/86/609 EEC).  $5 \times 10^5$  DP-MS, DF-MS i PL-MS je primenjeno subkutano iza uha BALB-c miševima starosti 1 dan. Nakon 18 dana životinje su žrtvovane etrom i mesta implantacije su izolovana. Uzorci su fiksirani u 3% rastvoru gluteraldehida tokom 3h nakon čega su demineralizovani tokom 7 dana u 13% rastvoru EDTA ( $\text{pH}=7$ ) sa dodatkom 1% rastvora gluteraldehida. Nakon ove procedure uzorci su impregnirani u parafinu. U pripremi za analizu uzorci u parafinu su isečeni na debljinu od  $8\mu\text{m}$  i deparafinizovani. Deparafinizacija je sprovedena po standardnoj proceduri po kojoj se uzorci u prvom koraku inkubiraju u ksilolu, zatim u ravnomernom rastvoru ksilola i 100% etanola, nakon čega slede koraci u kojima se uzorci

inkubirani u opadajućim razblaženjima etanola (100%-50%). Procedura deparifinizacije se završava ispiranjem uzoraka u vodi. Ovako pripremljeni uzorci bojeni su trobojnom metodom po Masonu (engl. Masson's trichrome stain) i hematoksilin/eosin bojenjem i analizirani na svetlosnom mikroskopu

**Trobojna metoda po Masonu.** Po ovoj metodi uzorci su prvo inkubirani u Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Rastvoru (90ml 1% Biebrich scarlet, 10 ml 1% Acid fuchsin, 1 ml glacijalna sirćetna kiselina) tokom 15 minuta. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi uzorci su tokom 15 minuta inkubirani u ravnomernom rastvoru 5% fosfomolibdenske i 5% fosfotungstičke kiseline, i zatim bez ispiranja inkubirani u rastvoru Anilin blue boje (2.5g Anilin blue, 2ml glacijalne sirćetne kiseline, 100ml destilovane vode) 5-10 minuta. Obojeni uzorci su diferencirani u 1% rastvoru sirćetne kiseline (1ml glacijalne sirćetne kiseline, 99ml destilovane vode) tokom 1-2 minuta, zatim veoma brzo osušeni u 95% alkoholu i na kraju očišćeni u ksilenu. Ova metoda omogućava razlikovanje kolagenskih vlakana (plavo) i mišića, citoplazme ćelija i keratina (crveno).

**Hematoksil-eozin bojenje.** Po ovoj jednostavnoj i brznoj proceduri za analizu tkiva, uzorci su 5 minuta inkubirani u hematoksilinu (Lillie Mayer's alum hematoksilin), nakon toga isprani pod mlazom tekuće vode. Tokom naredna 2 minuta uzorci su inkubirani u eozinu i višak boje ispran je tekućom vodom. Ova metoda omogućava razlikovanje kolagenskih vlakana (svetlo roze), mišića (tamno roze), citoplazme ćelija (crveno) i jedra (plavo).

### **3.3. ISPITIVANJE IMUNOMODULACIJSKE SPOSOBNOSTI DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC**

Da bi smo ispitali da li MSC iz zuba i periapeksne lezije poseduju imunomodulatorne sposobnosti i kakvog je kvaliteta ova osobina kod MSC različitog porekla, analizirali smo efekat ovih ćelija na ćelije imunskog sistema sa kojima su ko-kultivisane u određenim uslovima. Ko-kulture i kulture uvek su inkubirane u uslovima vlažne atmosfere, na temperaturi od 37° C, u uslovima 5% zasićenosti atmosfere sa CO<sub>2</sub>.

### 3.3.1. Kulture DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC sa mononuklearima periferne krvi

$1 \times 10^4$  DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC je zasaden po bazenu ploče sa 96 mesta sa ravnim dnom u 200 $\mu$ l RPMI/10%FCS, i narednih 6h ćelije su inkubirane da adheriraju. Deo kultura DP-MSC i DF-MSC, tokom narednih 24h, tretiran je medijumom sa dodatkom 25 mg/mL poly(I:C) (Sigma) ili 200 ng/mL LPS (Sigma). Deo kultura DP-MSC i DF-MSC koje su predstavljale kontrolu, kao i sve kulture PL-MSC nisu dalje tretirane. Sve kulture DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC su isprane dva puta PBS-om sa dodatkom 2% FCS, i nakon toga, tokom 30 minuta, tretirane mitomicinom C (Bristol Caribbean) u koncentraciji 25mg/ml da bi se sprečila proliferacija ovih ćelija u ko-kulturama. Nakon ovog tretmana kulture MSC su isprane četiri puta u PBS/FCS.

Ovim kulturama, u kojima su DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC čvrsto adherirale, dodate su PBMC ( $1 \times 10^5$  po bazenu), koje su prethodno sveže izolovane i u suspenziji stimulisane fitohemaglutininom (PHA, Serva) u koncentraciji 250ng/ml. PHA-stimulisane PBMC su kultivisane i u bazenima bez MSC i rezultati ovih kultura korišćeni su kao kontrola, i upoređivani su sa rezultatima dobijenim u ko-kulturama PBMC i MSC. Efekat TLR agonista na imunomodulatorne karakteristike MSC iz zdravog zuba analiziran je upoređivanjem rezultata dobijenih u ko-kulturama sa kontrolnim, netretiranim DP-MSC i DF-MSC i onih dobijenih u ko-kulturama sa DP-MSC i DF-MSC pre-tretiranim TLR agonistima. Svaki uzorak je ispitivan najmanje u četvoroplikatu, a eksperimenti su ponovljeni najmanje 3 puta, sa različitim donorima PBMC (u eksperimentima sa DP-MSC i DF-MSC), odnosno sa različitim parovima donora PL-MSC/PBMC.

Ko-kulture sa PL-MSC i kontrolne kulture su postavljene paralelno za analizu proliferacije i za analizu produkcije citokina. U ovim uzorcima merena je koncentracija IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-17, IL-10, TGF-b. U kulturama samih DP-MSC i DF-MSC pre i nakon tretmana TLR agonistima tokom 24 h merena je koncentracija TGF- $\beta$  i IL-6. Kulture i ko-kulture postavljene za analizu citokina, poslednjih 8h su tretirane forbol miristat acetatom (engl. phorbol myristate acetate, PMA) u koncentraciji 20ng/ml (Sigma) i 1 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> jonoforom

(A23187, Sigma) (PMA/Ca<sup>2+</sup> jonofor), nakon čega su sakupljeni supernatanti. Ovaj tretman ćelija u kulturi dovodi do otpuštanja sintetisanih citokina u medijum što omogućava merenje nivoa njihove produkcije od strane ćelija u kulturi.

Rezultati eksperimenata u kojima je meren efekat DP-MSC i DF-MSC na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMC su iskazani kao srednja vrednost relativne proliferacije sa standardnom greškom i prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimentu. Rezultati eksperimenata sa PL-MSC su prikazani kao indeks proliferacije sa standardnom greškom izračunat iz relativne proliferacije izmerene u svim ponovljenim eksperimentima sa različitim donorima PL-MSC/PK-MSC. Relativna proliferacija PBMC u ko-kulturama sa MSC izračunata je u odnosu na proliferaciju kontrolnih samih PHA-stimuliranih PBMC u kulturi.

U eksperimentima u kojima se ispitivala uloga TGF- $\beta$  kao posrednika u efektima koje DP-MSC i DF-MSC pokazuju na proliferaciju PBMC, ko-kulturama je dodato neutralizirajuće anti-TGF- $\beta$  antitelo (R&D Systems). Uloga TGF- $\beta$  je analizirana upoređivanjem rezultata dobijenih u ovim ko-kulturama i kulturama samih PHA-stimuliranih PBMC koje su tretirane na isti način neutralizirajućim antitelom. Neutralizirajući kapacitet ovog anti-TGF- $\beta$  antitela potvrđen je dodavanjem ovog antitela kulturama samih PHA-stimuliranih PBMC koje su istovremeno tretirane TGF- $\beta$  citokinom u koncentraciji 1ng/ml (R&D Systems).

### 3.3.2. Kulture PL-MSC sa inflamacijskim ćelijama periapeksne lezije

U cilju ispitivanja efekta PL-MSC na produkciju citokina od strane alogenih PL-IC, ove ćelije su ko-kultivisane u sistemu kultivacije u kom je omogućen kontakt (direktna ko-kultivacija) između ćelija i u sistemu u kome je sprečen kontakt između PL-MSC i PL-IC (Transwell sistem).

U sistemu direktne ko-kultivacije u ploči sa 96 mesta, 1x10<sup>5</sup>/bazenu PL-IC je ko-kultivisano sa 1x10<sup>4</sup>/bazenu alogenih PL-MSC uz dodatak 1 $\mu$ M PMA/Ca<sup>2+</sup> jonofora tokom 24h. Pored ko-kultura, postavljene su odvojene kulture samih PL-MSC i PL-IC u istom broju i na isti način tretiranih kao u ko-kulturi. Nivo citokina produkovanih u ko-kulturama

PL-MSC/PL-IC upoređivan je sa zbirom citokina produkovanih u odvojenim kontrolnim kulturama PL-MSC odnosno PL-IC. Svaka kultur/ko-kultura postavljena je u duplikatu, a eksperiment je ponovljen 5 puta sa različitim parovima donora PL-MSC/PL-IC. Rezultati citokina su prikazani kao srednja vrednost koncentracije sa standardnom devijacijom izračunate iz vrednosti za produkciju citokina u različitim eksperimentima.

Da bi smo ispitali da li PL-MSC mogu da ispolje imunomodulatorni efekat na produkciju citokina od strane PL-IC i bez direktnog kontakta sa ovim ćelijama, ćelije su ko-kultivisane u sistemu u kome je sprečen kontakt između ćelija zasađenih u različitim odeljcima.  $5 \times 10^4$ /odeljku PL-MSC je zasađeno u gornji odeljak sa porama prečnika  $0.4 \mu\text{m}$  (BD Falcon, Heidelberg, Germany), a  $5 \times 10^5$ /bazenu alogenih PL-IC je zasađeno u donji odeljak u ploči sa 24 mesta. Kao kontrola same PL-IC su kultivisane u bazenima sa 24h bez odeljaka. Nakon 24h ko-kulture odeljci sa PL-MSC su izvađeni, a PL-IC koje su ostale u bazenima kao i kontrolne PL-IC su isprane i zatim stimulisane PMA/ $\text{Ca}^{2+}$  jonoforom tokom narednih 24h. Nakon ovog vremena sakupljeni su supernatanti za analizu citokina. Svaka kultur/ko-kultura postavljena je u duplikatu, a eksperiment je ponovljen 5 puta sa različitim parovima donora PL-MSC/PL-IC.

### 3.3.3. Efekat PL-MSC na proces dobijanja dendritskih ćelija *in vitro*

Monociti ( $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) izolovani iz periferne krvi dobrovoljnih davaoca kultivisani su sami ili na sloju PL-MSC ( $0.5 \times 10^5/\text{ml}$ ) koje su 4h pre ko-kultivacije postavljene da adheriraju u bazinima ploče sa 6 mesta u 2ml RPMI/10%FCS sa dodatkom L-glutamina. Diferencijacija DC iz monocita indukovana je dodatkom 100ng/ml GM-CSF (Leucomax, specifične aktivnosti  $4.44 \times 10^6$  UI) i 20ng/ml IL-4 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemačka) u medijum za kultivaciju. Ove kulture / ko-kulture inkubirane su 6 dana u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od  $37^\circ \text{C}$ , u uslovima 5% zasićenosti atmosfere sa  $\text{CO}_2$ . U eksperimentima u kojima je ispitivan mehanizam delovanja PL-MSC na diferencijaciju monocita do nezrelih DC, monociti su kultivisani u medijumu koji je bio napravljen od 50% RPMI/10%FCS i 50% medijuma koji je sakupljen posle kultivacije samih  $1 \times 10^5$  PL-MSC u toku 72h u RPMI/10%FCS (kondicionirani medijum). Takođe, u



cilju ispitivanja uloge IL-6 u efektu koji PL-MSC ispoljavaju na diferencijaciju DC pri direktnoj ko-kultivaciji ili samo putem delovanja solubilnih molekula, neutralizirajuće antitelo (2 $\mu$ g/ml anti-IL-6 antitelo, R&D) dodato je u ko-kulture i u kulture monocita u kondicioniranom medijumu. Neutralizirajući efekat anti-IL-6 antitela proveren je u kulturama monocita kojima je dodato i 10ng/ml rekombinantnog IL-6 (R&D) i 2 $\mu$ g/ml ovog antitela. Nakon isteka ko-kultura/kultura ćelije su sakupljene ponovljenim blagim pipetiranjem. Ćelije su na protočnom citofluorimetru testirane na prisustvo PL-MSC ispitivanjem ekspresije CD146 molekula. Nakon što je utvrđeno da PL-MSC nisu prisutne u ovim suspenzijama, na delu sakupljenih ćelija (iz svih postavljenih kultura i ko-kultura) je na citofluorimetru analizirana ekspresija markera CD14, CD1a, HLA-DR i CD86 (odjeljak 3.2.2., Tabela 3.3.). Iz drugog dela ćelija sakupljenih iz kulture samih kontrolnih nezrelih DC i direktnih ko-kultura (bez anti-IL-6) po  $5 \times 10^5$ /ml ćelija je postavljen u nove bazene bez PL-MSC i u bazene sa slojem formiranim od  $0.5 \times 10^5$ /ml PL-MSC. Sazrevanje ovih ćelija indukovano je tokom 2 dana koktelom pro-inflamacijskih citokina (10 ng/ml TNF- $\alpha$  (R&D), 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (R&D), 10 ng/ml IL-6 (R&D) i 1 $\mu$ g/ml PGE2 (Sigma)) ili dodatkom 100 ng/ml LPS-a (Sigma) [509]. Kontrolne zrele DC su diferencirane, i njihovo sazrevanje je indukovano, u odsustvu PL-MSC. Kao dodatna kontrola korišćene su kontrolne nezrele DC koje su nakon diferencijacije kultivisane dodatna dva dana ali bez stimulusa za sazrevanje. Svaka linija PL-MSC (od različitih donora) ko-kultivisana je u duplikatima i to sa monocitima/DC od najmanje tri različita donora. Na DC sakupljenim nakon procesa sazrevanja u prisustvu ili bez PL-MSC kao i na DC iz dodatnih kontrolnih kultura analizirana je na protočnom citofluorimetru ekspresija markera karakterističnih za zrele DC: CD86, CD83, HLA-DR, CCR7 i CD40 (odjeljak 3.2.2., Tabela 3.3.). Samo na DC koje su i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja bile kultivisane sa PL-MSC dodatno je analizirana ekspresijaIDO-1, ILT4 i ILT3 (odjeljak 3.3.7., Tabela 3.3.). Nakon faze sazrevanja iz kultura zrelih DC koje nikada nisu dovedene u kontakt sa PL-MSC, iz kultura DC koje su tokom čitavog procesa dobijanja iz monocita bile izložene direktnom uticaju PL-MSC i iz kultura DC koje su samo tokom faze sazrevanja dovedene u direktan kontakt sa PL-MSC sakupljeni su supernatanti u kojima je analiziran nivo produkovanih IL-27, IL-12, IL-23 i IL-10 (odjeljak 3.3.6.). Nivo ovih citokina analiziran je i u

supernatantima sakupljenim iz sedmodnevnih kultura PL-MSC koje su 5 dana kultivisane same u prisustvu GM-CSF i IL-4, a zatim su dodatna dva dana kultivisane same u prisustvu pro-inflamacijskog koktela.

#### 3.3.4. Mešana leukocitna reakcija

Alostimulatorna sposobnost DC sakupljenih nakon faze sazrevanja sa ili bez PL-MSC, ispitivana je u mešanoj leukocitnoj reakciji (MLR) sa alogenim CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Za potrebe ovog testa, ko-kultivisano je  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocitima sa različitim brojem DC ( $1 \times 10^4$ ,  $0.5 \times 10^4$ ,  $0.25 \times 10^4$ ,  $0.125 \times 10^4$ ,  $0.062 \times 10^4$ ,  $0.031 \times 10^4$ ) u 200  $\mu$ l RPMI/10% FCS medijuma / po bazenu ploče sa 96 mesta u inkubatoru. Nakon 5 dana ko-kultivacije merena je proliferacija (odjeljak 3.3.5.).

U eksperimentima u kojima je ispitivan mehanizam imunosupresivnog efekta DC koje su tokom čitavog procesa dobijanja iz monocita bile izložene direktnom uticaju PL-MSC,  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita ko-kultivisano je sa  $1 \times 10^3$  ovih ili kontrolnih zrelih DC tokom 3 dana. U neke od ovih ko-kultura dodata su neutralizirajuća antitela za ILT3 (2  $\mu$ g/ml anti-ILT3-antitela, R&D), ili za ILT4 (2  $\mu$ g/ml anti-ILT3-antitela, R&D) ili 20mM inhibitoraIDO-1 enzima, 1-metil-L-triptofana (Sigma), ili antitela i inhibitor istovremeno. Nakon trećeg dana, iz ovih ko-kultura magnetnim prečišćavanjem izdvajani su CD4<sup>+</sup> T limfociti, i deo ovako prečišćeni limfocita kultivisan je naredna dva dana u prisustvu 2ng/ml IL-2 (R&D).

Na delu ovako tretiranih CD4<sup>+</sup> T limfocitima analizirana je ekspresija CD25, CD39 (odjeljak 3.2.2.), a u njihovoj citoplazmi nakon permeabilizacije analizirana je ekspresija Foxp3 i IL-10 (odjeljak 3.3.7.). CD4<sup>+</sup> T limfociti u kojima je detektovana intracelularna ekspresija IL-10 su prethodno tretirani monenzinom u koncentraciji od 6mM (eBioscience).

U testu supresije analiziran je supresivni potencijal, IL-2-stimulisanih CD4<sup>+</sup> T limfocitima, prečišćenih iz ko-kultura sa DC. Za potrebe ove analize,  $0.75 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita iz ovih ko-kultura su, tokom 3 dana, ko-kultivisani sa CD3<sup>+</sup> T limfocitima u odnosu 1:1 u bazenima ploče sa 96 mesta, koji su prethodno obloženi preko noći CD3 antitelom

(10µg/ml, eBioscience), i dodatkom solubilnog 2ng/ml CD28 antitela (eBioscience). Kulture posebno kultivisanih limfocita, kao i ko-kultura CD4<sup>+</sup> T limfocita koji nisu prethodno ko-kultivisani sa DC i CD3<sup>+</sup> T limfocita, u ovim uslovima kultivacije predstavljali su kontrole.

Deo CD4<sup>+</sup> T limfocitima je nakon 3 dana ko-kulture sa kontrolnim zreim DC ili sa DC dobijenim u prisustvu PL-MSK, sekundarno stimulisan ko-kultivacijom sa zreim kontrolnim DC tokom 5 dana (sekundarna MLR) nakon čega je meren proliferativni odgovor ovih ćelija (odjeljak 3.3.5.).

Sve ko-kulture CD4<sup>+</sup> T limfocita i DC postavljene su u duplikatu, za merenje proliferativnog odgovora i za merenje nivoa produkovanih citokina (odjeljak 3.3.6.). U ko-kulture postavljene za anлізу citokina tokom poslednjih 8h dodati su PMA/Ca<sup>2+</sup> jonofor.

### 3.3.5. Proliferativni odgovor ćelija

Proliferativni odgovor ćelija merena je na osnovu ugrađivanja timidina obeleženog radioaktivnim <sup>3</sup>H u novosintetisanu DNK ispitivanih ćelija. Svim kulturama/ko-kulturama je 18h pre isteka trećeg dana kultivacije dodat 1 µCi <sup>3</sup>H timidina po bazenu (6.7 Ci/mmol; Amersham Biosciences). Po isteku inkubacije, DNK ćelija iz kulture je sakupljan na filtere od staklenih vlakana pomoću poluautomatskog sakupljača ćelija (Titertek Cell Harvester, Norveška). Filteri su osušeni i nakon toga stavljeni u bočice za merenje radiaktivnosti sa po 3 ml scintilacione tečnosti (rastvor 4 g PPO (2,5-difeniloksazol, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO) i 0,1 g POPOP (1,4-di-(5-fenil-2-oksazolil)-benzen, C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O) u 1 L toluola) (hemikalije i bočice, NEN, SAD). Nivo radioaktivnosti je meren u scintilacionom beta brojaču (Beckman; LS5000TB).

### 3.3.6. Određivanje nivoa produkovanih citokina u kulturama i ko-kulturama ćelija

Produkcija citokina u supernatantima ćelijskih kultura određivana je ELISA metodom (engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). U ovim analizama korišćeni su komercijalni kitovi za određivanje koncentracije citokina: IL-2, IFN-γ, IL-5, IL-17, IL-10,

TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, i TNF- $\alpha$  (svi kupljeni od R&D Systems, Wiesbaden, Germany). Svi supernatanti su nakon sakupljanja odvojeni od ćelija centrifugiranjem na 12000g, 5min i potom smrznuti na -20° C. Izvođenje ELISA metode urađeno je sa reagensima i prema protokolu obezbeđenom od strane proizvođača. Ukratko, protokol se sastojao od oblaganja bazena ploče od 96 mesta sa ravnim dnom (Costar, Sigma) mišijim monoklonskim antitelima specifičnim za određeni citokin preko noći na sobnoj temperaturi, ispiranja svakog bazena rastvorom za ispiranje (0.05% Tween u K-PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2-7.4)), blokiranjem antitela tokom 1h sa 1% rastvorom serumskog albumina govečeta (bovin serum albumin, BSA) u K-BSA, ispiranja (Tween/K-PBS), inkubacije tokom 2h uzoraka sakupljenih u eksperimentima i uzoraka sa poznatom dvostruko opadajućom koncentracijom citokina koji su obezbeđeni od strane proizvođača, ispiranjem (Tween/K-PBS), inkubacije tokom 1h sa kozijim monoklonskim antitelom koje je konjugovano sa biotinom i specifično je za određeni citokin, ispiranja (Tween/K-PBS), inkubacije sa rastvorom Streptavidin-HRP enzima tokom 20 minuta, ispiranja (Tween/K-PBS), inkubacije sa supstratom (1:1 mešavina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tetrametilbenzidina) najviše 20 minuta i zaustavljanja reakcije dodavanjem 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apsorbanca je očitavana na spektrofotometru (Behring ELISA Processor II) korišćenjem filtera 450nm i korekcijom talasne dužine oduzimanjem apsorbance izmerene na filteru 570nm. Količina citokina (u pg/ml) je određivana u odnosu na standardnu krivu napravljenu na osnovu vrednosti izmerenih u uzorcima sa standardizovanim dvostruko opadajućim koncentracijama citokina, korišćenjem TableCurve 2D softvera.

### 3.3.7. Analiza ekspresije IDO-1, Foxp3 i IL-10

Ekspresija indolamin-2,3-dioksigenaze-1 (IDO-1) je merena na DP-MSc i DF-MSc tretiranim TLR agonistima i na kontrolnim, netretiranim DC. Pored MSc, ekspresija IDO-1 analizirana je kod DC dobijenih iz monocita u prisustvu ili odsustvu PL-MSc. U cilju detekcije IDO-1 enzima ove ćelije su inkubirane sa kozijim anti-IDO-1 poliklonskim antitelom (Santa Cruz Biotechnology). Ekspresija Foxp3 i IL-10 merena je kod CD4<sup>+</sup> T limfocita (Prilog 3.) koji su predhodno tokom tri dana stimulisani kontrolnim zrelim DC ili DC dobijenim u prisustvu PL-MSc, nakon čega su prečišćeni magnetnim sortiranjem i dva

dana stimulisanai IL-2. U ovoj analizi korišćeni su mišije anti-Foxp3-FITC antitelo (eBioscience) i mišije anti-IL-10-FITC antitelo (eBioscience). Čelije su najpre sakupljene, isprane u RPMI/10%FCS medijumu i izbrojane u rastvoru tripan-plavog. Zatim, prateći uputstvo proizvođača kita za detekciju intracelularnih molekula (Fix&Perm Permeabilization Kit, Caltag Laboratories), ćelije su permeabilizovane i fiksirane inkubacijom u Fix/Perm medijumu A. Nakon ispranja u PBS-u, ćelije u supenziji su inkubirane 3 minuta u PBS-u sa dodatkom 5% inaktiviranog seruma magarca i potom je inkubacija nastavljena u rastvoru Fix/Perm medijumu B sa dodatkom do završetka 20. minuta. Kao kontrola ćelije su inkubirane sa izotipskim antitelom umesto kozijeg anti-IDO-1 antitela. Po isteku ove inkubacije ćelije su isprane u PBS/Na-azidu i inkubirane tokom 15 minuta u rastvoru anti-kozijeg IgG antitela proizvedenog u magarcu i konjugovanog biotinom (Serotec). Nakon ispiranja ćelije su inkubirane 15 minuta u medijumu B sa dodatkom Streptavidin-PE (Serotec) i analizirane na protočnom fluorocitometru. Ekspresija IDO-1 detektovana je na permeabilizovanim ćelijama koje su u analizi izdvojene na osnovu ekspresije CD105-FITC.

### 3.3.8. Izolacija RNK

Da bi smo u DP-MSK i DF-MSK izmerili nivo ekspresije iRNK za TLR3 i TLR4, sakupili smo ćelije rastvorom tripsina i isprali ih u PBS-u. Pelet ćelija resuspendovan je u puferu koji permeabilizuje ćelije i čuva RNK od dejstva RNKaze. Nakon ovoga ćelije su zamrznute na temperaturi od  $-70^{\circ}$  C do analize. Nakon odmrzavanja ćelijske membrane i organele lizirane su dodavanjem pufera koji sadrži guanidin izotiocijanat, so koja dovodi do snažne denaturacije RNKze i sprečava oštećenje RNK (RLT pufer, RNeasy kit, Qiagen). U nastavku, izolacija ukupne RNK je urađena po proceduri proizvođača kita za izolaciju koji je korišćen (RNeasy kit, Qiagen). Čelije su prenete u odgovarajuće ependorfe i homogenizovane centrifugiranjem 2 minuta maksimalnom brzinom. Nakon toga na uzorke je naliven 70% rastvor etanola. Ovako pripremljeni uzorci su pipetiranjem naneti na kolone sa silika-gel membranom (RNeasy mini kolone) i centrifugirani 30s na 8000 x g. Ova mini kolona selektivno vezuje RNK molekule veće od 200 nukleotida, što omogućava obogaćivanje izolata molekulima iRNK (većina molekula iRNK je veća od 200 nukleotida),

dok svi molekuli koji imaju manje od 200 nukleotida se u toku nekoliko uzastopnih ispiranja centrifugiranjem u RPE puferu 30s-2min na 8000 x g odstranjuju iz uzorka. Na kraju se RNK molekuli vezani za membranu sakupljaju ispiranjem u vodi (RNK free vodom), centrifugiranjem na 8000 x g, tokom 1 minuta.

### 3.3.9. Reverzna transkripcija-PCR

U cilju sinteze cDNK na osnovu izolovane RNK praćena je procedura po savetu proizvođača čiji je proizvod za izolaciju korišćen (Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). Za PCR reakciju sinteze cDNK korišćen je AmpliTaq Gold DNA polimeraza (Applied Biosystems), i specifični prajmeri (dati u Tabeli 3.5., svi kupljeni od MWGBiotech AG, Ebensburg, Nemačka).

Tabela 3.5. Sekvence prajmera korišćenih u reakciji reverzne transkripcije u PCR reakciji

MOLEKUL	SEKVENCE (5'-3') KORIŠĆENIH PRAJMERA
TLR3	F- AGCATAGCAGCCTCTGCTTC R- CCTTCCCCTTCTCTTCTTCC
TLR4	F- CCTAAGGAAACCTGATTAACA R- GATATTAGCTTATAGGCAAGA
β-aktin	F- TCACCCACACTGTGCCCCATCTACGA R- CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

F- prajmer komplementaran kodirajućem lancu DNK (forward)

R- prajmer komplementaran nekodirajućem lancu DNK (reverse)

Proces amplifikacije cDNK odvijao se u ependorficama za PCR sistem (Eppendorf PCR System), tokom 40 ciklusa na 94° C, 30s / 55° C, 30s / 70° C, 45s. Produkti PCR reakcije, DNK marker 50bp Ladder (Sigma) i kontrole bez RNK su razdvojeni na 2% agaroznom gelu i obejeni etidijum bromidom. Razdvajanje pruga na gelu je uslikano ChemiImager 4400 (Alpha Innotech) i analiza je vršena koiršćenjem softvera ImageQuant TL (Molecular Dynamics). Nivo ekspresije iRNK za svaki pojedinačni molekul izražen je preko debljine i inteziteta odgovarajućih pruga na agaroznom gelu. Nivoi ekspresije iRNK za TLR3 i TLR4 izraženi su kao relativna vrednost u odnosu na nivo ekspresije  $\beta$ -aktina.

### **3.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

U analizi podataka korišćeni su Studentov t test, analiza varijanse (ANOVA) sa odgovarajućim post-testom (Mann-Whitney post-test ili Dunnett post-test) i ne-parametarski test Kruskal-Wallis. Korišćeni statistički test označen je u opisu figura. Statističke značajnosti označene su zvezdicama i njihovo značenje je \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.005 u poređenju sa odgovrajućom kontrolom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. KARAKTERIZACIJA ČELIJSKIH LINIJA IZOLOVANIH IZ DELOVA ZDRAVOG ZUBA I PERIAPEKSNE LEZIJE KAO MSC

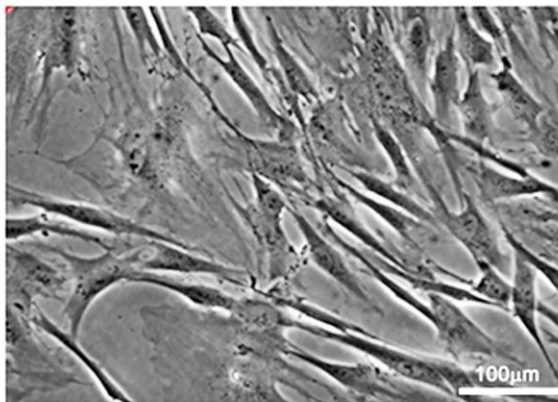
Na početku istraživanja smo, prateći minimalne kriterijume za karakterizaciju MSC, koje je postavilo ISCT 2006. godine [37], ispitivali prisustvo ćelija sa karakteristikama MSC u zdravim dentalnim tkivima i periapeksnim lezijama čoveka.

#### 4.1.1. Morfološke karakteristike i sposobnost za samo-obnavljanje DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC

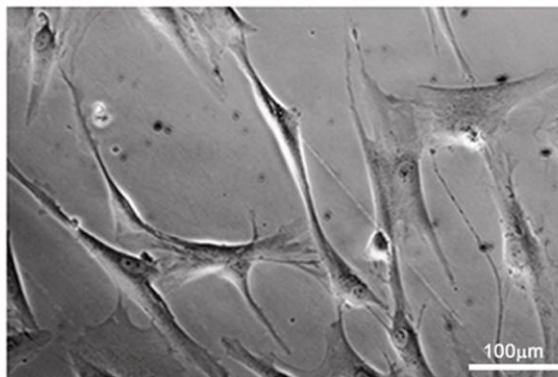
DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u kulturi poseduju morfologiju nalik fibroblastima što je karakteristika MSC izolovanih i iz drugih adultnih tkiva [388]. Takođe, ove ćelije su u kulturi izraženo pokretne što se uočava kao pojavljivanje visoko pokretnih lamelopodija (Fig. 1). DP-MSC i DF-MSC se razlikuju po prosečnoj veličini ćelija kao i po udelu ćelija različitog prečnika, pri čemu DP-MSC imaju nešto manji prosečni prečnik (Fig. 2). Sposobnost za samo-obnavljanje je karakteristika svih matičnih ćelija i može se analizirati preko vremena potrebnog za dupliranje populacije ćelija (*engl.* population doubling time, PDT). Kriva proliferacije ovih ćelija ima sigmoidni oblik što ukazuje na to da ćelije na početku kultivacije (lag faza) i nakon dostizanja konfluentnosti (stacionarna faza) imaju nižu stopu proliferacije (Fig. 3A). Upoređivanjem PDT ovih ćelijskih linija u 4. pasažu pokazali smo da MSC izolovane iz zdravog dentalnog tkiva imaju veći potencijal za samo-obnavljanje u poređenju sa PL-MSC, pri čemu DF-MSC imaju najvišu stopu proliferacije, dok DP-MSC imaju nešto nižu stopu proliferacije (Fig. 3A). Kada se kultiviše mali broj ovih ćelija one pokazuju sklonost ka formiranju CFU-F, što je jedan od kriterijuma za karakterizaciju ovih ćelija (Fig. 3B). Pored manjeg potencijala za proliferaciju u 4. pasažu, PL-MSC su imale i najmanji procenat CFU-F ( $14.7 \pm 1.6$ ), u poređenju sa MSC iz zdravog tkiva koje imaju u proseku 2.3 puta veći potencijal za formiranje CFU-F ( $34.0 \pm 6.8\%$  za DP-MSC i  $36.5 \pm 5.8\%$  za DF-MSC).



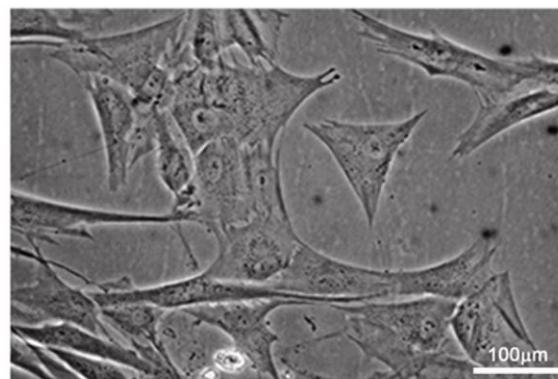
DP-MSC



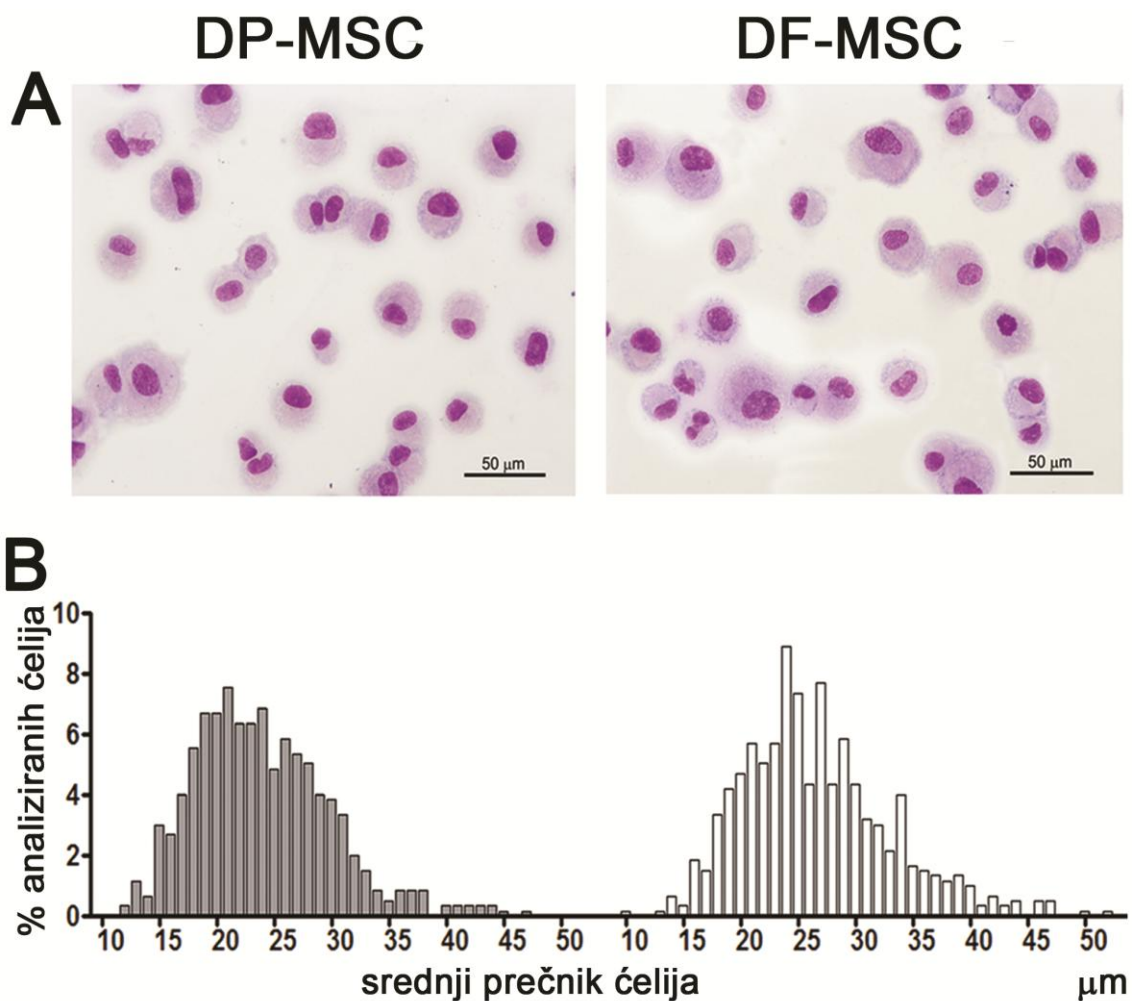
DF-MSC



PL-MSC

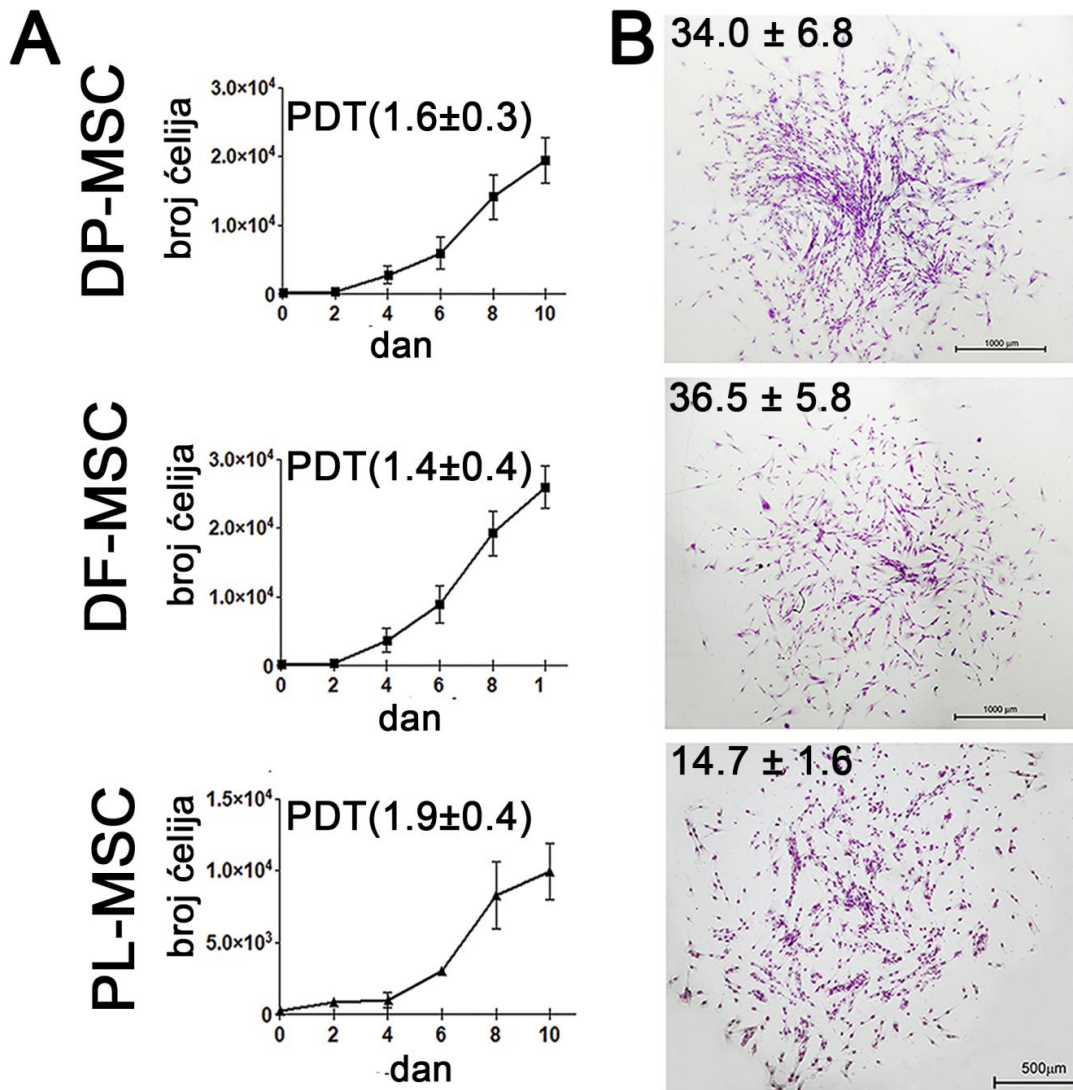


**Figura 1.** Izgled DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u kulturi (fazno-kontrasna mikroskopija).



**Figura 2.** Veličina DP-MSC i DF-MSC.

(A) Ćelije su sakupljene tripsinizacijom iz kultura, od njih su napravljeni citospinovi, koji su zatim obojeni May-Grunwald-Giemsom metodom. (B) Distribucija frekvencije pojavljivanja ćelija određenog prečnika izražena kao procenat ćelija sa određenom dužinom prečnika u ukupnom broju analiziranih ćelija (analizirano je 150 ćelija po svakom tipu ćelija).

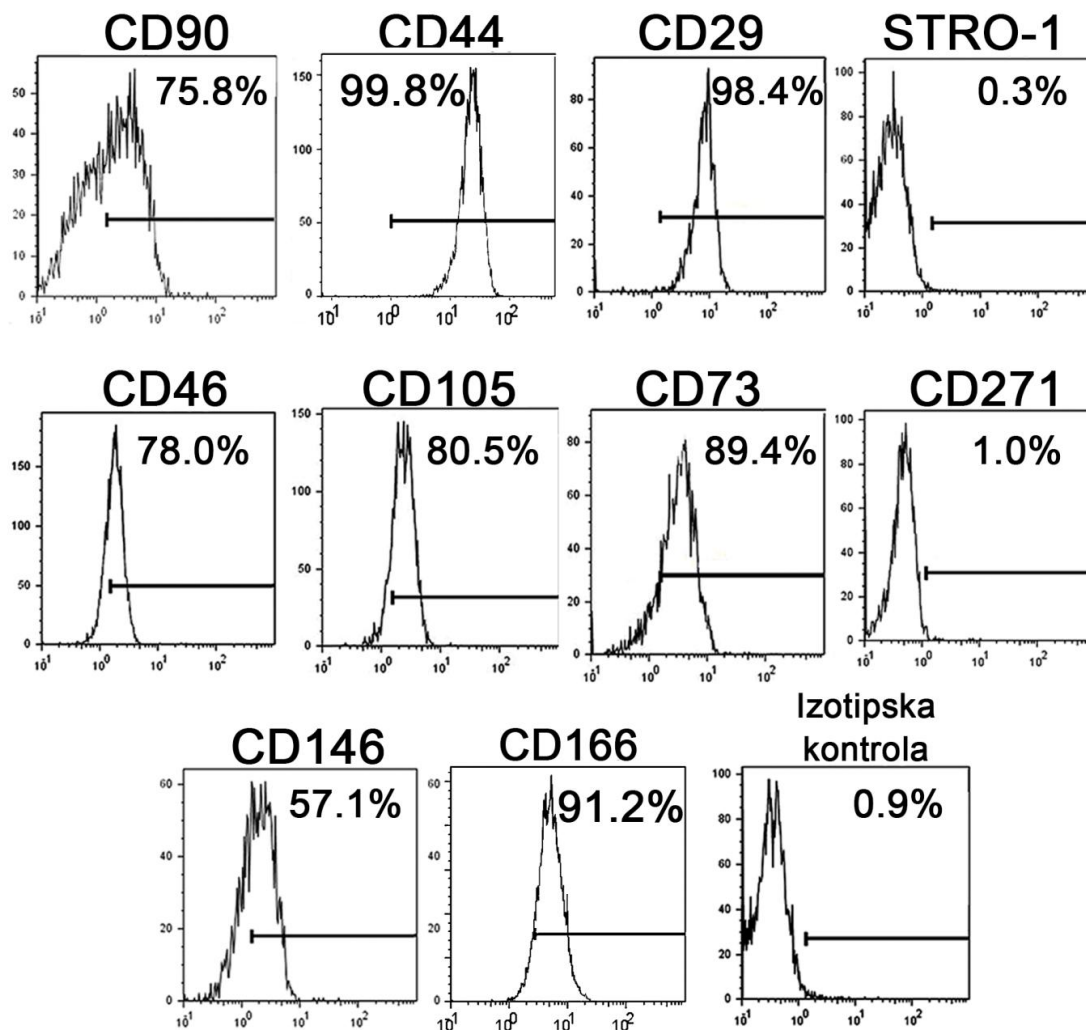


**Figura 3.** Potencijal za samoobnavljanje DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC.

(A) Dinamika proliferacije DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u 4. pasažu. Vreme dupliranja populacije (engl. population doubling time, PDT) izračunato je po formuli:  $PDT = 10 \times \lg 2 / \lg(N_{10}/N_0)$ ,  $N_{10}$ - broj ćelija sakupljenih 10. dana i  $N_0$  početni broj ćelija. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  SD triplikata. (B) Izgled kolonija nalik fibroblastima (engl. colony forming units-fibroblast, CFU-F) koje formiraju DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u 4. pasažu. Frekvencija formiranja CFU-F, definisanih kao kolonija od najmanje 50 ćelija, je izračunata kao (broj kononija/broj zasađenih ćelija)  $\times$  100. Pokazane su reprezentativne slike jednog od tri eksperimenta.

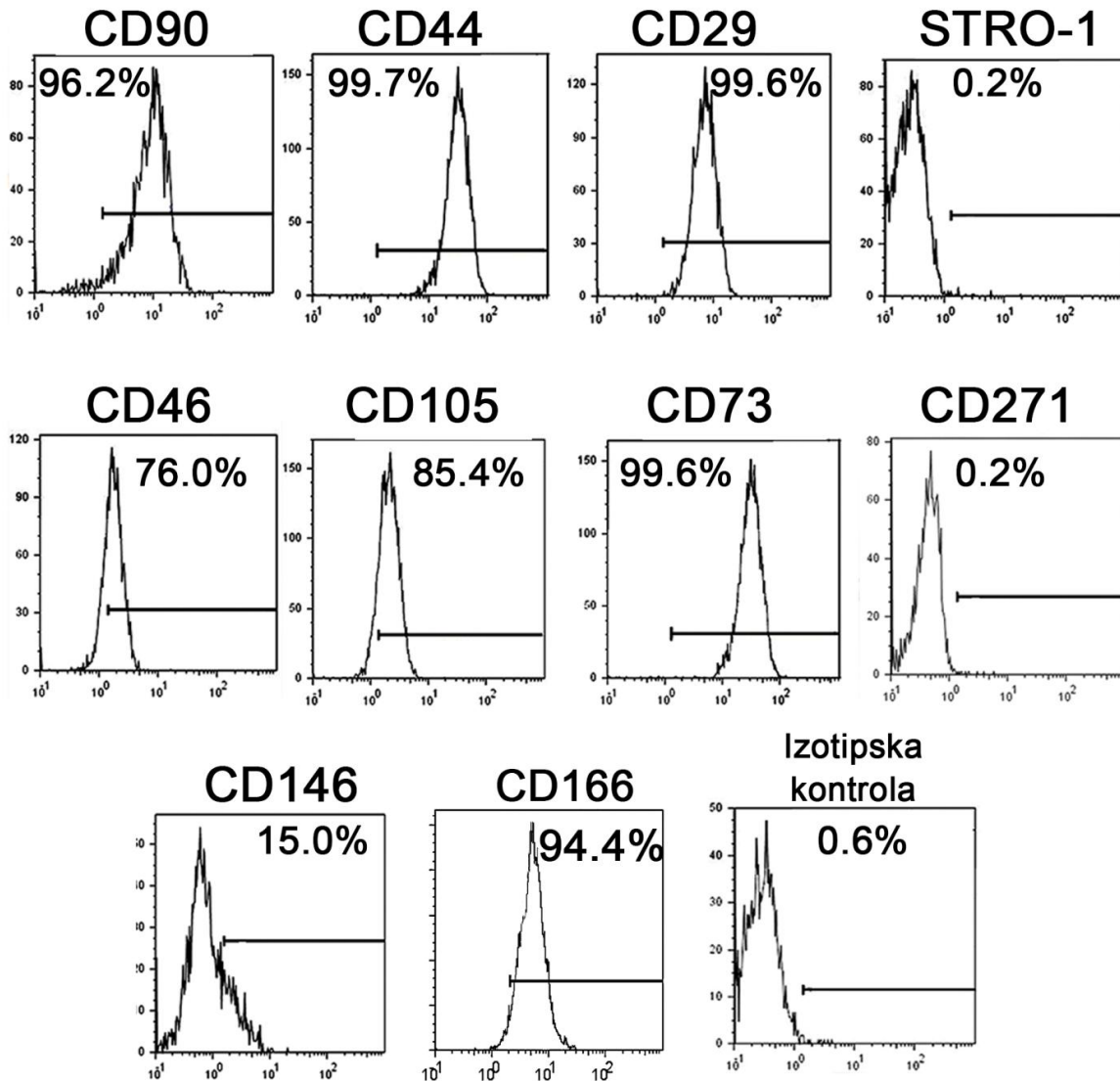
#### 4.1.2. Fenotipske karakteristike DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC

U nastavku karakterizacije ovih ćelijskih linija, analizirali smo ekspresiju molekula ključnih za identifikaciju MSC na ćelijama u uspostavljenim ćelijskim linijama (Fig. 4-9). Kao kontrolne ćelije koristili smo BM-MSC (Fenotipska analiza data je u Prilogu 4.). Ćelije iz ovih ćelijskih linija nisu ispoljavale markere HLA-DR, CD45, CD19 i CD14, karakteristične za druge ćelijske tipove koji mogu dugo da prežive u kulturama MSC. Na osnovu podataka dobijenih korišćenjem protočnog citofluorimetra sličan procenat MSC izolovanih iz zdravog dentalnog tkiva ispoljavao je CD46, CD44 i CD29 (Fig. 4, 5). Molekuli CD90, CD73 su bili više ispoljeni na DF-MSC, u poređenju sa DP-MSC. Takođe, nešto veća ekspresija CD166 i CD105 je detektovana kod DF-MSC u poređenju sa DP-MSC. Sa druge strane, veća ekspresija CD56 (Fig. 12) i CD146 (Fig 4, 5) je zabeležena kod DP-MSC, u odnosu na DF-MSC. Veći procenat PL-MSC ispoljavao je CD90 i CD105, u poređenju sa MSC iz zdravog dentalnog tkiva (Fig. 4, 5, 6). Takođe, PL-MSC su imale veći intenzitet fluorescence za CD44 (MFI=54), u poređenju sa DP-MSC (MFI=35) i DF-MSC (MFI=31). Analiza podataka dobijenih protočnom citofluorimetrijom je pokazala da manji procenat PL-MSC ispoljava CD46 ( $53.6 \pm 7.2\%$ ) u poređenju sa MSC iz zdravog dentalnog tkiva (oko 80%) (Fig. 4, 5, 6). Međutim, naknadnom analizom podataka dobijenih imunocitohemijskom metodom pokazali smo da preko 90% PL-MSC ispoljava CD46 i to polovina ovih ćelija ovaj molekul ispoljava isključivo intracelularno (Fig. 9). Dalje, nasuprot podacima koje smo dobili korišćenjem protočnog citofluorimetra da mali procenat ćelija ispoljava STRO-1, imunocitohemijskom metodom smo pokazali da više od 60% ćelija u sve tri ćelijske linije ispoljava ovaj molekul i to većinom intracelularno (Fig. 4-9). Takođe, imunocitohemijskom metodom smo pokazali da MSC iz zdravog dentalno tkiva ispoljavaju CD271, i to DF-MSC u većem procentu u poređenju sa DP-MSC (Fig. 7, 8). PL-MSC, analizirane u 3. i 7. Pasažu, nisu ispoljavale ovaj molekul (Fig. 6, 9).



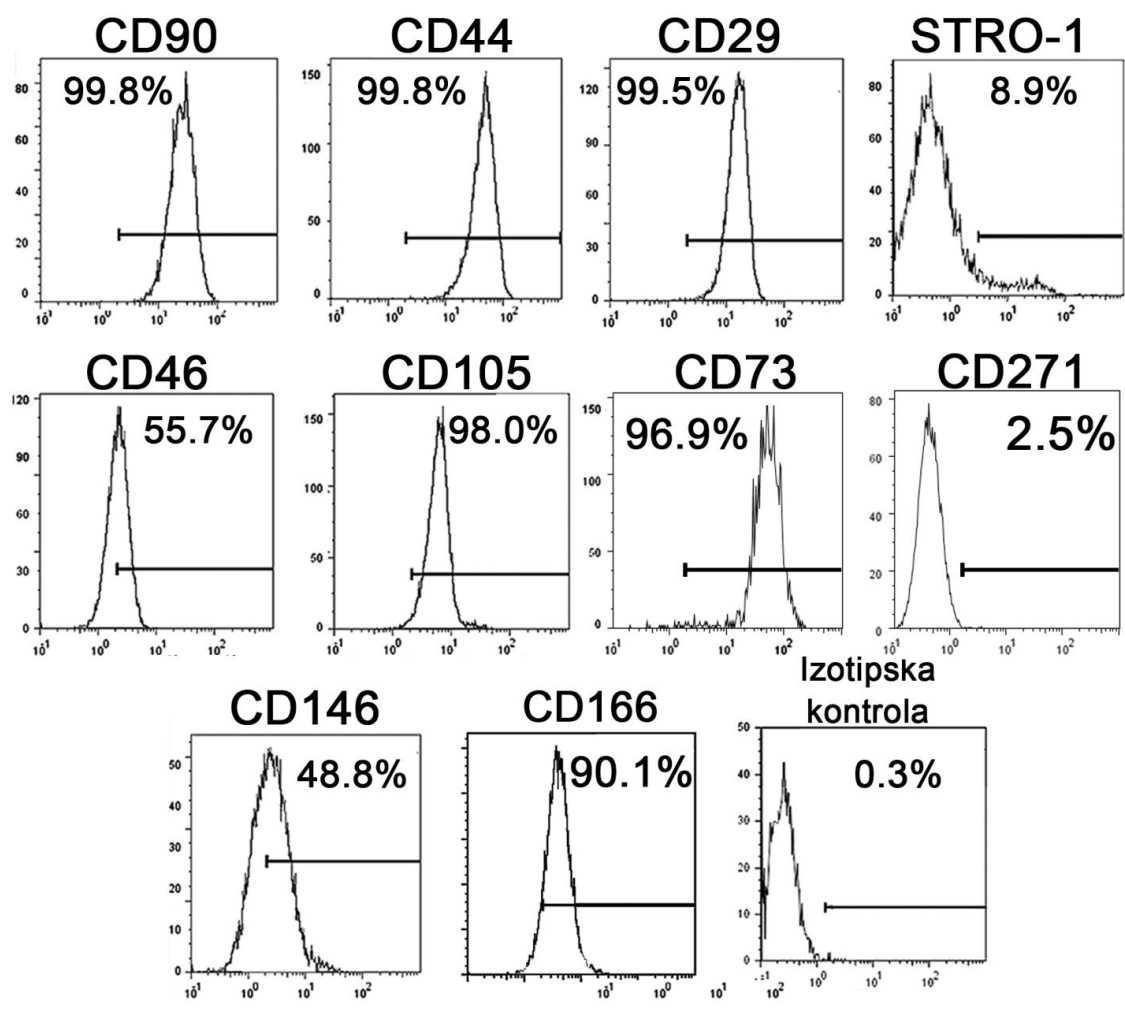
**Figura 4.** Fenotipske karakteristike DP-MSC.

Ekspresija markera na ćelijama je analizirana na FACS-u i procenat ćelija koje ispoljavaju određeni marker označen je iznad odgovarajućeg histograma.



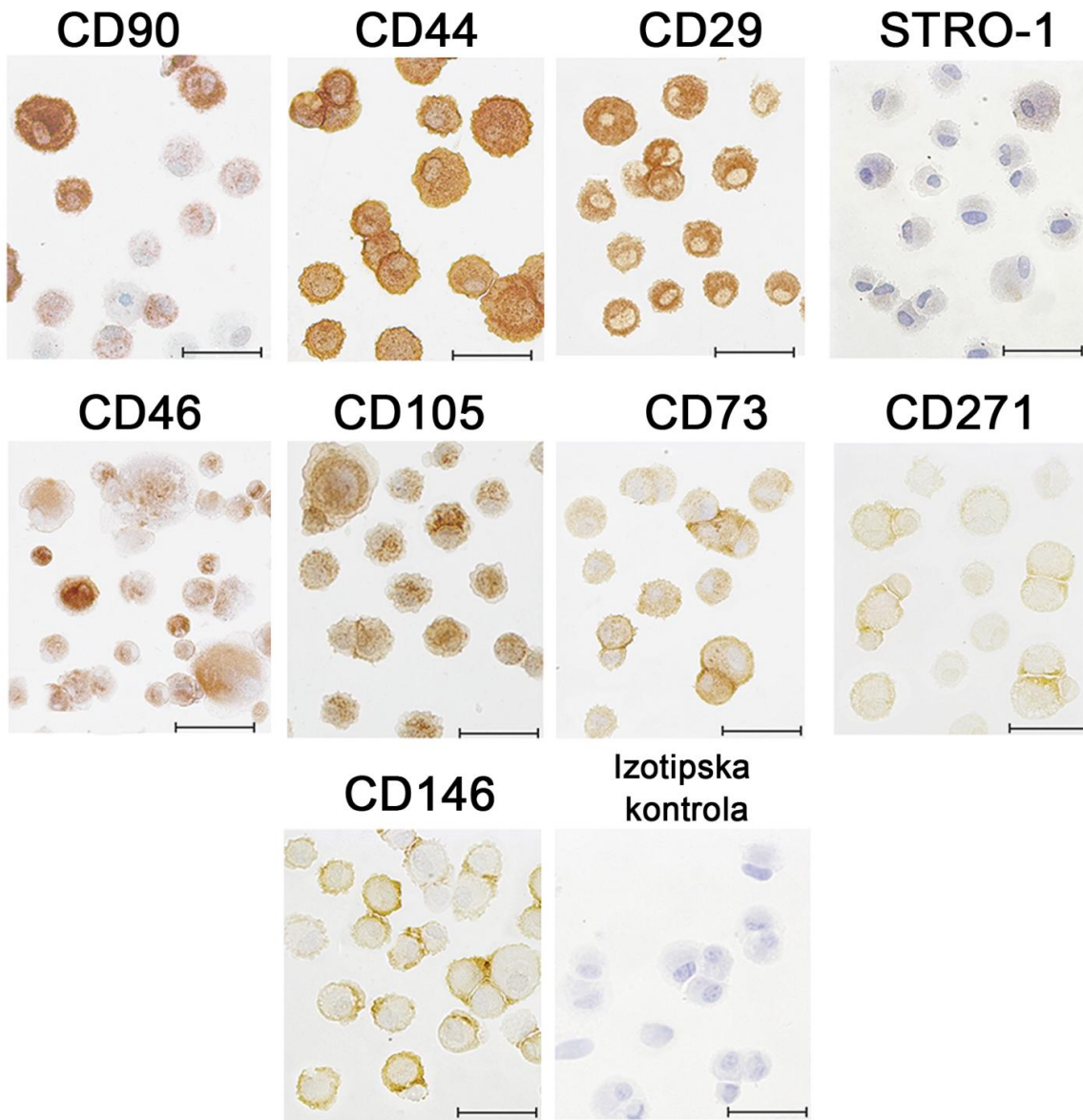
**Figura 5.** Fenotipske karakteristike DF-MSC.

Ekspresija markera na ćelijama je analizirana na FACS-u i procenat ćelija koje ispoljavaju određeni marker označen je iznad odgovarajućeg histograma.



**Figura 6.** Fenotipske karakteristike PL-MSC.

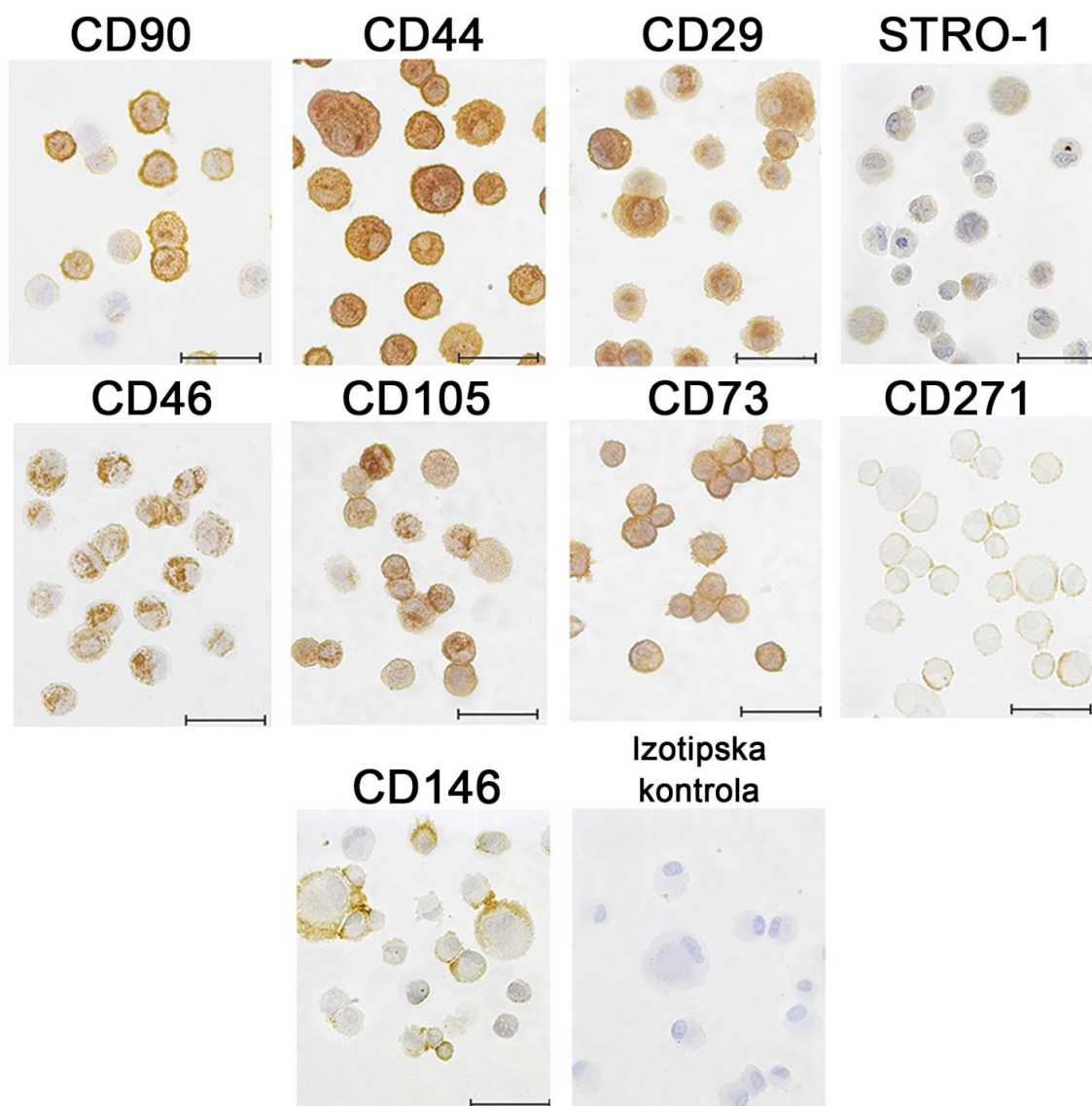
Ekspresija markera na ćelijama je analizirana na FACS-u i procenat ćelija koje ispoljavaju određeni marker označen je iznad odgovarajućeg histograma.



**Figura 7.** Fenotipske karakteristike DP-MSC.

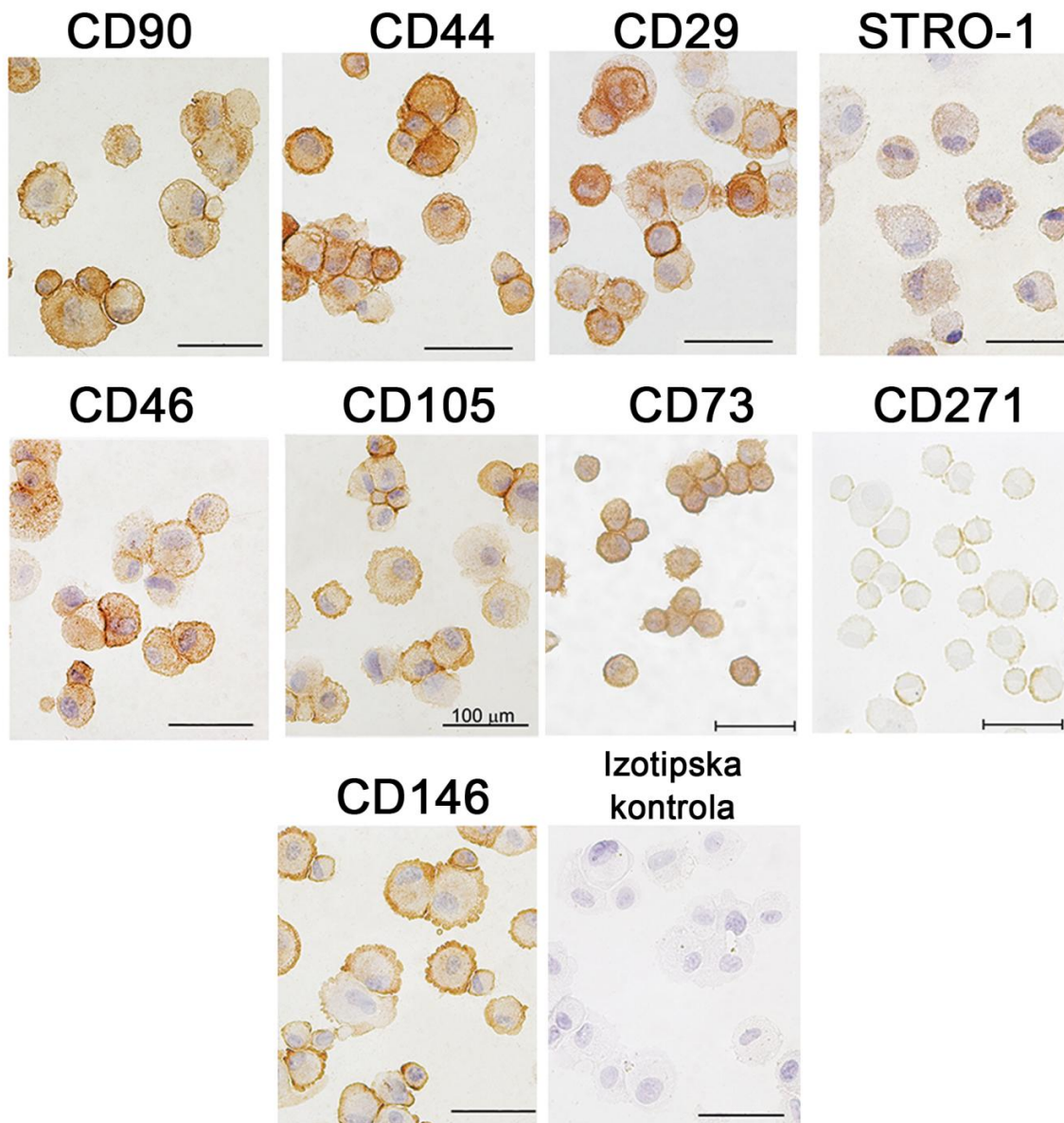
Na ćelijama postavljenim na citospinovima je imunocitohemijском metodom detektovana ekspresija molekula naznačenog iznad svake fotografije. Pozitivne ćelije se vide kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju korišćenu u analizi. Ćelije su analizirane na svetlosnom mikroskopu. Barovi predstavljaju dužinu od 100 $\mu$ m.





**Figura 8.** Fenotipske karakteristike DF-MSC.

Na ćelijama postavljenim na citospinovima je imunocitohemijskom metodom detektovana ekspresija molekula naznačenog iznad svake fotografije. Pozitivne ćelije se vide kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju korišćenu u analizi. Ćelije su analizirane na svetlosnom mikroskopu. Barovi predstavljaju dužinu od 100 $\mu$ m.



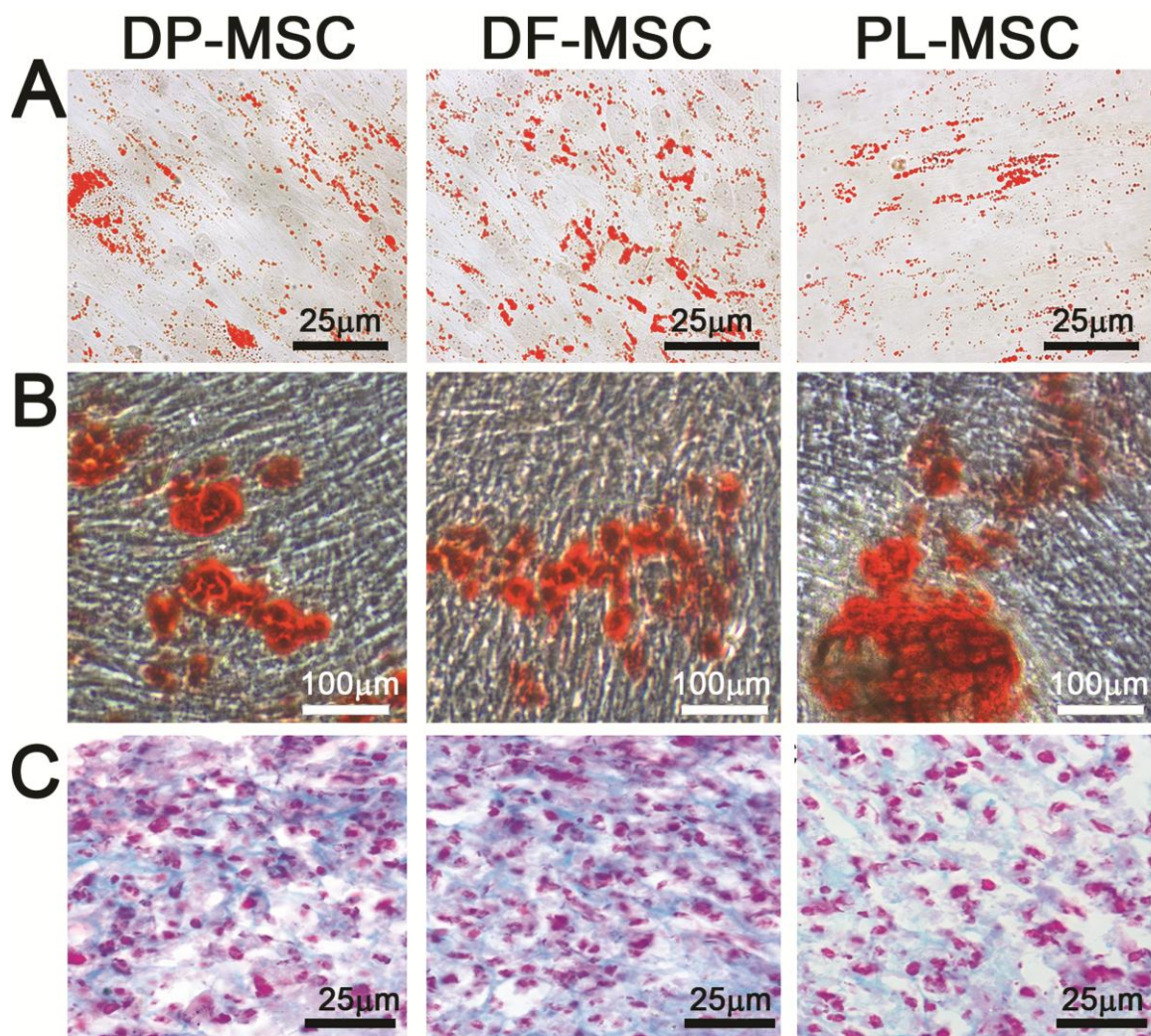
**Figura 9.** Fenotipske karakteristike PL-MSC.

Na ćelijama postavljenim na citospinovima je imunocitohemijskom metodom detektovana ekspresija molekula naznačenog iznad svake fotografije. Pozitivne ćelije se vide kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju korišćenu u analizi. Ćelije su analizirane na svetlosnom mikroskopu. Barovi predstavljaju dužinu od 100 $\mu$ m.

#### 4.1.3. Potencijal DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC za diferencijaciju

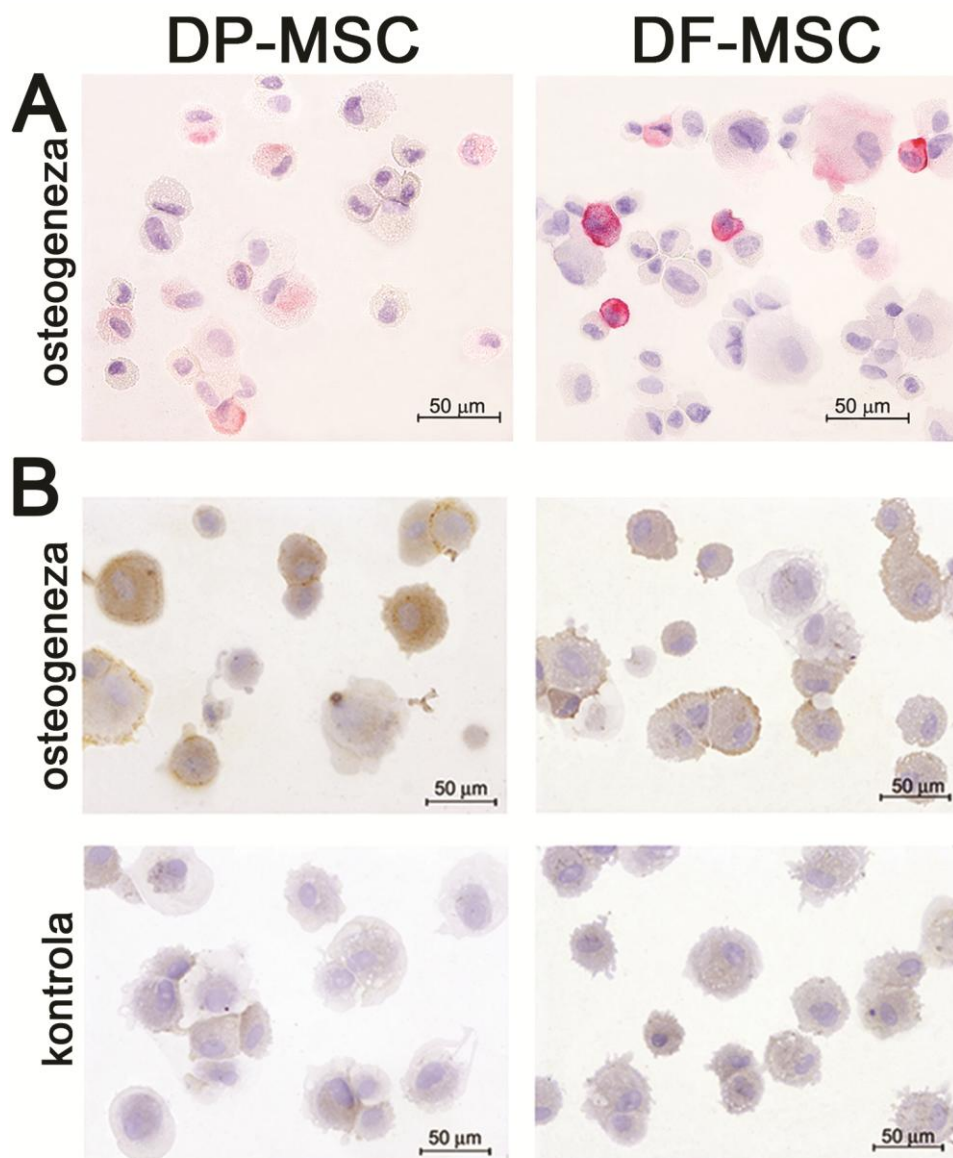
Kao poslednji korak u identifikaciji MSC u ćelijskim linijama dobijenim iz dentalne pulpe, dentalnog folikula i periapeksne lezije, ispitivali smo sposobnost ovih ćelijskih linija za diferencijaciju u tri tipa ćelija mezenhimskog porekla: osteoblasti, hondroците i adipocite.

Kada smo tri ćelijske linije izložili dejstvu indukcionih medijuma za osteogenezu, hondrogenezu i adipogenezu u *in vitro* uslovima, pokazali smo da se one međusobno razlikuju po procentu ćelija koje imaju potencijal za diferencijaciju u ove ćelijske tipove (Fig. 10A-C). Nakon kultivacije u adipogenom medijumu i bojenja ćelija sa Oil-red bojom (Fig. 10A), DF-MSC su, na osnovu većeg broja masnih kapi koje su bile i većeg prečnika, pokazale izraženiji potencijal za diferencijaciju u adipocite u poređenju sa DP-MSC, dok je ovaj potencijal bio najslabije izražen kod PL-MSC. Takođe, analizom procentualnog udela površine ćelija u kulturi koju, nakon kultivacije DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u medijumu za indukciju osteogeneze, ispunjavaju nodule akumuliranog kalcijuma (boje se crveno Alizarin-red bojom) (Fig. 10B), pokazali smo da PL-MSC imaju najjači potencijal za diferencijaciju u osteocite ( $18.9 \pm 4.6\%$ ), a da DP-MSC imaju izraženiju osteogenu sposobnost ( $13 \pm 5.3\%$ ) u poređenju sa DF-MSC ( $6 \pm 2.1\%$ ). Pored toga više DP-MSC ispoljava alkalnu fosfatazu i osteopontin (Fig. 11A, B), što su takođe karakteristike prekursora u procesu osteogeneze. Analizom jačine Alcian-blue boje na krio-presecima peleta formiranog tokom kultivacije ćelija u hondrogenom medijumu (Fig. 10C), zapazili smo da je intezitet plave boje najjači po obodu peleta, dok se ka unutrašnjosti intezitet smanjuje. PL-MSC su imale najjači potencijal za diferencijaciju u hondroците, a od dve linije MSC izolovane iz zdravog dentalnog tkiva DP-MSC su imale izraženiju hondrogenu sposobnost u poređenju sa DF-MSC. Ovim ispitivanjem zaključili smo da, pod uticajem određenih indukcionih medijuma, DF-MSC imaju najjači potencijal za adipogenezu, dok PL-MSC imaju najizraženiji potencijal za diferencijaciju u hondroците i osteocite. Upoređivanjem linija izolovanih iz zdravih dentalnih tkiva, DP-MSC imaju izraženiju hondrogenu i osteogenu sposobnost.



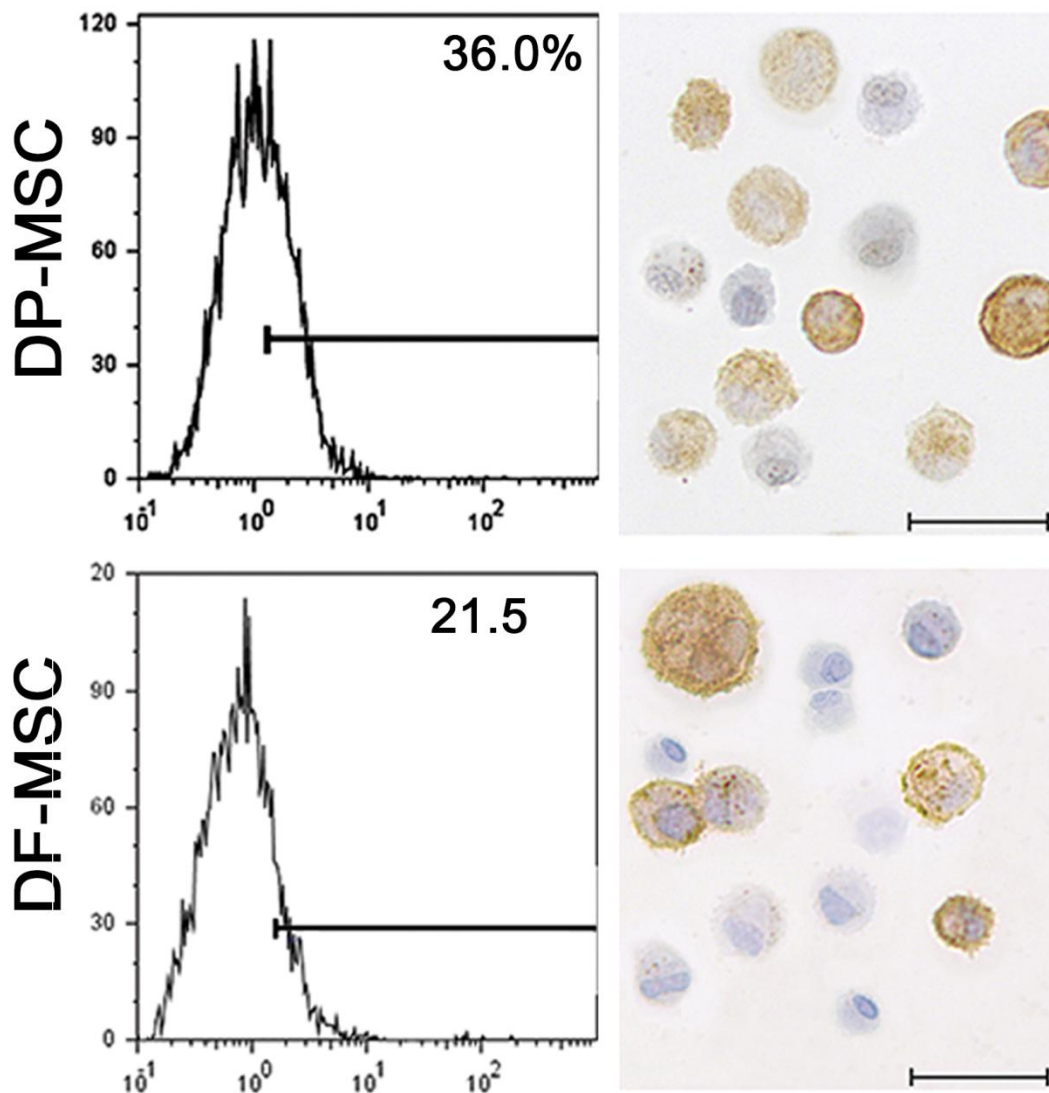
**Figura 10.** Potencijal za diferencijaciju DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC u 5. pasažu.

Ćelije su kultivisane u kontrolnom medijumu ili medijumu za indukciju diferencijacije, nakon čega su ćelije obojene (A) Oil red bojom, koja boji masne kapi crvenom, za kvantifikaciju adipogeneze (B) Alizarin red bojom, koja boji nodule kalcijuma crveno, za detekciju osteogeneze (C) Alcian blue bojom, koja boji plavo glikozaminoglikane, sastojak ekstraćelijskog matriksa koji produkuju hondroblasti, za detekciju hondrogeneze i Nuclei red bojom jedra u crveno.



**Figura 11.** Osteogeni potencijal DP-MSK i DF-MSK u 5. pasažu.

Ćelije su kultivisane u kontrolnom ili medijumu za indukciju diferencijacije, nakon čega su sakupljene tripsinizacijom, od njih su napravljene citospinovi i na njima je detektovana (A) aktivnost alkalne fosfataze, dodavanjem substrata za ovaj enzima (mešavina naftol-dimetil formamid / tris(dihidroksimetil) aminometan) i hromogena Fast Red, zbog čega se ćelije koje ispoljavaju aktivnu alkalnu fosfatazu boje crveno; (B) ekspresija osteopontina, imunocitohemijskom reakcijom korišćenjem anti-osteopontin antitela. Pozitivne ćelije vide se kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju, korišćenu u analizi.

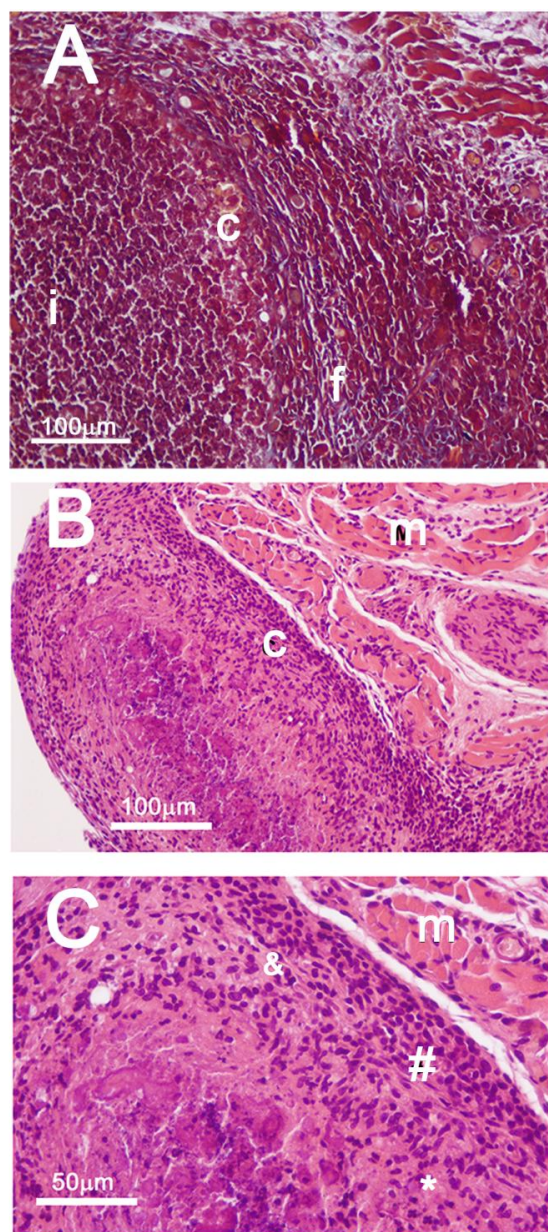


**Figura 12.** Ekspresija CD56 na DP-MSC i DF-MSC u 5. pasažu.

Ekspresija CD56 na MSC je analizirana na FACS-u i procenat ćelija koje ispoljavaju ovaj marker označen je iznad histograma. Ekspresija CD56 analizirana je i na citospinovima obojenim imunocitohemijskom metodom korišćenjem anti-CD56 antitela. Pozitivne ćelije vide se na svetlosnom mikroskopu kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju, korišćenu u analizi.

#### 4.1.4. Transplantacija MSC u ksenogenog domaćina

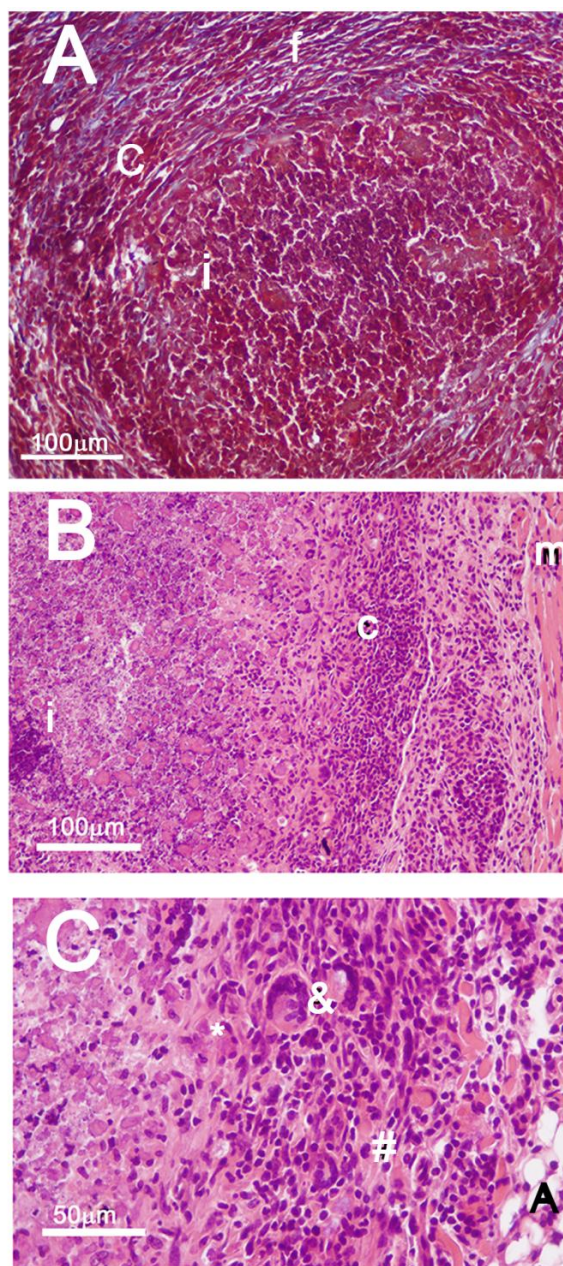
Pored sposobnosti ovih ćelijskih linija da se diferenciraju u različite ćelijske tipove pod uticajem specifičnih indukcionih medijuma kultivacijom *in vitro*, prateći metod opisan od strane *Stevens i saradnici* (2008), ispitivali smo i njihovu sposobnost za diferencijaciju u *in vivo* uslovima. Posle 18 dana od implantacije ćelija iza uveta BALB/c miševima starim 1 dan, sve tri ćelijske linije indukovale su formiranje granulomatoznog inflamacijskog tkiva, što je odlika reakcije odbacivanja kseno-transplantata. Nakon bojenja preseka tkiva izolovanog sa mesta implantacije tro-bojnom tehnikom po Masson-u (Fig. 13-15 A) jasno se uočava fibrozna kapsula vezivnog tkiva bogatog kolagenom formirana oko implantiranih ćelija i ćelija koje su privučene na mesto implantacije. Analiza preseka obojenih hematoksilin-eozin tehnikom (Fig. 13-15 B, C) pokazala je da u ćelijskom infiltratu, koji zauzima periferiju granulomatoznog tkiva, dominiraju makrofage, gigantske ćelije i druge inflamacijske ćelije, dok je sam centar bio ispunjen mrtvim ćelijama. Na presecima tkiva nisu uočene nikakve diferencirane strukture.



**Figura 13.** Transplantacija DP-MSC u ksenogenog domaćina.

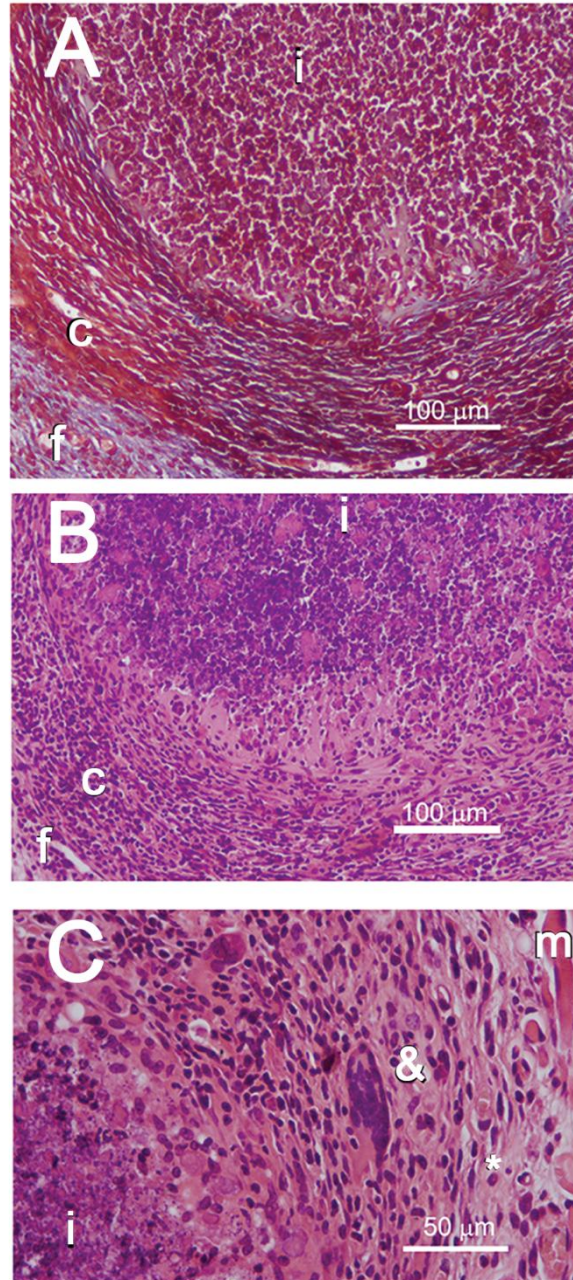
DP-MSC ( $1 \times 10^6$ ) su aplikovane subkutano iza uha BALB/c miševima starim jedan dan. Prikazane su fotografije eksplanata izolovanih nakon 18 dana i obojenih (A) trobojnom tehnikom po Masonu (engl. Masson trichrom staining) (B, C) hematoksilin/eozin bojenjem (A, B- uvećanja fotografija je 20x, C- uvećanje fotografije je 40x). I-implantirane ćelije, m-mišići, c-fibrozna kapsula, f-fibrozno tkivo, \*-fibroblasti, &-makrofage.





**Figura 14.** Transplantacija DF-MSK u ksenogenog domaćina.

DF-MSK ( $1 \times 10^6$ ) su aplikovane subkutano iza uha BALB/c miševima starim jedan dan. Prikazane su fotografije eksplanata izolovanih nakon 18 dana i obojenih (A) trobojnom tehnikom po Masonu (engl. Masson trichrom staining) (B, C) hematoksilin/eozin bojenjem (A, B- uvećanja fotografija je 20x, C- uvećanje fotografije je 40x). I-implantirane ćelije, m-mišići, c-fibrozna kapsula, f-fibrozno tkivo, \*-fibroblasti, &-makrofage A-adipociti.



**Figura 15.** Transplantacija PL-MSK u ksenogenog domaćina.

PL-MSK ( $1 \times 10^6$ ) su aplikovane subkutano iza uveta BALB/c miševima starim jedan dan. Prikazane su fotografije eksplanata izolovanih nakon 18 dana i obojenih (A) trobojnom tehnikom po Masonu (engl. Masson trichrom staining) (B, C) hematoksilin/eozin bojenjem (A, B- uvećanja fotografija je 20x, C- uvećanje fotografije je 40x). I-implantirane ćelije, m-mišići, c-fibrozna kapsula, f-fibrožno tkivo, \*-fibroblasti, &- makrofage.

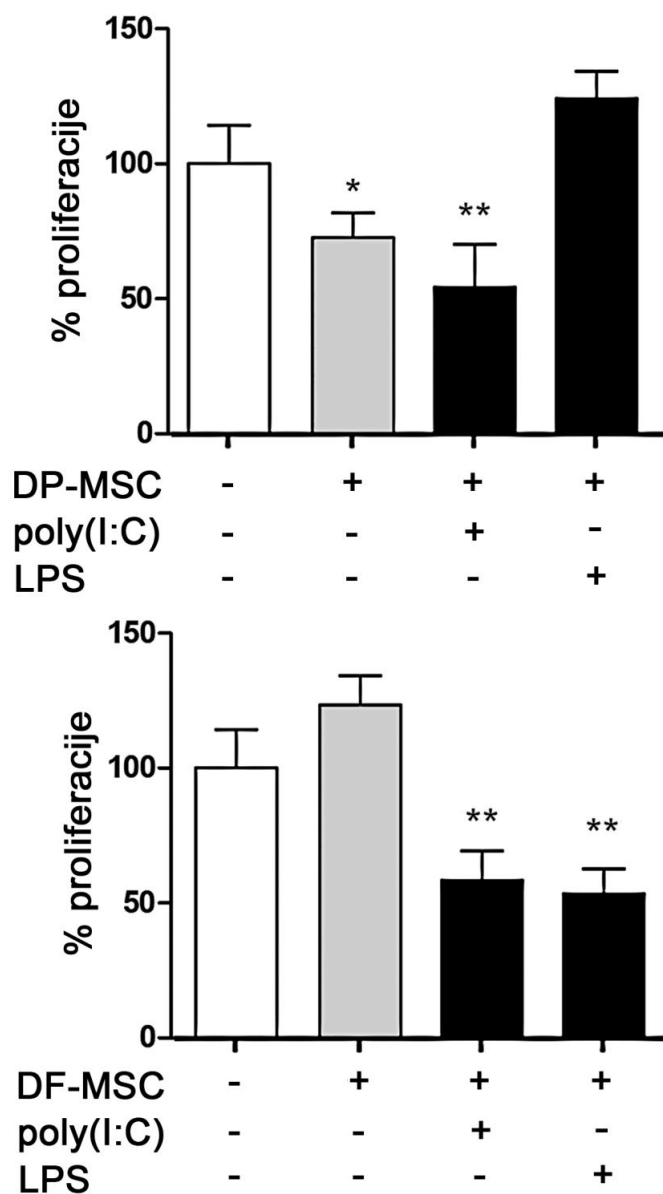
## 4.2. IMUNOMODULACIJSKE KARAKTERISTIKE MSC IZOLOVANIH IZ ZDRAVIH DENTALNIH TKIVA

Veliki broj istraživanja sprovedenih na MSC iz adultnih tkiva pokazao je da kvalitet imunomodulatornog efekta (imunostimulacija ili imunosupresija) MSC zavisi od sredinskih faktora kojima su izložene i od tipa i stupnja razvoja na kom se nalaze ćelije imunskog sistema (zrele ćelije, nediferencirane, neaktivne ili aktivirane ćelije) na koje MSC deluju.

### 4.2.1. Efekat DP-MSC i DF-MSC na proliferaciju alogeničkih mononuklearnih ćelija periferne krvi *in vitro*

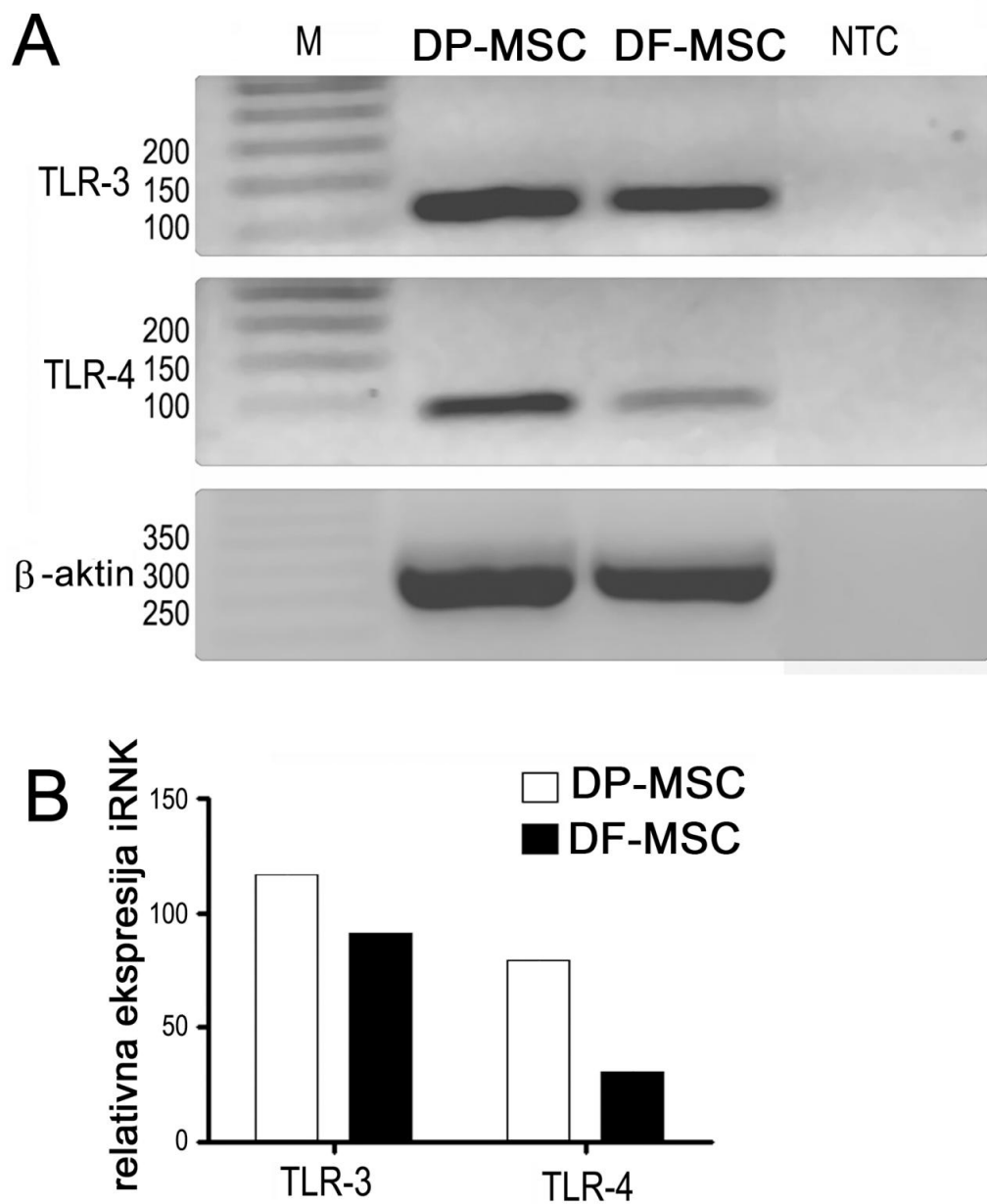
Jedna od važnih karakteristika svih do sada izolovanih MSC iz adultnog tkiva je njihova sposobnost da inhibiraju mitogenima indukovanu proliferaciju limfocita [510]. Imunosupresivni potencijal DP-MSC i DF-MSC je ispitivan u ko-kulturi sa nestimulisanim ili PHA-stimulisanim PBMC (Fig. 16). Pre kultivacije sa PBMC, MSC su tretirane sa mitomicinom C čime je blokirana njihova proliferacija u eseju. Nijedna ćelijska linija nije menjala proliferaciju nestimulisanih PBMC. U ovom sistemu, DP-MSC su pokazale blag inhibični efekat na proliferaciju PBMC ( $p < 0.05$ ), dok proliferacija PBMC nije bila izmenjena u prisustvu DF-MSC.

Dalje smo ispitivali da li aktivacija MSC izolovanih iz zdravog dentalnog tkiva TLR agonistima može da dovede do promene u njihovoj imunomodulatornoj sposobnosti (Fig. 16). MSC su tokom 24h tretirane TLR3-agonistom (poly(I:C) ili TLR4-agonistom (LPS), nakon čega su intenzivno isprane i zatim kultivisane sa PHA-stimulisanim PBMC. Aktivacija TLR3-agonistom pojačala je inhibični efekat DP-MSC na proliferaciju PBMC. DF-MSC su nakon tretmana TLR3-agonistom postale imunosupresivne. Zanimljivo je da je tretman TLR4-agonistom doveo do potpuno suprotnih efekata kod ove dve MSC linije. Tako je ovaj tretman doveo do potpunog gubitka ispitivanog imunosupresivnog potencijala



**Figura 16.** Imunomodulatorne karakteristike DP-MSC i DF-MSC.

MSC, netretirane ili tretirane TLR agonistima [25  $\mu$ g/mL poly(I:C) ili 200 ng/mL LPS] su ko-kultivisane sa PBMC stimulisanim sa PHA 250ng/ml, tokom 3 dana. Kontrolne PBMC stimulisane sa PHA su kultivisane bez MSC. Sve kulture su urađene u četvoroplikatima na osnovu čega je izračunata srednja vrednost  $\pm$  SD. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment od 4 eksperimenta. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.



**Figura 17.** Ekspresija iRNK u DP-MSC i DF-MSC za TLR3 i TLR4.

(A) Analiza ekspresije iRNK za TLR3, TLR4, i  $\beta$ -aktin u MSC urađena RT-PCR-om. M-marker; NTC-negativna kontrola. (B) nivo ekspresija iRNK za TLR3 i TLR4 je kvantifikovan merenjem površine koju zauzimaju linije nastale RT-PCR-om, i rezultati su izraženi kao relativna vrednost u odnosu na ekspresiju  $\beta$ -aktina.

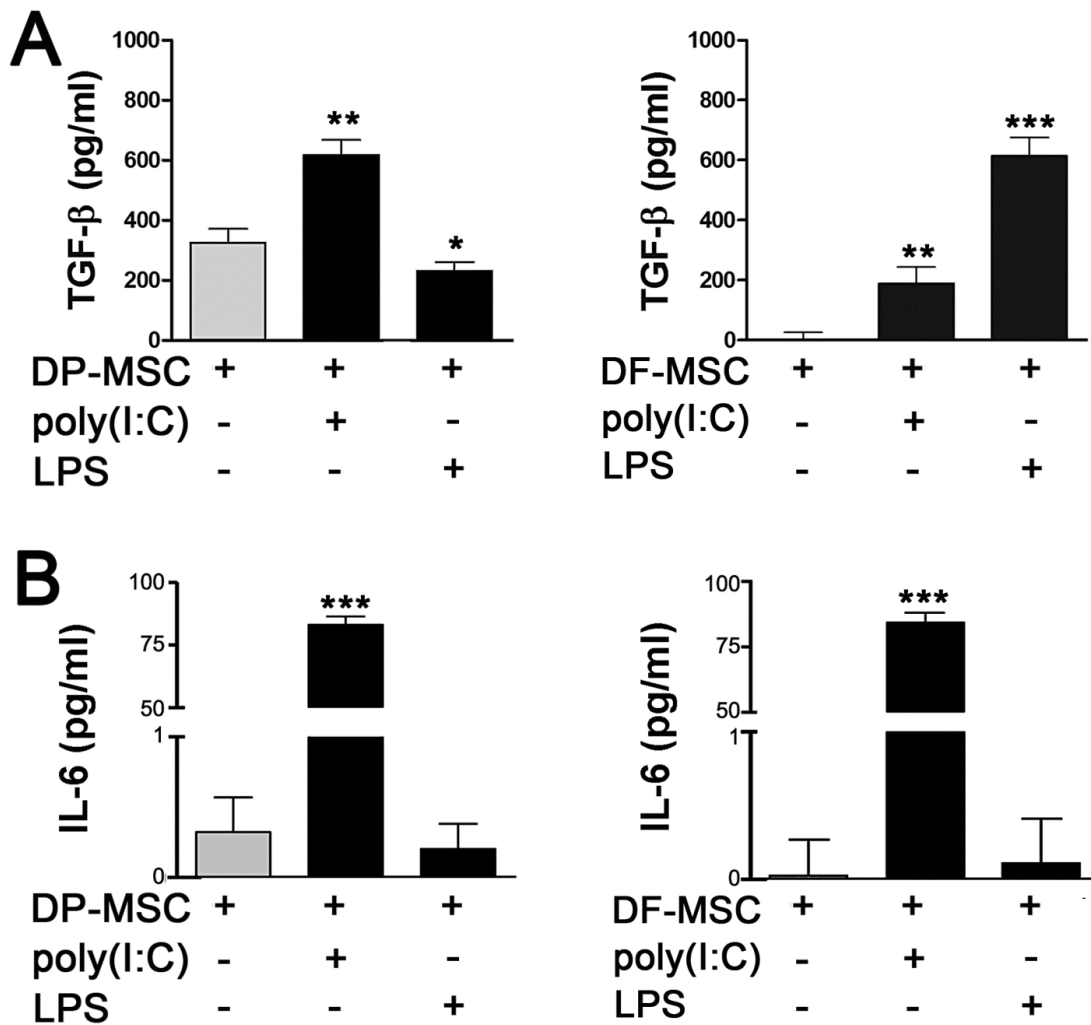
kod DP-MSK, dok je imunosupresivni potencijal DF-MSK bio pojačan nakon ovog tretmana.

Naknadno smo potvrdili da ove dve linije MSC izolovane iz zdravog dentalnog tkiva zaista i ispoljavaju TLR3 i TLR4 (Fig. 17). Podaci dobijeni analizom količine produkovane iRNK pokazali su da DP-MSK produkujru 1.3 puta više TLR3, odnosno 2.6 puta više TLR4 u poređenju sa DF-MSK.

#### 4.2.2. Mehanizmi koji posreduju u imunosupresivnom efektu DP-MSK i DF-MSK na mononuklearne ćelije periferne krvi *in vitro*

U nastavku smo ispitivali koji mehanizam posreduje u pokazanom imunosupresorskom efektu ovih MSC, a koji je podložan modifikaciji tretmanom TLR-agonistima. Pošto je pokazano da BM-MSK ovakav imunosupresorski efekat ostvaruju posredstvom TGF- $\beta$  [371, 381], mi smo ispitivali da li produkcija ovog citokina od strane DP-MSK i DF-MSK može biti odgovorna za efekat ovih ćelija na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMC (Fig. 18A). U odsustvu TLR-agonista, DP-MSK su produkovale značajne količine ovog molekula ( $325 \pm 46$  pg/ml/ $5 \times 10^4$  ćelija), dok je produkcija ovog molekula od strane DF-MSK bila ispod nivoa detekcije. DF-MSK su produkovale značajno veće količine TGF- $\beta$  nakon stimulacije TLR3-agonistom i TLR4-agonistom. Tretman TLR3-agonistom doveo je do dvostrukog povećanja produkcije TGF- $\beta$  od strane DP-MSK, dok su iste ćelije nakon tretmana TLR4-agonistom produkovale značajno manje ovog citokina u poređenju sa produkcijom u odsustvu ovog stimulusa. Isti obrazac produkcije ove MSC su zadržale nakon uklanjanja stimulusa ispiranjem i dodatnog tretmana mitomicinom C tokom 24h (podaci nisu prikazani).

Da bismo ispitali povezanost produkcije TGF- $\beta$ , promena u njegovoj produkciji izazvanih tretmanom TLR-agonistima i efekta koji ove MSC ispoljavaju na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMC, u kulture ovih MSC sa PBMC u ko-kulture je dodato anti-TGF- $\beta$  antitelo (Tabela 1). PHA-stimulirane PBMC kojima je dodat TGF- $\beta$  (1ng/ml) i ista koncentracija anti-TGF- $\beta$  antitela kao u ko-kulturama, služile su kao pozitivna kontrola za



**Figura 18.** Efekat TLR agonista na produkciju citokina od strane DP-MSC i DF-MSC.

(A) Nivo TGF- $\beta$  i (B) nivo IL-6 mereni su u kulturama MSC ( $1 \times 10^4$ /bazenu) koje su netretirane (sivi barovi) ili tretirane TLR agonistima [25  $\mu$ g/mL poly(I:C) ili 200 ng/mL LPS] (crni barovi) u toku 24h. Sve kulture se postavljene u četvoroplikatima na osnovu čega je izračunata srednja vrednost  $\pm$  SD. Prikazan je jedan od 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.005$  u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

**Tabela 1.** Efekat TGF- $\beta$  neutralizirajućeg antitela na proliferaciju PBMC stimulisanu PHA

	PBMCs	PBMC + anti-TGF- $\beta$ mAb
Control	100.0 $\pm$ 14.1%	106.1 $\pm$ 9.2%
Control + TGF- $\beta$ (1ng/ml)	42.1 $\pm$ 6.2%	89.1 $\pm$ 4.9%
DPSCs	72.5% $\pm$ 9.3%	103.4 $\pm$ 11.3%
DPSCs (poly I:C-treated)	54.2 $\pm$ 16.2%	76.4 $\pm$ 8.5 %
DFPCs	123.2 $\pm$ 10.24%	116.4 $\pm$ 18.2%
DFPCs (poly I:C-treated)	58.33 $\pm$ 10.5%	80.4 $\pm$ 12.2 %

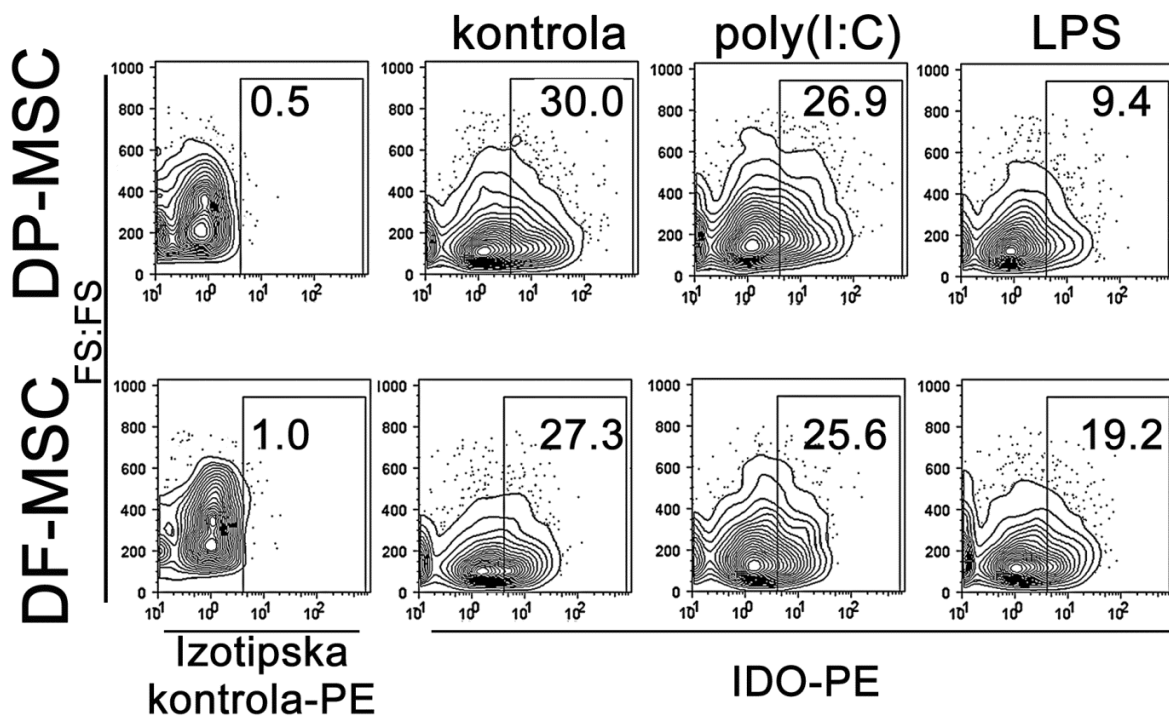
efikasnost TGF- $\beta$  u supresiji proliferacije PBMC. Takođe, na ovaj način pokazana je efikasnost anti-TGF- $\beta$  antitela da blokira ovaj supresivni efekat TGF- $\beta$ . Dodatak antitela u potpunosti je neutralisao supresivni efekat DP-MSc i egzogenog TGF- $\beta$  na proliferaciju PBMC. Međutim, imunosupresivni efekat indukovano nakon tretmana obe ćelijske linije TLR3-agonistom nije mogao biti u potpunosti blokiran dodavanjem anti-TGF- $\beta$  antitela u ko-kulturu.

Ovi rezultati pokazali su nam da TGF- $\beta$  možda nije jedini molekul odgovoran za imunosupresivnu aktivnost DP-MSc i DF-MSc. Pored TGF- $\beta$ , u skorije vreme je pokazano da mehanizam koji se zasniva na aktivnosti IDO-1 enzima posreduje u imunosupresivnim efektima BM-MSc na proliferaciju alogeničnih PBMC [293]. U odsustvu stimulusa sličan procenat DP-MSc i DF-MSc ispoljava IDO-1 (Fig. 19). Tretman TLR3-agonistom ni na koji način ne utiče na ekspresiju ovog molekula u DP-MSc i DF-MSc. Sa druge strane, LPS dovodi do smanjenja ekspresije IDO-1 i to 3.2 puta u DP-MSc i 1.4 puta u DF-MSc.

Kako su neki radovi pokazali da tretman BM-MSc TLR-agonistima može, ne samo da inhibira imunosupresivnu, već da indukuje proinflamacijsku aktivnost ovih ćelija [244], dodatno smo ispitivali promene u produkciji IL-6, kao dobro poznatog proinflamacijskog molekula, od strane DP-MSc i DF-MSc (Fig. 18B). Nestimulisane i LPS-stimulisane MSc nisu produkovala IL-6. Međutim, DF-MSc i DP-MSc nakon stimulacije Poly(I:C)-om



(TLR3 agonistom) produkovale su izuzetno visoke koncentracije IL-6 i ispoljavale su snažan supresivni efekat na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMC.



**Figura 19.** Efekat TLR agonista na ekspresiju IDO-1 enzima od strane DP-MSC i DF-MSC.

Netretirane MSC ( $1 \times 10^4$ /bazenu) ili tretirane tokom 24h TLR agonistima [ $25 \mu\text{g/mL}$  poly(I:C) ili  $200 \text{ ng/mL}$  LPS], obeležene su anti-IDO-1 antitelom ili izotipskom kontrolom i nakon toga analizirane na FACS-u. Sve kulture i merenja su urađene u četvoroplikatima na osnovu čega je izračunata srednja vrednost  $\pm$  SD. Prikazan je jedan od 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

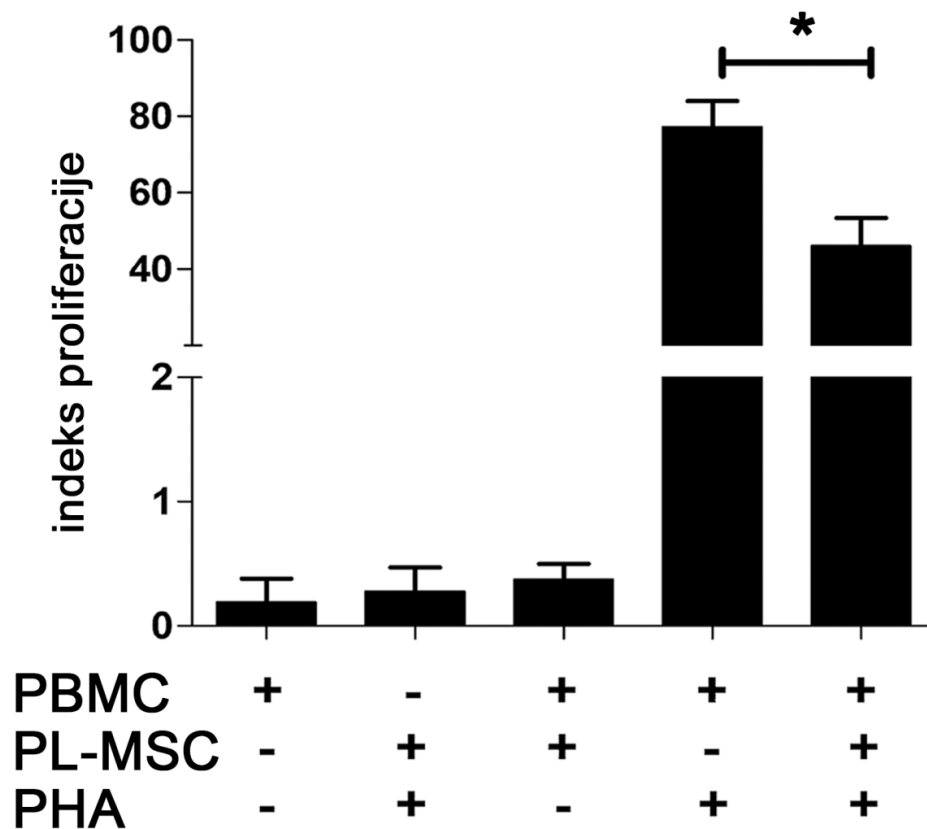
### 4.3. IMUNOMODULATORNE KARAKTERISTIKE PL-MSC

Kako smo pokazali da *in vitro* tretman MSC izolovanih iz zdravog tkiva TLR-agonistima podstiče imunosupresivnu aktivnost naš sledeći cilj je bio da ispitamo da li PL-MSC, izolovane iz sredine bogate TLR-ligandima, za koje smo takođe pokazali da ispoljavaju TLR3 i TLR4 (Prilog 5.), poseduju imunomodulatorne karakteristike.

#### 4.3.1. Efekat PL-MSC na proliferaciju i produkciju citokina od strane alogenih mononuklearnih ćelija periferne krvi *in vitro*

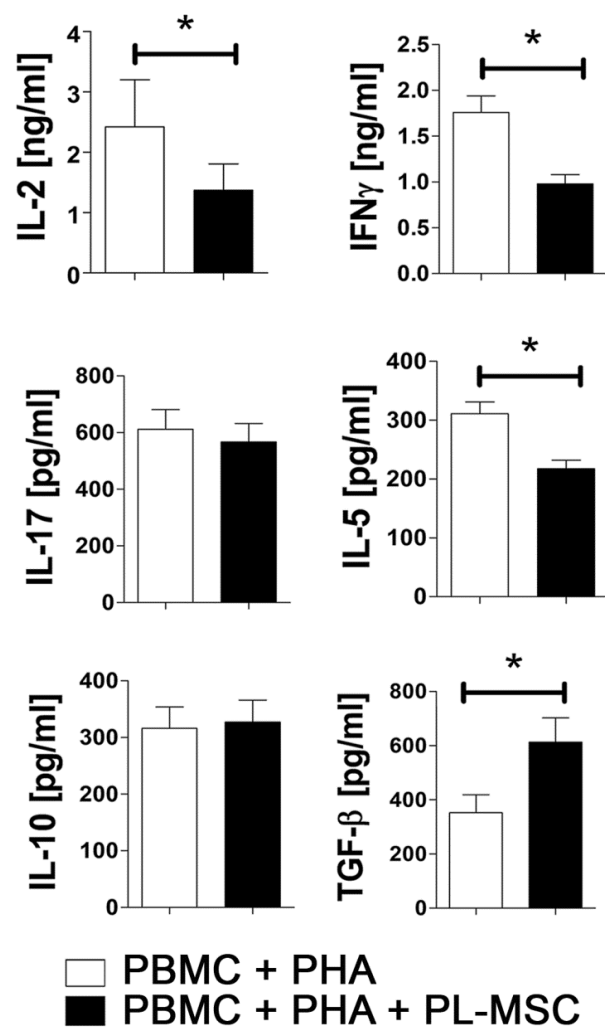
Analizu imunomodulatornih osobina PL-MSC započeli smo ispitivanjem njihovog efekta na proliferaciju alogenih PBMC stimulisanih mitogenom (PHA) (Fig. 20). PL-MSC su tretirane sa mitomicinom C, isprane i zatim ko-kultivisane sa nestimulisanim ili PHA-stimulisanim PBMC. Nasuprot MSC izolovanim iz zdravog dentalnog tkiva, PL-MSC su, bez ikakvog dodatnog tretmana, pokazale snažan inhibitorski efekat na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMC.

Dalje smo ispitivali kako ove ćelije utiču na produkciju citokina od strane ko-kultiviranih PBMC, odnosno kako utiču na razvoj različitih tipova efektorskih CD4<sup>+</sup> T limfocita (Th1, Th2, Th17) / Treg limfocita (Fig. 21). Očekivano, smanjena proliferacija PBMC u ko-kulturi sa ovim MSC bila je praćena i smanjenom produkcijom IL-2 u ko-kulturama. U ko-kulturama PBMC i PL-MSC detektovana je značajno manja koncentracija IL-5 i IFN- $\gamma$ , a koncentracija IL-17 i IL-10 nije bila značajnije izmenjena, u odnosu na kulture samih PBMC. Međutim, u ovim ko-kulturama značajno je porasla količina produkovanog TGF- $\beta$  u poređenju sa kulturama samih PBMC. PL-MSC su i same produkovale visoke količine TGF- $\beta$  (170 $\pm$ 85pg/ml).



**Figura 20.** Efekti PL-MSC na proliferaciju PBMC.

PL-MSC, pre-tretirane mitomicinom, su ko-kultivisane sa nestimulisanim ili PHA-stimulisanim PBMC. Kontrolne PBMC kultivisane su bez PL-MSC. Nakon 3 dana kultivacije merena je proliferacija PBMC (prikazana kao srednja vrednost  $\pm$  SD vrednosti dobijenih iz 3 eksperimenta svaki rađen u duplikatima \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom (Kruskal-Wallis test).



**Figura 21.** Efekti PL-MSC na produkciju citokina od strane PBMC.

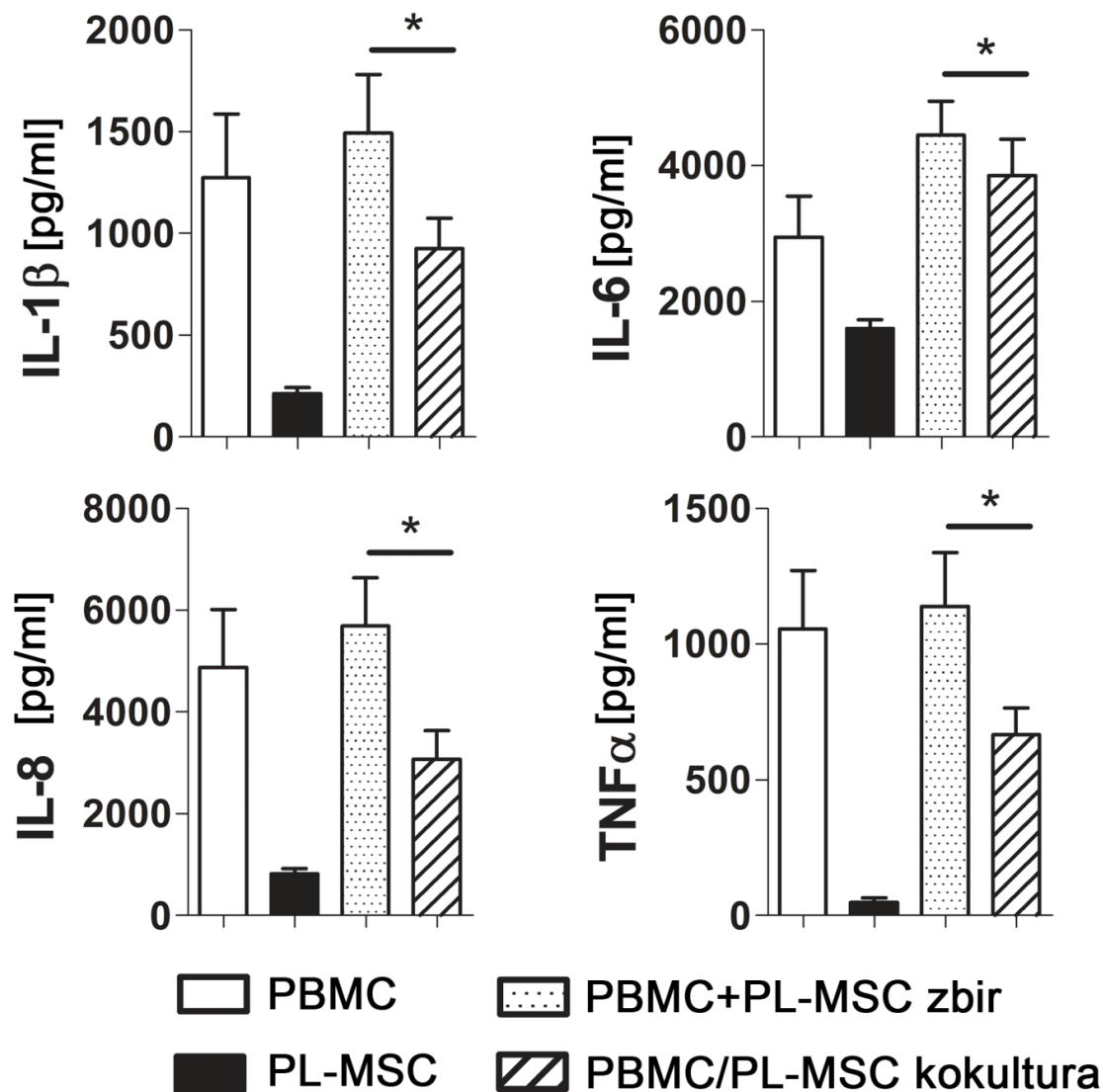
PL-MSC, pre-tretirane mitomicinom, su ko-kultivisane sa nestimulisanim ili PHA-stimulisanim PBMC. Kontrolne PBMC kultivisane su bez PL-MSC. Nakon 3 dana ko-kultivacije/kultivacije merena je produkcija citokina (prikazana kao srednja vrednost  $\pm$  SD vrednosti dobijenih iz 3 eksperimenta svaki rađen u duplikatima). \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom (Kruskal-Wallis test).

#### 4.3.2. Efekat PL-MSC na produkciju citokina od strane alogenih inflamacijskih ćelija periapeksne lezije *in vitro*

Na osnovu prethodnih rezultata koji su pokazali da PL-MSC poseduju snažan anti-proliferativni i anti-inflamatorni efekat u ko-kulturi sa PHA-stimulisanim alogenim PBMC, dalje smo ispitivali da li ove ćelije imaju sličan imunomodulatorni efekat i na produkciju citokina od strane alogenih PL-IC.

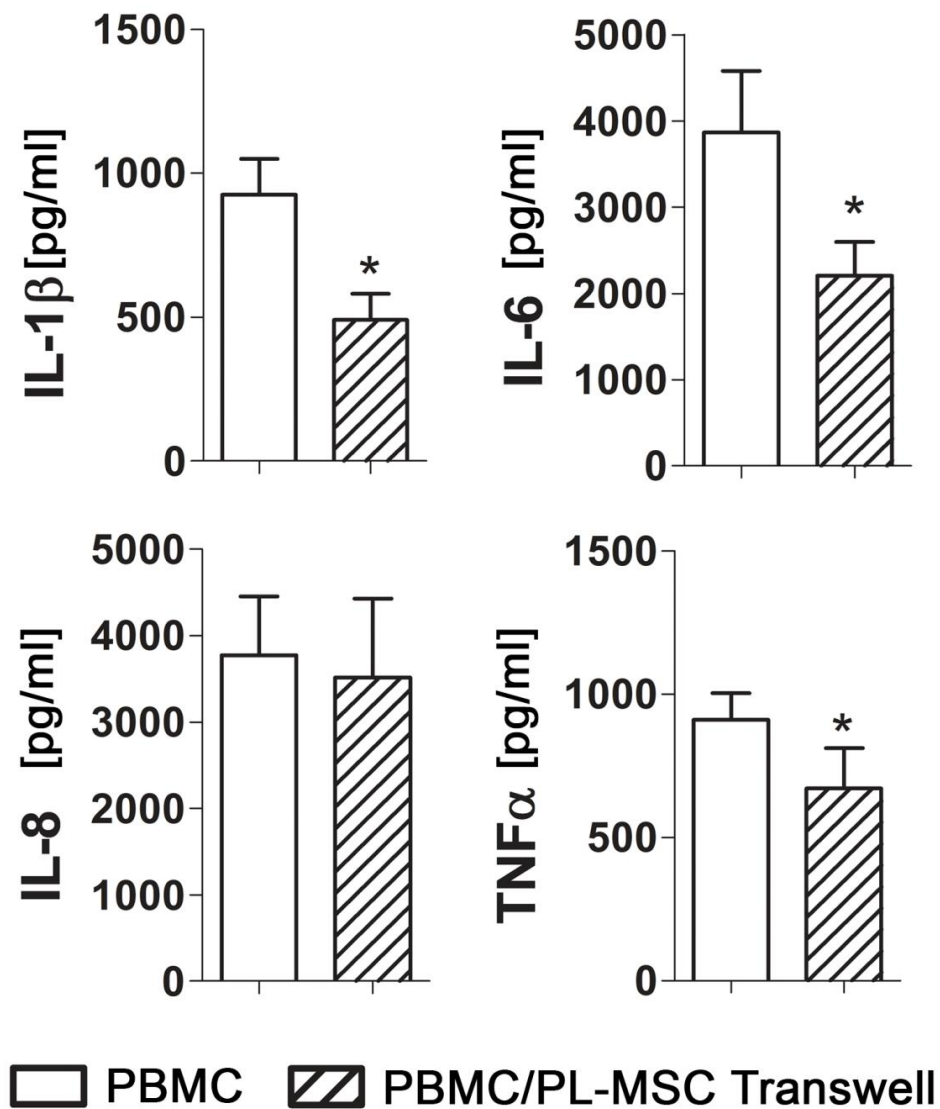
Analizirana je produkcija citokina nakon 24h kultivacije samih PL-IC, samih PL-MSC i ko-kultivacije ova dva tipa ćelija (Fig. 22). Svim kulturama dodat je PMA/Ca<sup>2+</sup> jonofor kao dodatni stimulus za egzocitozu sintetisanih citokina. U ko-kulturama PL-MSC i PL-IC izmerena je značajno manja koncentracija svih testiranih citokina u odnosu na koncentracije citokina koje su dobijene sabiranjem citokina produkovanih u kulturama samih PL-MSC i samih PL-IC. Od testiranih citokina same PL-MSC produkovale su visok nivo IL-6, nešto manje IL-8, malu količinu IL-1 $\beta$ , dok je produkcija TNF- $\alpha$  od strane ovih ćelija bila na donjoj granici detekcije.

Dalje smo ispitivali da li je kontakt između PL-MSC i PL-IC neophodan za opisan efekat na produkciju citokina u ko-kulturi (Fig. 23). PL-IC i PL-MSC su najpre tokom 24h ko-kultivisane u sistemu bez kontakta, nakon toga su PL-MSC otklonjene, a PL-IC sakupljene, isprane, i zatim ponovo kultivisane samostalno. Nakon 24h kultivacije samih i ovako pre-tretiranih PL-IC sakupljeni su supernatanti u kojima je analizirana produkcija citokina. PL-IC pre-tretirane na ovaj način produkovale su značajno manje koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u odnosu na PL-IC kultivisane samostalno od početka eseja. Nije bilo značajne razlike u produkciji IL-8 između pre-tretiranih PL-IC i onih koje su od početka samostalno kultivisane.



**Figura 22.** Efekat PL-MSC na produkciju citokina od strane PL-IC.

PL-MSC su ko-kultivisane sa PL-IC tokom 24h u sistemu direktne ko-kultivacije u odnosu 1/10 (PL-MSC/PL-IC). Kulture samih PL-MSC i samih PL-IC su služile kao kontrole. Produkcija citokina stimulisana je dodatkom PMA (20ng/ml) i  $Ca^{2+}$ -jonofora (1 $\mu$ M). Nivo citokina produkovanih u ko-kulturama PL-MSC/PL-IC upoređivan je sa zbirom produkovanih citokina u kontrolnim kulturama samih PL-MSC i samih PL-IC. Vrednosti su date kao srednja vrednost  $\pm$  SD vrednosti dobijenih iz 5 eksperimenata (korišćene su PL-MSC od dva donora i PL-IC od 5 alogenih donora). \* $p < 0.05$  u poređenju sa sumom citokina (PL-MSC + PL-IC) (Mann-Whitney test).



**Figura 23.** Efekat PL-MSC na produkciju citokina od strane PL-IC.

PL-MSC su ko-kultivisane sa PL-IC tokom 24h u sistemu u kom je sprečen direktan kontakt između ćelija (engl. Transwell). Nakon sakupljanja supernatanta i uklanjanja PL-MSC, PL-IC (kontrolne i one kultivisane sa PL-MSC) su isprane i tretirane sa PMA/CA<sup>2+</sup>-jonoforom tokom narednih 24h nakon čega je merena koncentracija citokina. Kontrolne PL-IC su kultivisane u istom sistemu, po istom postupku, ali bez PL-MSC. Vrednosti su date kao srednja vrednost  $\pm$  SD vrednosti dobijenih iz 5 eksperimenata (korišćene su PL-MSC od dva donora i PL-IC od 5 alogenih donora). \*p < 0.05 u poređenju sa citokina samih PBMC (Mann-Whitney test).

### 4.3.3. Interakcije između PL-MSK i dendritskih ćelija

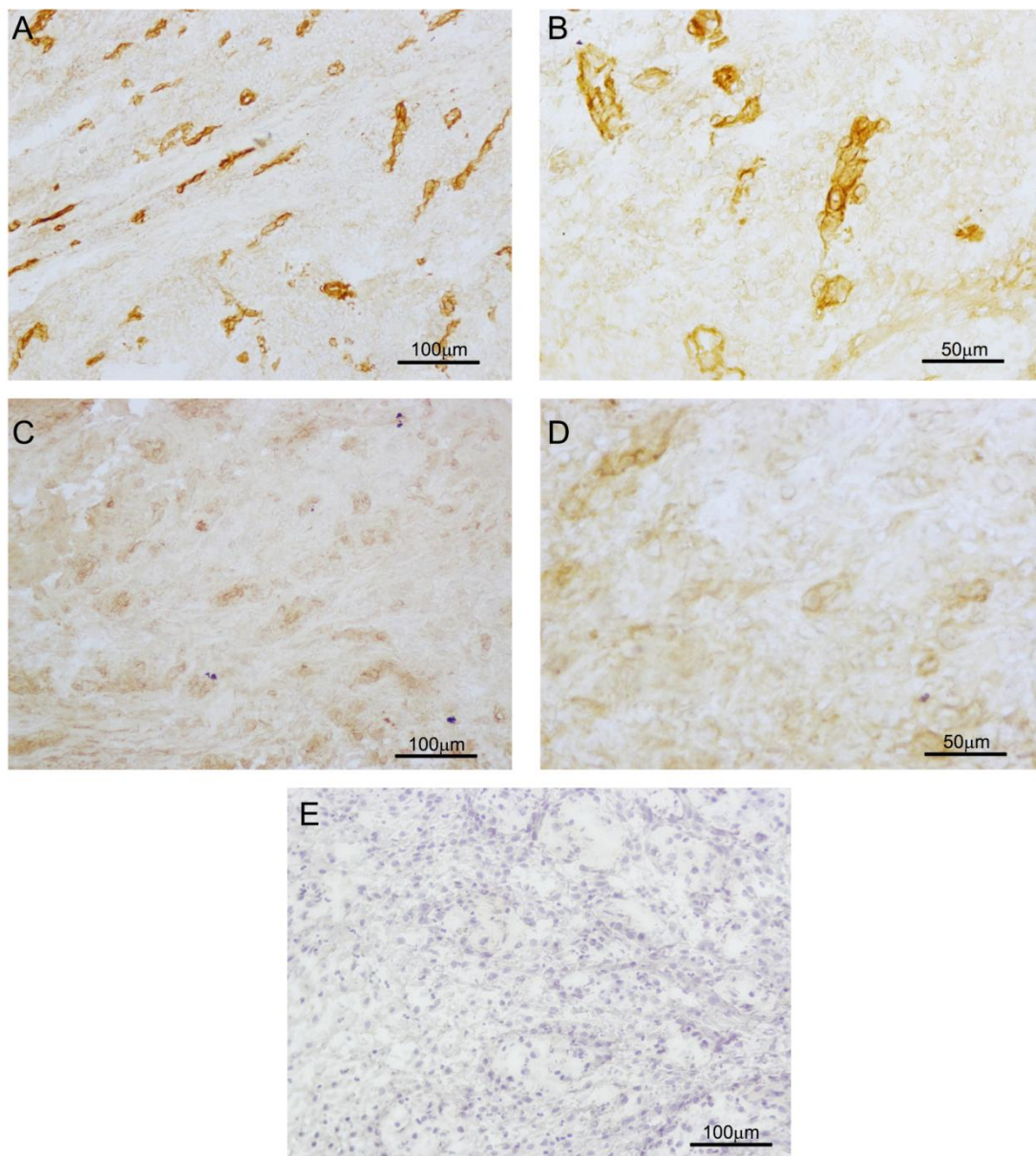
Nakon pokazanog anti-inflamacijskog efekta PL-MSK na PL-IC, naš sledeći cilj je bio da ispitamo potencijal PL-MSK da modifikuju proces dobijanja DC iz monocita periferne krvi u *in vitro* uslovima.

#### 4.3.3.1. Ko-lokalizacija MSK i dendritskih ćelija unutar periapeksne lezije

Na početku ovih istraživanja smo, imunocitohemijskim metodama na presecima periapeksnih lezija, analizirali lokalizaciju i ko-lokalizaciju MSK i DC. Kao pozitivna kontrola za identifikaciju MSK unutar tkiva koristili smo preseke masnog tkiva, jednog od najčešće ispitivanog izvora MSK. Kao markere MSK koristili smo CD146 i STRO-1. Najveći broj ćelija pozitivnih na ove markere bio je lokalizovan u endotelu arteriola i kapilara, ali su ove markere jasno ispoljavale i pojedinačne ćelije u blizini krvnih sudova unutar periapeksnih lezija (Fig. 24). Unutar masnog tkiva, ćelije koje ispoljavaju ove markere su bile slično distribuirane (Fig. 25). Ćelije sa dendritskom morfologijom, pozitivne za HLA-DR i CD209 bile su zastupljene u velikom broju unutar periapeksnih lezija (Fig. 26). Pored podataka o distribuciji pojedinačnih ćelijskih tipova, analizom na konfokalnom mikroskopu smo pokazali da DC, koje smo identifikovali kao HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup> i CD83<sup>+</sup> ćelije, dolaze u interakciju sa CD146<sup>+</sup>, STRO-1<sup>+</sup> MSK (Fig. 27). Interakcije ovih ćelija detektovane su unutar endotela krvnih sudova kao i u njihovoj blizini.

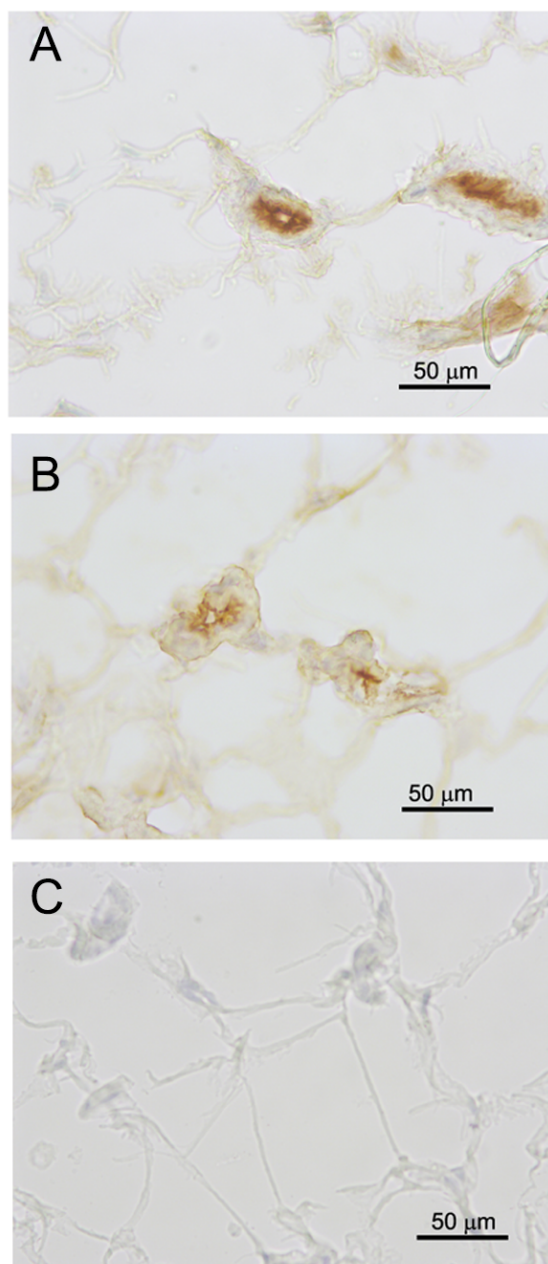
Pošto smo pokazali da unutar periapeksnih tkiva, MSK stupaju u interakcije i sa nezrelim DC identifikovanim kao CD209<sup>+</sup>, i sa zrelim CD83<sup>+</sup> DC, u nastavku smo, na *in vitro* modelu nastanka inflamatornih DC iz monocita periferne krvi, ispitivali da li PL-MSK imaju potencijal da, u zavisnosti od stadijuma razvoja DC, različito modifikuju funkciju ovih ćelija.





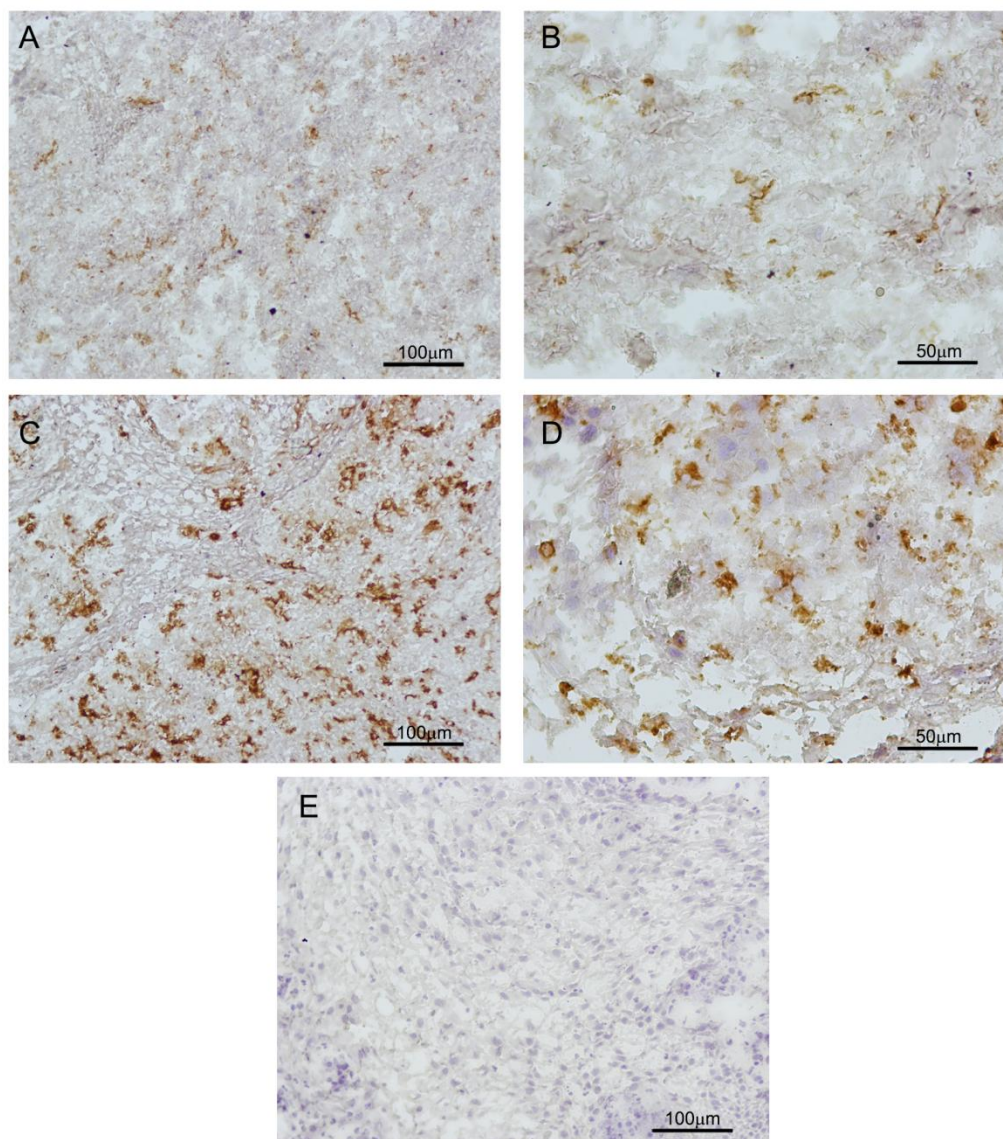
**Figura 24.** Distribucija MSC u periapeksnoj leziji.

Distribucija MSC unutar periapeksne lezije analizirana je nakon bojenja preseka tkiva periapeksnih lezija imunocitohemijskom metodom koja se zasniva na imunoperoksidaznoj reakciji. Braon boja označava ekspresiju CD146 (A, B) odnosno STRO-1 (C, D) na ćelijama. Kontrolni presecci inkubirani su sa irelevantnim antitelom (E). Uveličanje fotografija obeleženih sa A, C i E je 20x, a B i D je 40x.



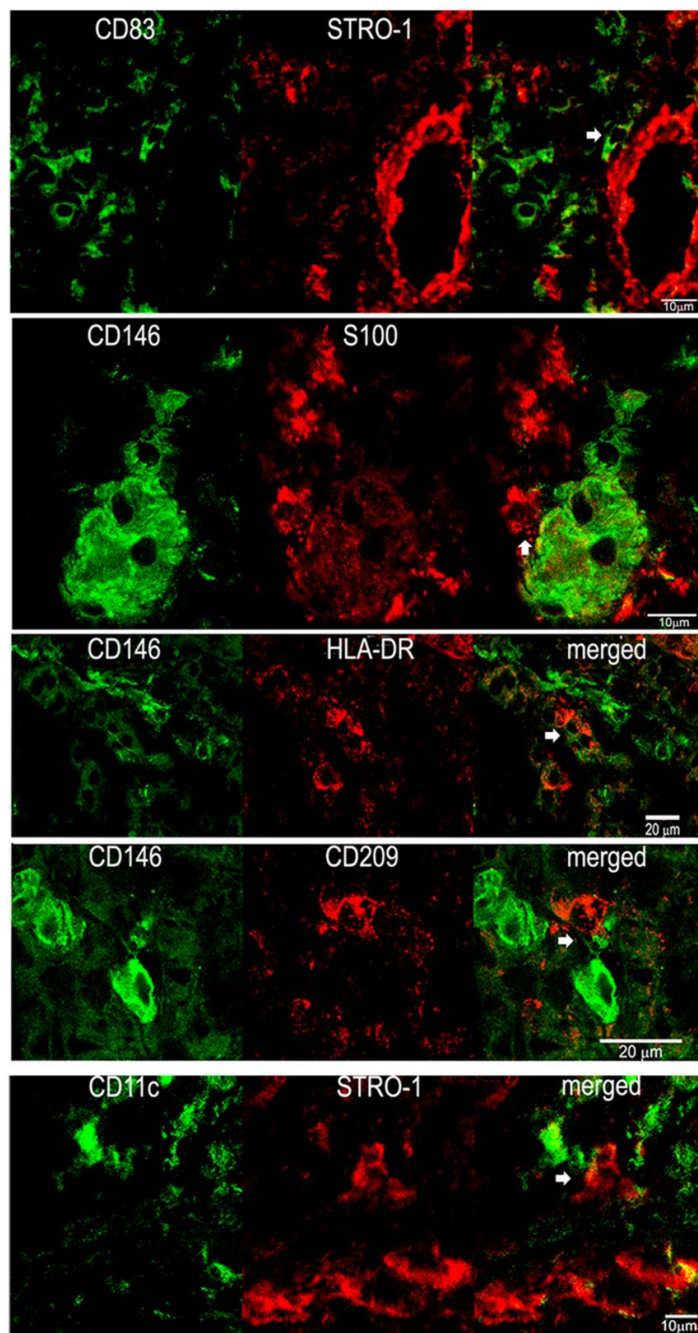
**Figura 25.** Distribucija MSC u masnom tkivu.

Distribucija MSC unutar masnog tkiva analizirana je nakon bojenja preseka tkiva imunocitohemijskom metodom koja se zasniva na imunoperoksidaznoj reakciji. Braon boja označava ekspresiju CD146 (A) odnosno STRO-1 (B) na ćelijama. Kontrolni preseki inkubirani su sa irelevantnim antitelom (C). Uveličanje fotografija je 40x.



**Figura 26.** Distribucija DC u periapeksnoj leziji.

Distribucija DC unutar periapeksne lezije analizirana je nakon bojenja preseka tkiva periapeksnih lezija imunocitohemijskom metodom koja se zasniva na imunoperoksidaznoj reakciji. Braon boja označava ekspresiju CD209 (A) odnosno HLA-DR (B) na ćelijama. Kontrolni preseki inkubirani su sa irelevantnim antitelom (E).



**Figura 27.** Kolokalizacija MSC i DC u periapsnoj leziji.

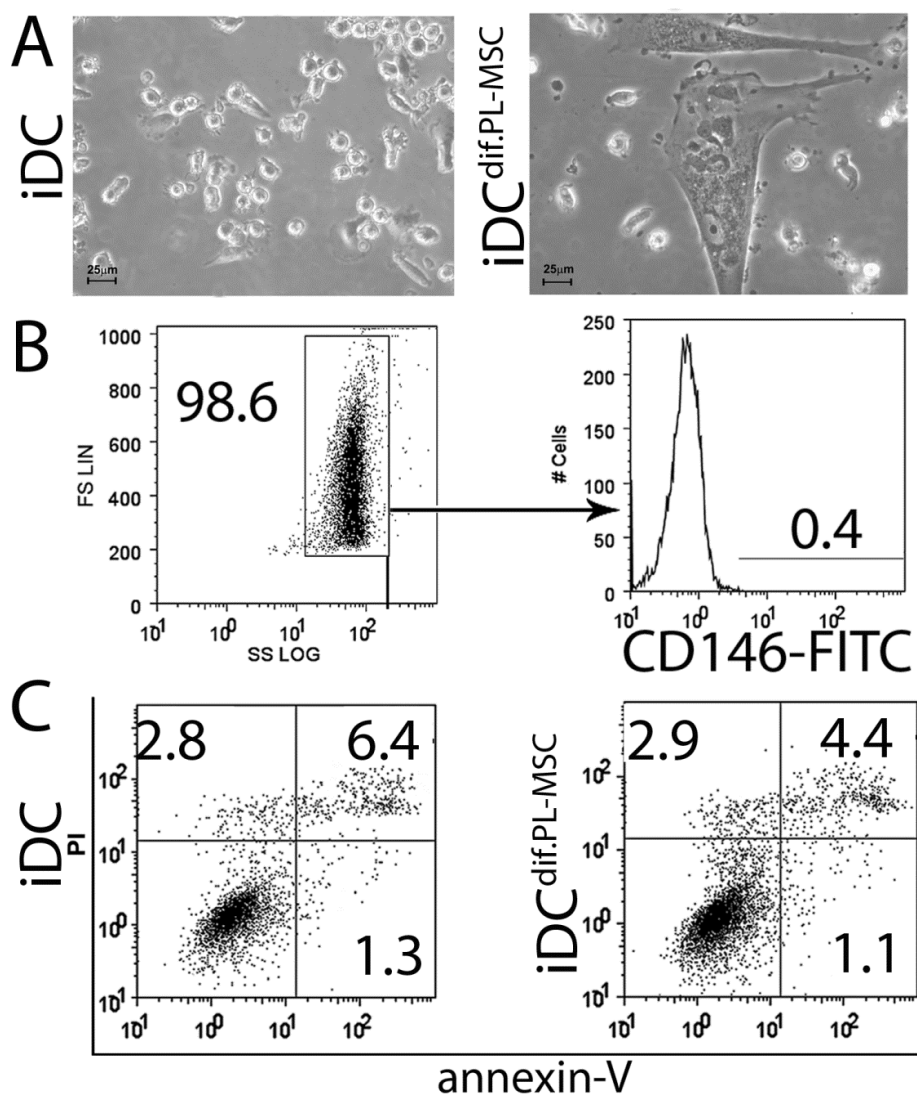
Ko-lokalizacija MSC/DC unutar periapsne lezije analizirana je na prescima koji su istovremeno inkubirani sa antitelima na markere specifične za MSC (STRO-1 i CD146) i DC (CD83, S100, HLA-DR, CD209 i CD11c), na konfokalnom mikroskopu. Bele strelice pokazuju kontakt između dva tipa ćelija.

#### **4.3.3.2. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces diferencijacije dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi *in vitro***

Najpre smo ispitivali osobine DC neposredno nakon faze diferencijacije u toku koje su bile ko-kultivisane sa PL-MSC. Takođe, smo analizirali osobine DC koje su diferencirane sa ili bez PL-MSC, nakon procesa sazrevanja indukovano pro-inflamacijskim koktelom u odsustvu PL-MSC.

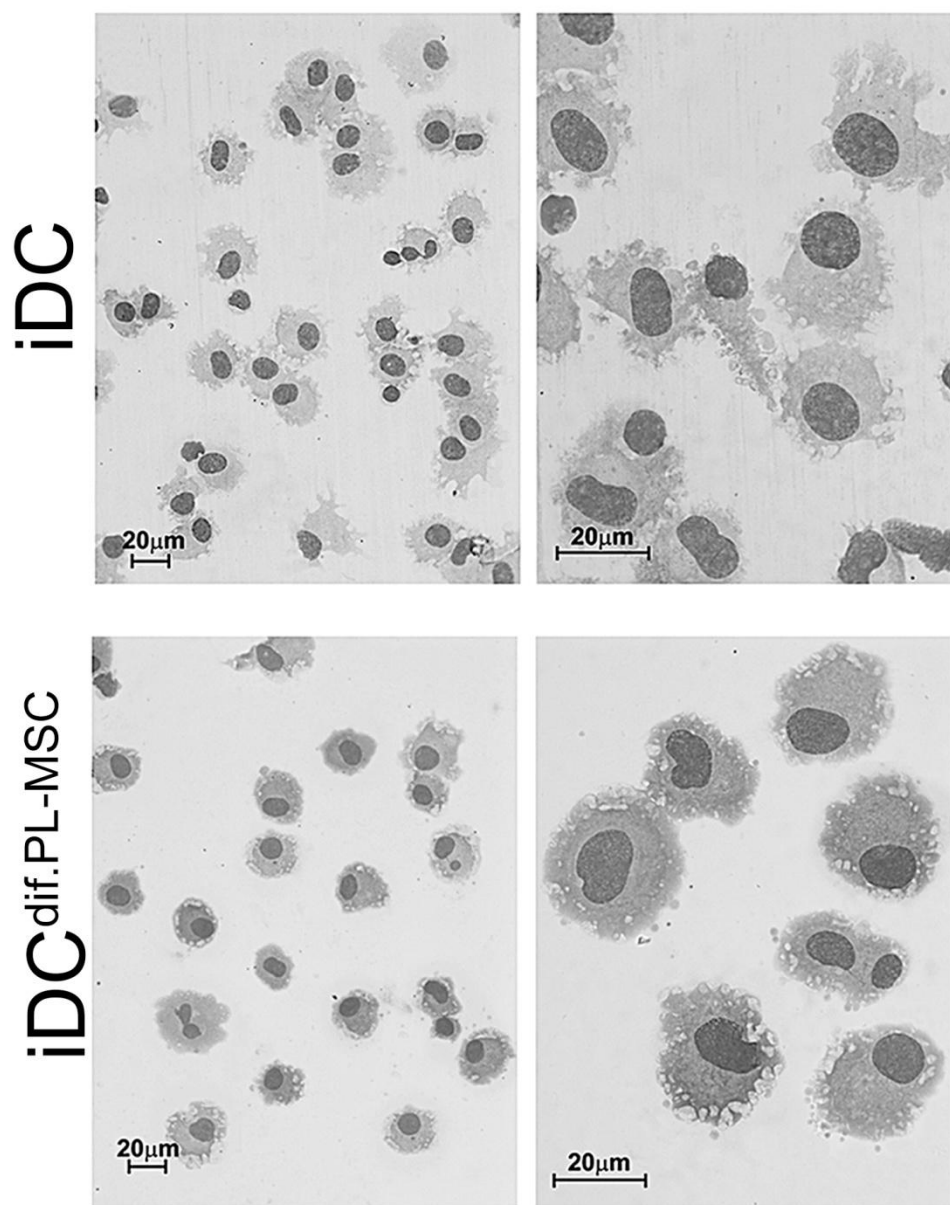
Tokom ko-kultivacije neke od nezrelih DC (iDC) tokom diferencijacije adheriraju na lamelopodijama mnogo većih PL-MSC (Fig. 28A). Nakon 5 dana, pažljivo sakupljene iDC su testirane za ekspresiju CD146 (da bi se uklonila mogućnost kontaminacije PL-MSC). Pošto u suspenziji iDC diferenciranih u prisustvu PL-MNC<sup>+</sup> više od 98% ćelija ne ispoljava ovaj molekul (Fig. 28B) utvrdili smo da se suspenzija sastoji od čiste populacije iDC i da svi efekti ove suspenzije mogu biti okarakterisani kao efekti ovako diferenciranih iDC. Takođe pokazali smo da je u ovoj suspenziji iDC kao i u suspenziji kontrolnih iDC 90% ćelija živo (Fig. 28C).

Analiza svetlosnim mikroskopom iDC u kulturi i iDC obojenih MGG-tehnikom potvrdila je da kontrolne iDC imaju morfologiju nalik flaši sa mnogobrojnim izduženim nastavcima što odgovara karakteristikama iDC (Fig. 29). Za razliku od kontrolnih iDC, oko 40% iDC diferenciranih u prisustvu PL-MSC (citospinovi napravljeni od suspenzija sakupljenih iz ko-kultura 5 različitih DC/PL-MSC parova analizirani su na 10 različitih vidnih polja) imalo je morfologiju nalik makrofagama. Ove ćelije su bile zaobljene, bez nastavaka, i u njihovoj citoplazmi bio je primetan veliki broj vezikula. Pored morfologije koja je ukazivala na poremećen proces diferencijacije DC u prisustvu PL-MSC, ove iDC ispoljavale su i viši nivo CD14 i niži nivo CD86 u poređenju sa kontrolnim iDC (Fig. 30). Ekspresija CD1a i HLA-DR na ovim ćelijama bila je slična kao kod kontrolnih iDC, a unutar CD14<sup>+</sup> populacije iDC diferenciranih u prisustvu PL-MSC identifikovane su i ćelije koje ispoljavaju i one koje ne ispoljavaju CD1a (Fig. 30). Da bi smo ispitali da li su PL-MSC ovakav supresivan efekat na diferencijaciju iDC ostvarile posredstvom solubilnih faktora, paralelno smo proces diferencijacije monocita do iDC indukovali u medijumu koji je



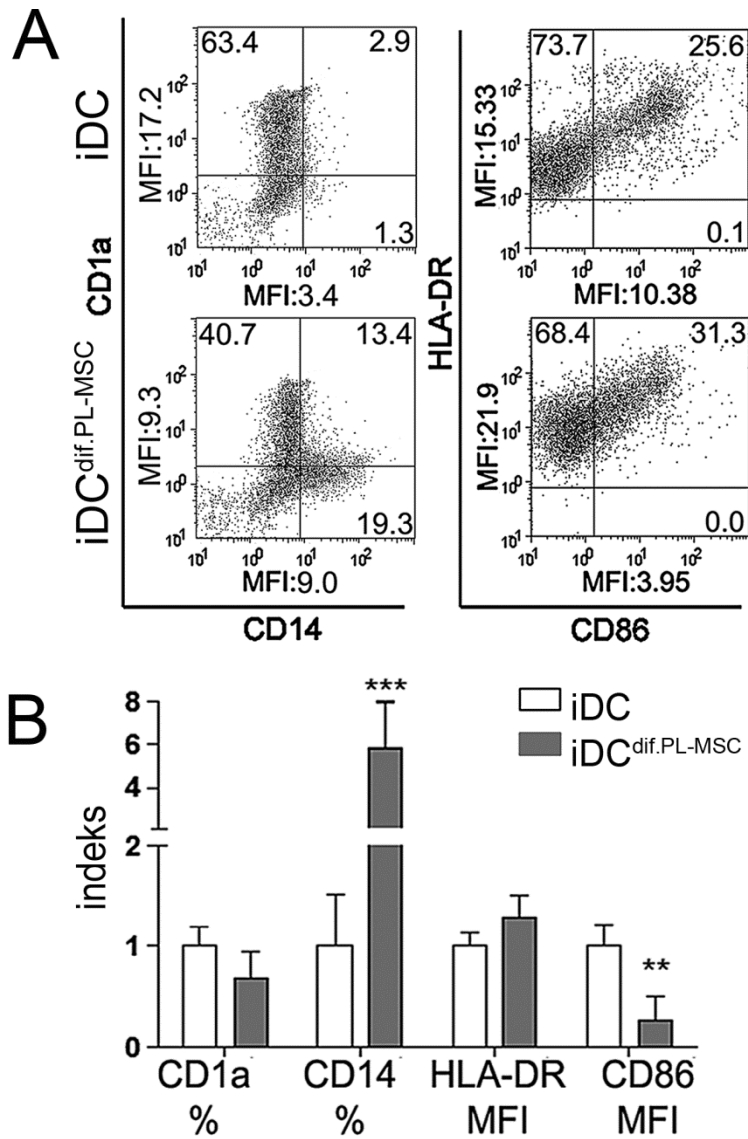
**Figura 28.** Diferencijacija monocita u DC u prisustvu PL-MSC.

Monociti su diferencirani u prisustvu PL-MSC u iDC<sup>dif.PL-MSC</sup> ili bez PL-MSC u iDC, i nakon 5. dana (A) Fazno-kontrastnom mikroskopijom je analiziran izgled kultura/ko-kultura. Nakon toga iDC i iDC<sup>dif.PL-MSC</sup> su sakupljene blagim pipetiranjem, nakon čega je analizirano prisustvo (B) PL-MSC (CD146<sup>+</sup> ćelija) u suspenzi iDC<sup>dif.PL-MSC</sup> na FACS-u (C) nevijabilnih ćelija u suspenziji kontrolnih iDC odnosno iDC<sup>dif.PL-MSC</sup>, PI/aneksin-V bojenjem i analizom na FACS-u.



**Figura 29.** Uticaj PL-MSC na proces diferencijacije monocita u DC.

Monociti su diferencirani u prisustvu PL-MSC u iDC<sup>dif.PL-MSC</sup> ili bez PL-MSC u iDC, i zatim su obojeni MGG-tehnikom i analizirani na svetlosnom mikroskopu.



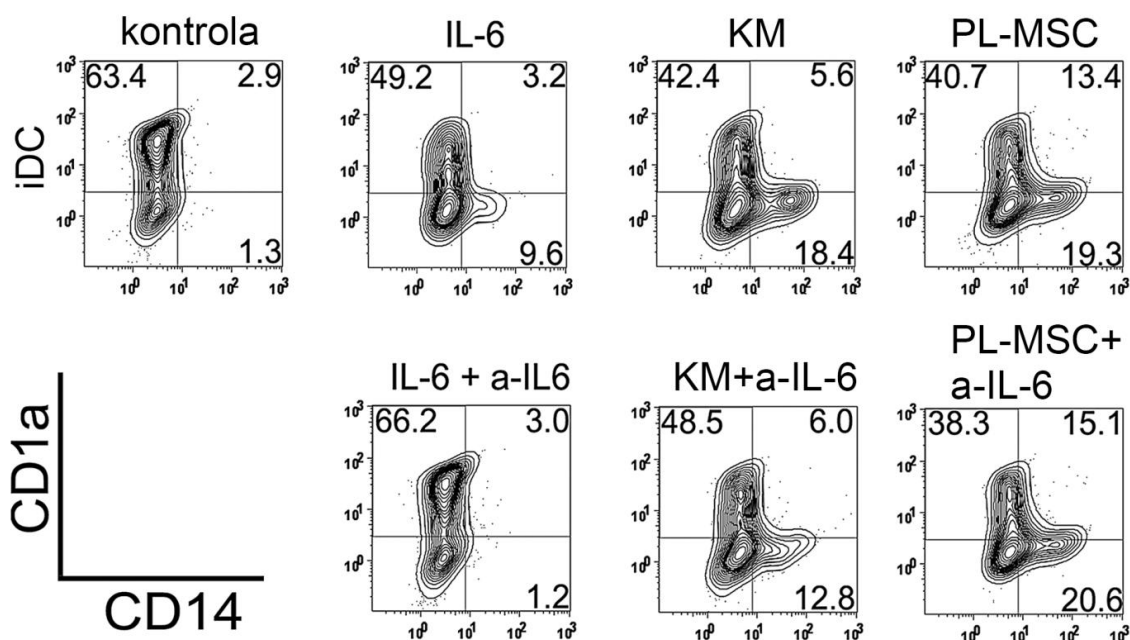
**Figura 30.** Uticaj PL-MSC na proces diferencijacije monocita u DC.

Monociti su diferencirani u prisustvu PL-MSC u iDC<sup>dif.PL-MSC</sup> ili bez PL-MSC u iDC, i zatim su dvostruko obojeni kombinacijom antitela na CD14/CD1a i CD86/HLA-DR i analizirani na FACS-u. Prikazani su (A) paneli za jedan reprezentativni DC/PL-MSC par i (B) grafikon sa srednjim indeksima  $\pm$  SD za svih 8 DC/PL-MSC parova. Formula za izračunavanje indeksa data je u odeljku Materijal i metode.



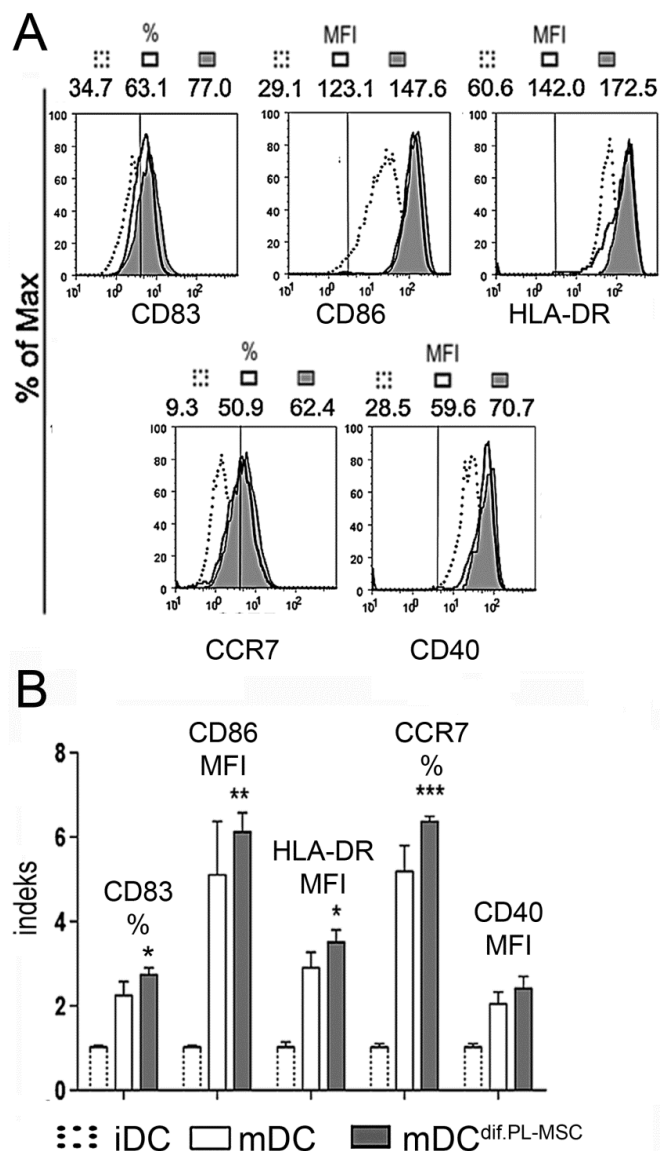
sakupljen iz čistih kultura PL-MSC. Analizom ekspresije CD1a i CD14 na ovako diferenciranim iDC, pokazali smo da kondicionirani medijum snažno remeti proces diferencijacije monocita u smeru iDC, ali je ipak efekat ovog medijuma bio nešto slabiji u odnosu na efekat PL-MSC u ko-kulturi (Fig. 31). Kako smo u eksperimentima sa PL-IC pokazali da PL-MSC proizvode značajne količine IL-6, a ranije je pokazano da ovaj citokin može delovati supresivno na proces diferencijacije monocita do iDC [511], dodavanjem neutralizirajućeg anti-IL-6 antitela kulturama monocita i PL-MSC ispitivali smo da li ovaj molekul posreduje u zapaženom supresivnom efektu. Ovo antitelo pokazalo je sposobnost da u potpunosti neutrališe inhibitorski efekat rekombinantnog IL-6 koji smo u koncentraciji od 10ng/ml dodali samim monocitima kultivisanim u medijumu za diferencijaciju DC. Ova koncentracija dodatog IL-6 bila je mnogo veća od koncentracije IL-6 izmerenih u kondicioniranom medijumu (5.3 ng/ml kod PL-MSC jednog i 6.6 ng/ml kod PL-MSC drugog donora). Međutim, anti-IL-6 antitelo je samo parcijalno dovelo do prevazilaženja inhibitorskog efekta koji je kondicionirani medijum ispoljio na proces diferencijacije iDC, dok nije imalo nikakvog efekta na proces diferencijacije monocita u iDC u prisustvu PL-MSC.

Prethodno su *Jiang i saradnici* [411] pokazali da je proces sazrevanja poremećen kod DC koje su diferencirane u prisustvu BM-MSC. Da bi smo ispitali da li i PL-MSC imaju sposobnost da prisustvom samo tokom faze diferencijacije monocita u iDC poremete dalji proces sazrevanja ovih ćelija, izložili smo ove i kontrolne iDC pro-inflamacijskom koktelu (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i PGE2) tokom dva dana. Kao što smo i očekivali, pro-inflamacijski koktel doveo je do snažnog povećanja ekspresije CD83, CD86, HLA-DR, CCR7 i CD40 kod kontrolnih DC (Fig. 32A i B). Međutim, ovaj koktel je doveo do slične, čak i nešto jače ekspresije većine testiranih markera kod DC koje su diferencirane u prisustvu PL-MSC, u poređenju sa kontrolnim zrelim DC. Takođe, kontrolne mDC (medijana (opseg) pg/ml: IL-10 26.6 (0-276.2), IL-12 295.1 (49.7-619.7), IL-27 1862.9 (454.6-2003.9), IL-23 114.1 (32.2-455.4)) i DC diferencirane u prisustvu PL-MSC mDC (medijana (opseg) pg/ml: IL-10 43.4 (0-442.0), IL-12 342.9 (55.7-743.7), IL-27 1763.5 (545.8-2224.3), IL-23 112.1 (10.9-633.2)) su imale sličnu sposobnost za produkciju citokina (Fig. 33) od kojih zavisi



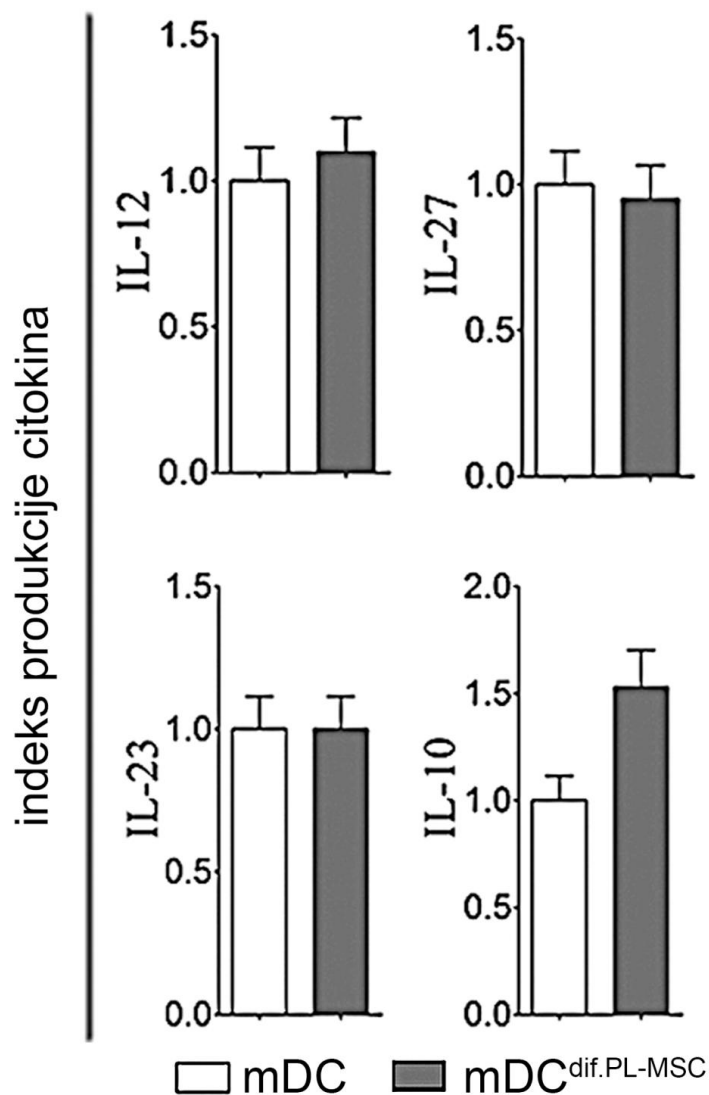
**Figura 31.** Uticaj PL-MSC na proces diferencijacije monocita u DC.

Monociti su diferencirani u prisustvu PL-MSC, u kondicioniranom medijumu (KM) ili u kontrolnom medijumu sa dodatkom rekombinantnog IL-6. Sve kulture paralelno su postavljene sa dodatkom anti-IL-6 antitela. Kontrolne iDC diferencirane su u kontrolnom medijumu za diferencijaciju bez drugih dodataka. Nakon 5 dana kulture, ćelije su sakupljene i dvostruko obojene kombinacijom antitela na CD14/CD1a i analizirane na FACS-u.



**Figura 32.** Fenotip mDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc.

Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture bez PL-MSc indukovano je sazrevanje iDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc (mDC<sup>dif.PL-MSc</sup>) ili kontrolnih iDC (mDC). FACS-analiza fenotipa DC prikazana je (A) kao panel histograma koji pokazuju ekspresiju markera od strane jednog reprezentativnog donora DC (mDC i mDC<sup>dif.PL-MSc</sup>) i (B) kao srednji indeksi ekspresije markera  $\pm$  SD za 6 PL-MSc/DC parova. Ekspresija markera od strane iDC koje su još dodatna dva dana bile kultivisane bez pro-inflamacijskog koktela ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane mDC i mDC<sup>dif.PL-MSc</sup> za svakog donora.



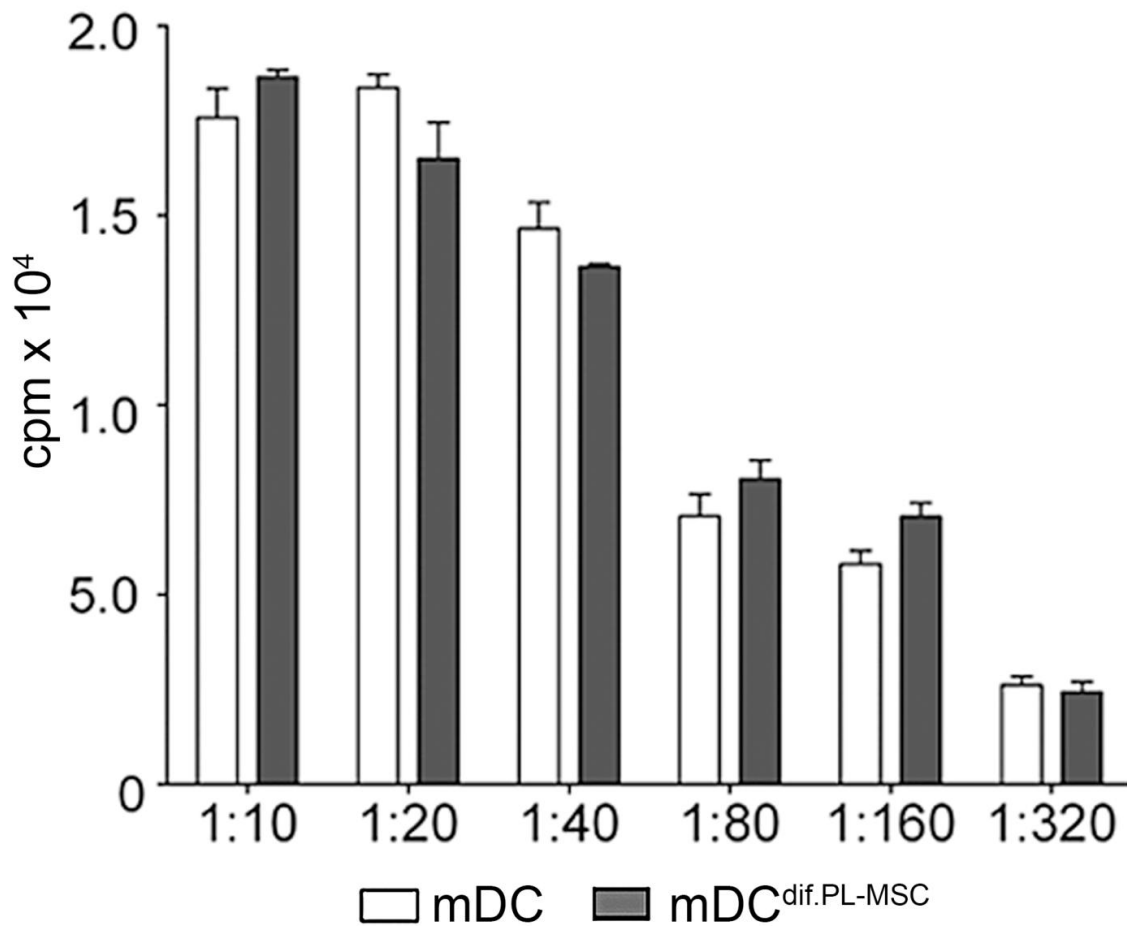
**Figura 33.** Produkcija citokina od strane mDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc.

Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture bez PL-MSc indukovano je sazrevanje iDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc (mDC<sup>dif.PL-MSc</sup>) ili kontrolnih iDC (mDC). Produkcija citokina od strane mDC i mDC<sup>dif.PL-MSc</sup> je prikazana kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-MSc/DC parova.

njihov kapacitet za polarizaciju odgovora efektorskih T limfocita. Da bi se za potrebe analize zanemarile razlike u produkciji citokina između različitih donora, produkciju citokina izrazili smo preko indeksa (pri čemu je indeks produkcije citokina za svakog pojedinačnog donora periferne krvi izračunat tako što su vrednosti citokina koje su proizvele mDC diferencijirane od monocita jednog donora u prisustvu PL-MSC podeljene vrednostima citokina koje su proizvele kontrolne mDC istog donora. Indeks produkcije citokina kontrolnih DC je 1 i sa njim je upoređivana srednja vrednost indeksa svih donora monocita/donora PL-MSC). U skladu sa fenotipom i produkcijom citokina, nije bila izmenjena ni sposobnost mDC diferencijiranih u prisustvu PL-MSC da stimulišu proliferaciju alogeničnih CD4<sup>+</sup> T limfocita, u poređenju sa kontrolnim zrelim DC (Fig. 34). Da bi smo ispitali da li je došlo do promene u sklonosti mDC diferencijiranih u prisustvu PL-MSC da indukuju diferencijaciju određenog tipa efektorskih CD4<sup>+</sup> T limfocita, merili smo produkciju citokina nakon 5 dana ko-kulture DC i CD4<sup>+</sup> T limfocita u odnosu 1:10 (Fig. 35). Iako nije bilo razlike u fenotipu, produkciji citokina i alostimulatornoj sposobnosti, indeksi produkcije citokina u ko-kulturama ukazuju na to da su mDC diferencijirane u prisustvu PL-MSC stimulisale značajno veću produkciju IL-4 (medijana (opseg) pg/ml: 1929.2 (998.4-2530.7)) i IL-17 (medijana (opseg) pg/ml: 663.4 (112.7-1120.4)) u poređenju sa kontrolnim mDC IL-4 (medijana (opseg) pg/ml: 981.7 (525.6-1265.9)) i IL-17 (medijana (opseg) pg/ml: 381.7 (59.0-727.4)).

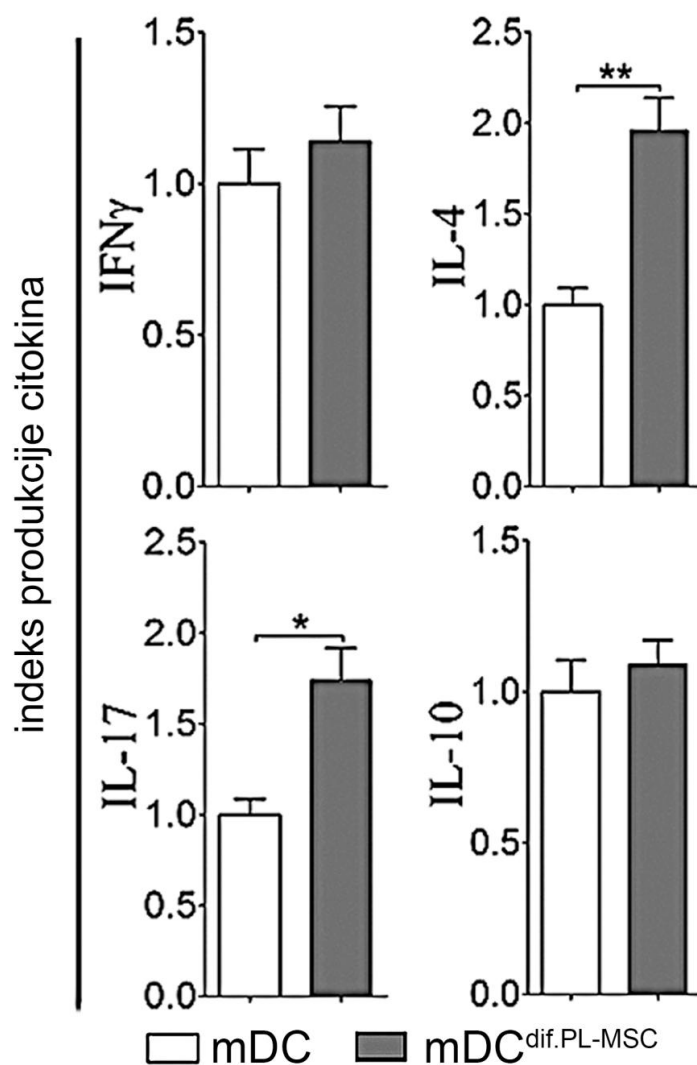
#### **4.3.3.3. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces sazrevanja dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi *in vitro***

Zatim smo analizirali kakav efekat PL-MSC ispoljavaju na već diferencijirane, kontrolne iDC, tokom faze sazrevanja indukovane pro-inflamacijskim koktelom. Nekoliko autora je pokazalo da MSC izolovane iz zdravog adultnog tkiva nemaju značajan efekat na proces sazrevanja DC kada je proces diferencijacije iDC iz prekursora već završen [413, 512]. Da bi smo proverili da li su i PL-MSC u ovom smislu neutralne, kontrolne iDC kultivisali smo, pod uticajem pro-inflamacijskog koktela, u prisustvu ili bez PL-MSC. mDC koje su tokom sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC ispoljavale su značajno viši nivo CD83, CD86, HLA-DR, CCR7 i CD40 u poređenju sa kontrolnim mDC (Fig. 36). Ove DC proizvele



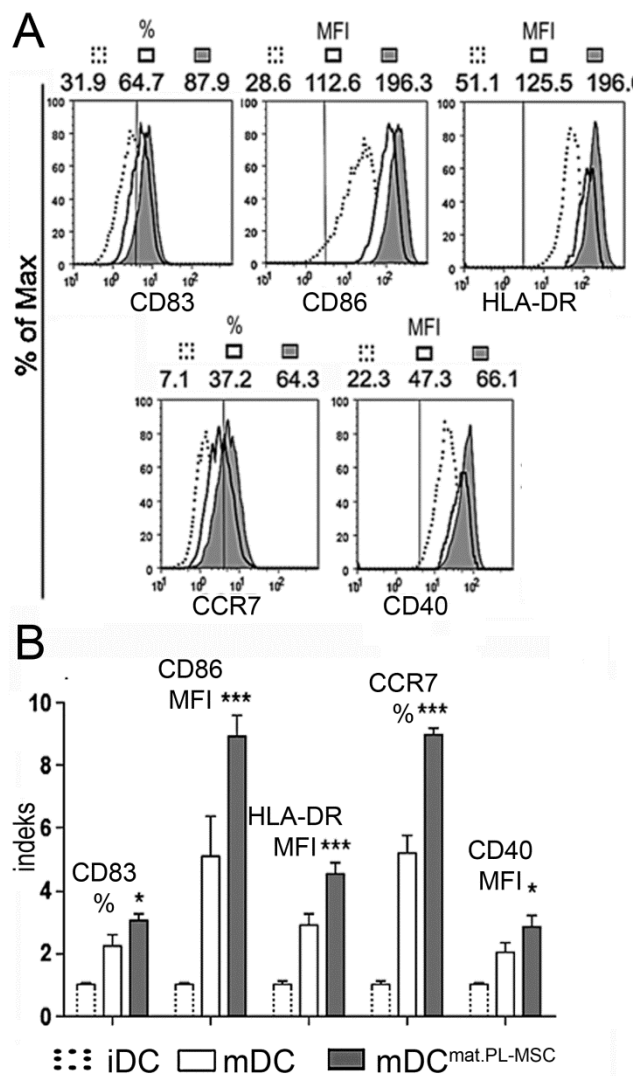
**Figura 34.** Alostimulatorna sposobnost mDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc.

Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture bez PL-MSc indukovano je sazrevanje iDC diferentovanih u prisustvu PL-MSc (mDC<sup>dif.PL-MSc</sup>) ili kontrolnih iDC (mDC). Alostimulatorni kapacitet mDC i mDC<sup>dif.PL-MSc</sup> je analiziran kultivacijom ovih ćelija u različitom broju (od  $1 \times 10^4$  do  $0.031 \times 10^4$ /po bazenu) sa  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment kao srednja vrednost  $\pm$  SD šestoplikata, od 6 urađenih eksperimenata sa različitim DC/PL-MSc parovima donora.



**Figura 35.** Potencijal mDC diferentovanih u prisustvu PL-MSC za polarizaciju Th odgovora.

Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture bez PL-MSC indukovano je sazrevanje iDC diferentovanih u prisustvu PL-MSC (mDC<sup>dif.PL-MSC</sup>) ili kontrolnih iDC (mDC). Analiziran je citokinski profil u ko-kulturama DC/CD4<sup>+</sup> T limfocita u odnosu 1:10, nakon tretmana kombinacijom PMA/A23187, i rezultati su prikazani kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-MSC/DC parova. Indeksi su računati za svakog donora deljenjem koncentracije citokina izmerene u supernatantu eksperimentalnog sa koncentracijom citokina u kontrolnom uzorku. \*p<0.05, \*\*p<0.01 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 36.** Fenotip mDC koje su samo u fazi sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

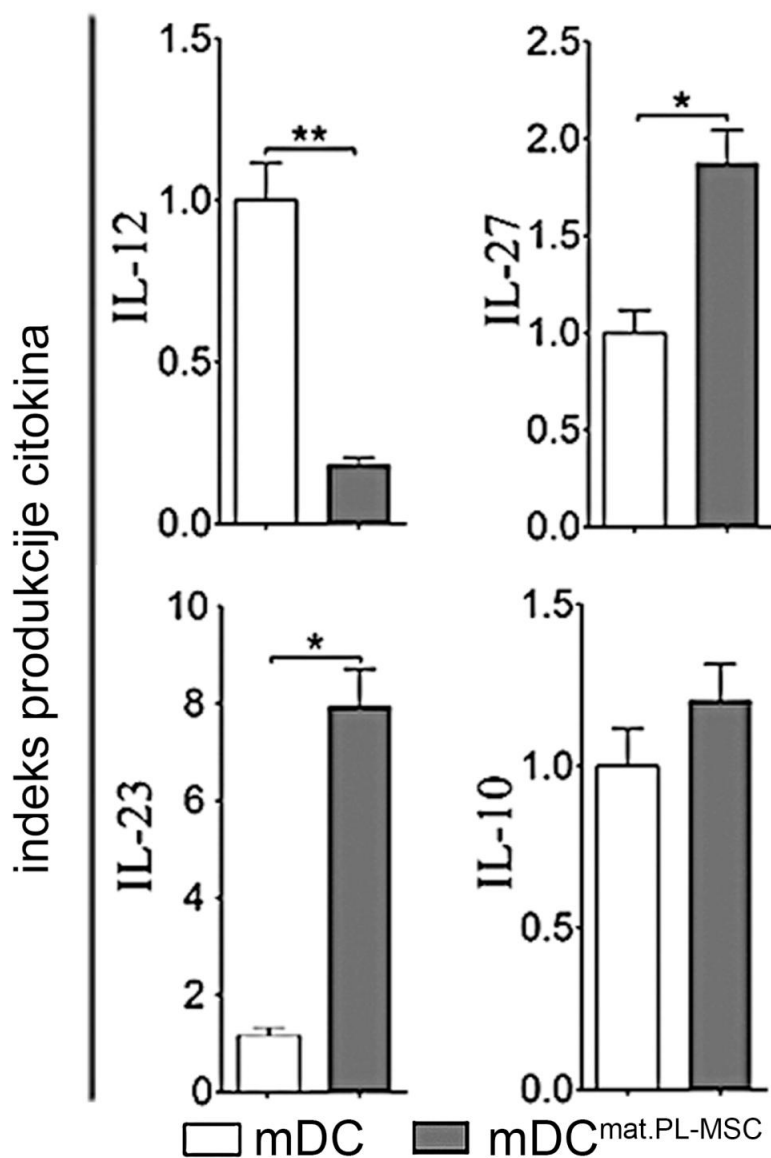
Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture u prisusvtu (mDC<sup>mat.PL-MSC</sup>) ili bez PL-MSC (mDC) indukovano je sazrevanje već diferentovanih iDC (diferentovanih bez PL-MSC). FACS-analiza fenotipa DC prikazana je (A) kao panel histograma koji pokazuju ekspresiju markera od strane jednog reprezentativnog donora DC (mDC<sup>mat.PL-MSC</sup>) i (B) kao srednji indeksi ekspresije markera  $\pm$  SD za 6 PL-MSC/DC parova. Ekspresija markera od strane iDC koje su još dodatna dva dana bile kultivisane bez pro-inflamacijskog koktela ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane mDC i mDC<sup>dif.PL-MSC</sup> za svakog donora. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



su značajno više IL-27 (medijana (opseg) pg/ml: 3358.8 (863.7-4853.6)) i IL-23 (medijana (opseg) pg/ml: 890.3 (231.8-3644.0)), mada je njihova sposobnost za produkciju IL-12 (medijana (opseg) pg/ml: 53.7 (0-108.7)) bila oslabljena, u poređenju sa kontrolnim mDC ((medijana (opseg) pg/ml: IL-27 1763.5 (545.8-2224.3), IL-23 112.1 (10.9-633.2), IL-12 342.9 (55.7-743.7)) (Fig. 37). Zanimljivo je da je pro-inflamacijski koktel indukovao produkciju IL-27 od strane PL-MSC, dok nivo produkcije ostalih citokina od strane ovih MSC nije bio izmenjen (Fig. 38). Takođe, DC koje su u fazi sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC stekle su značajno snažniji alostimulatorni kapacitet (Fig. 39). Iako je potencijal za produkciju IL-12 od strane mDC koje su tokom faze sazrevanja bile izložene PL-MSC bio značajno oslabljen u odnosu na kontrolne mDC, one su pokazale značajno veći potencijal da usmere diferencijaciju CD4<sup>+</sup> limfocita u ko-kulturi u Th1. U ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> limfocitima, ove mDC su indukovale značajno veću produkciju IFN $\gamma$  (medijana (opseg) pg/ml: 32422.1(9557.8-56355.4)), i značajno inhibirale produkciju IL-4 (medijana (opseg) pg/ml: 407.8 (51.1-527.1)) i IL-10 (medijana (opseg) pg/ml: 328.2(0-402.3)), u poređenju sa kontrolnim mDC ((medijana (opseg) pg/ml: IFN- $\gamma$  13081.7 (5030.3-26343.5), IL-4 981.7 (525.6-1265.9), IL-10 543.9 (92.2-724.2)) (Fig. 40).

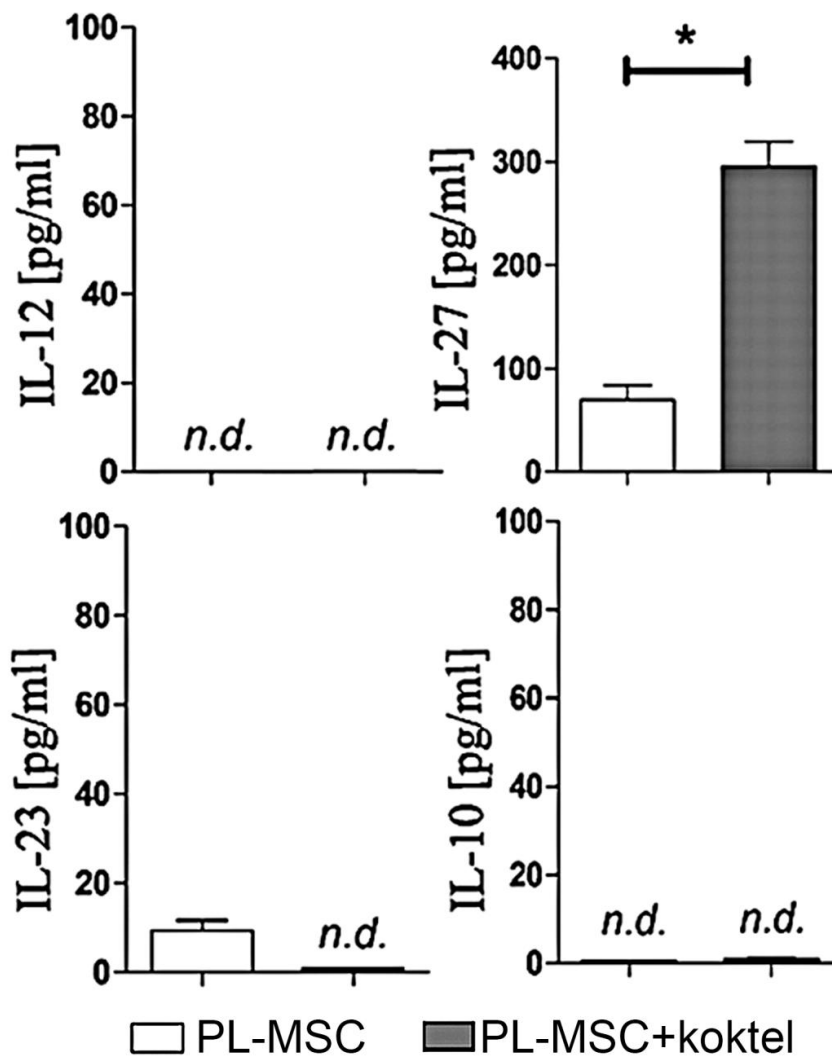
#### **4.3.3.4. Imunomodulatorni efekat PL-MSC na proces diferencijacije i sazrevanja dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi *in vitro***

Na kraju smo ispitivali i osobine mDC koje su tokom čitavog procesa dobijanja (i tokom faze diferentovanja i tokom faze sazrevanja) bile izložene direktnom uticaju PL-MSC (mDC dobijene u prisustvu PL-MSC). Ovako dobijene mDC ispoljavale su značajno viši nivo svih testiranih markera osim CD86 (Fig. 41). Takođe, one su produkovale nešto niže koncentracije IL-10 u poređenju sa kontrolnim zrelim DC, i nije bio izmenjen njihov kapacitet za produkciju ostalih testiranih citokina, IL-12, IL-27 i IL-23 (Fig. 42). Uprkos ovakvom fenotipu i kapacitetu za produkciju citokina koji ukazuje na pro-inflamacijski status mDC dobijenih u prisustvu PL-MSC, one su se pokazale kao slabiji stimulatori proliferacije CD4<sup>+</sup> T limfocita u poređenju sa kontrolnim mDC (Fig. 43). Takođe, u petodnevnim ko-kulturama ovako dobijenih mDC i alogeni CD4<sup>+</sup> T limfocita detektovana je značajno veća koncentracija IL-4 u poređenju sa kontrolnim mDC. Istovremeno nije



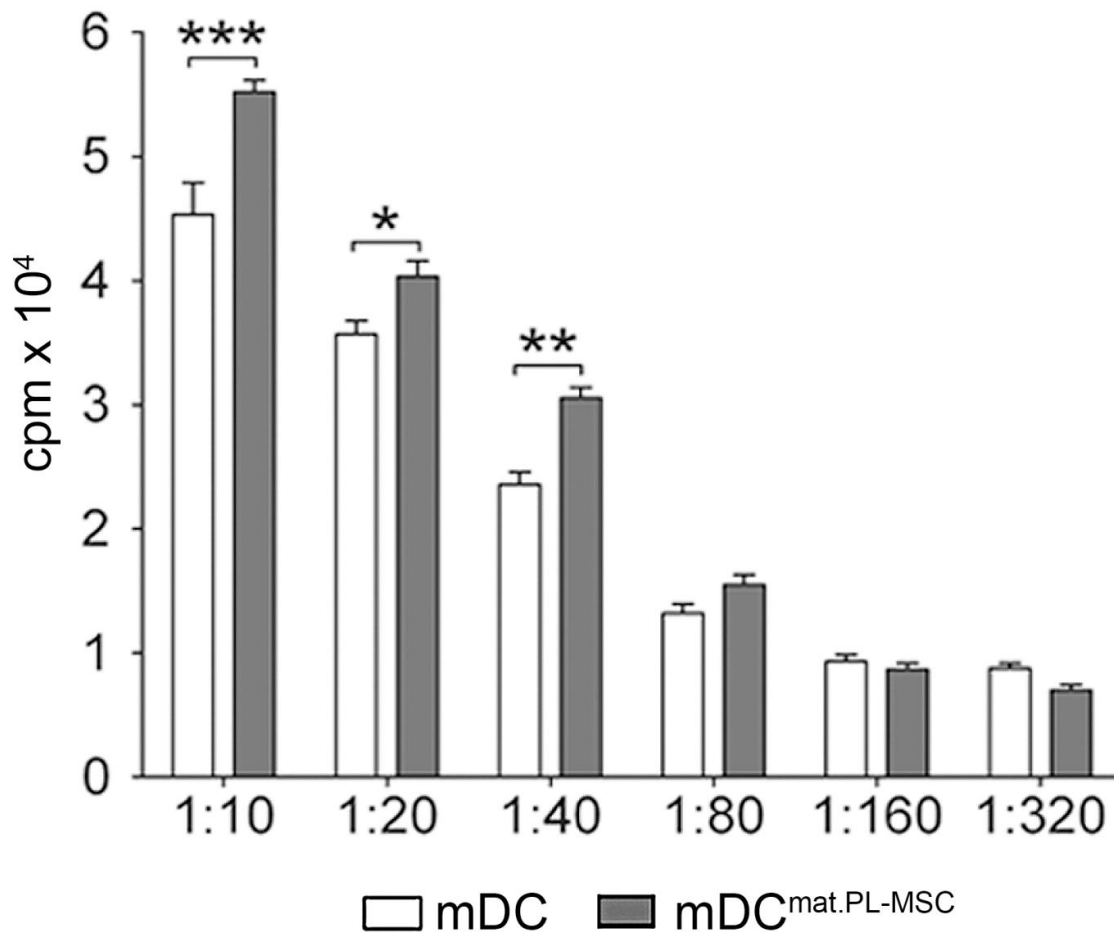
**Figura 37.** Produkcija citokina od strane mDC koje su samo u fazi sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

Dodavanjem pro-upaljnog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture u prisustvu (mDC<sup>mat.PL-MSC</sup>) ili bez PL-MSC (mDC) indukovano je sazrevanje već diferenciranih iDC (diferenciranih bez PL-MSC), nakon čega su analizirane. Produkcija citokina od strane mDC i mDC<sup>mat.PL-MSC</sup> je prikazana kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-MSC/DC parova. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



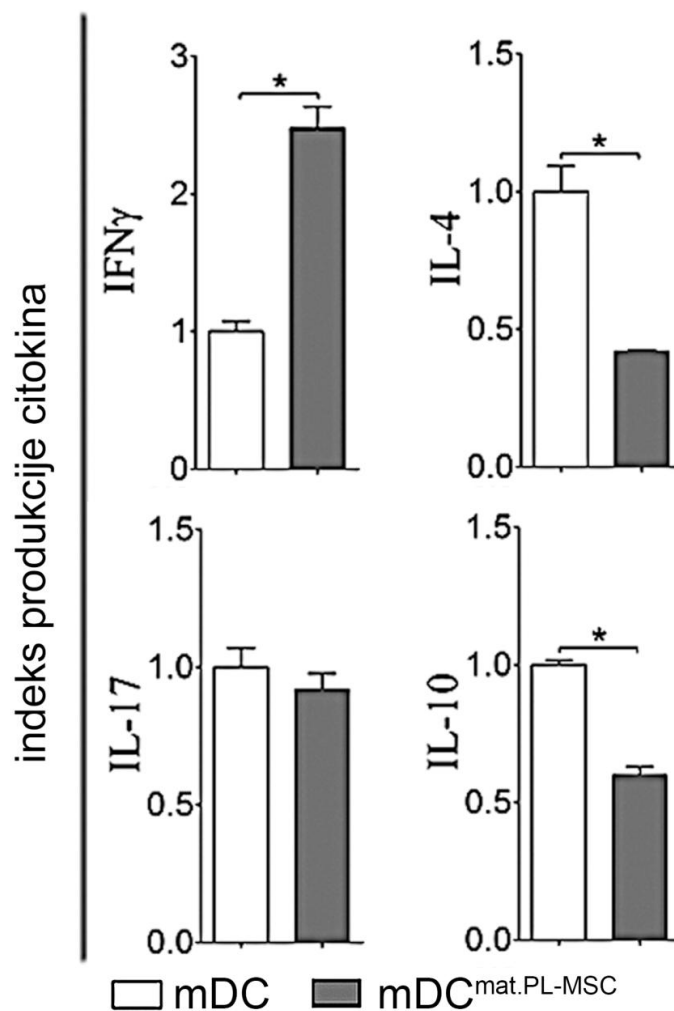
**Figura 38.** Produkcija citokina od strane PL-MSC pod uticajem pro-inflamacijskog koktela.

PL-MSC su tokom 6 dana kultivisane same u prisustvu GM-CSF/IL-4 nakon čega su dva dana stimulisane pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2). Kontrolne PL-MSC nisu stimulisane koktelom u toku dva dana kultivacije. ELISA tehnikom detektovana je produkcija IL-12, IL-23, IL-27 i IL-10. Rezultati su prikazani kao srednji nivo produkcije  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  u poređenju sa PL-MSC. *n.d.*- nije detektovana produkcija citokina



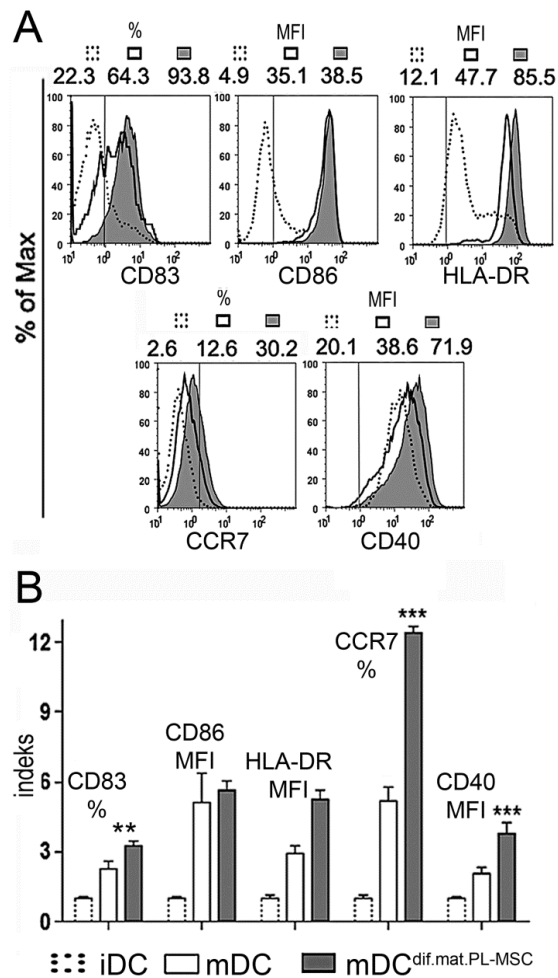
**Figura 39.** Alostimulatorni potencijal mDC koje su samo u fazi sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSc.

Dodavanjem pro-inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture u prisusvtu (mDC<sup>mat.PL-MSc</sup>) ili bez PL-MSc (mDC) indukovano je sazrevanje već diferentovanih iDC (diferentovanih bez PL-MSc), nakon čega su analizirane. Alostimulatorni kapacitet mDC i mDC<sup>diff.PL-MSc</sup> je analiziran kultivacijom ovih ćelija u različitom broju (od  $1 \times 10^4$  do  $0.031 \times 10^4$ /po bazenu) sa  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment kao srednja vrednost  $\pm$  SD šestoplikata, od 6 urađenih eksperimenata sa različitim DC/PL-MSc parovima donora. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



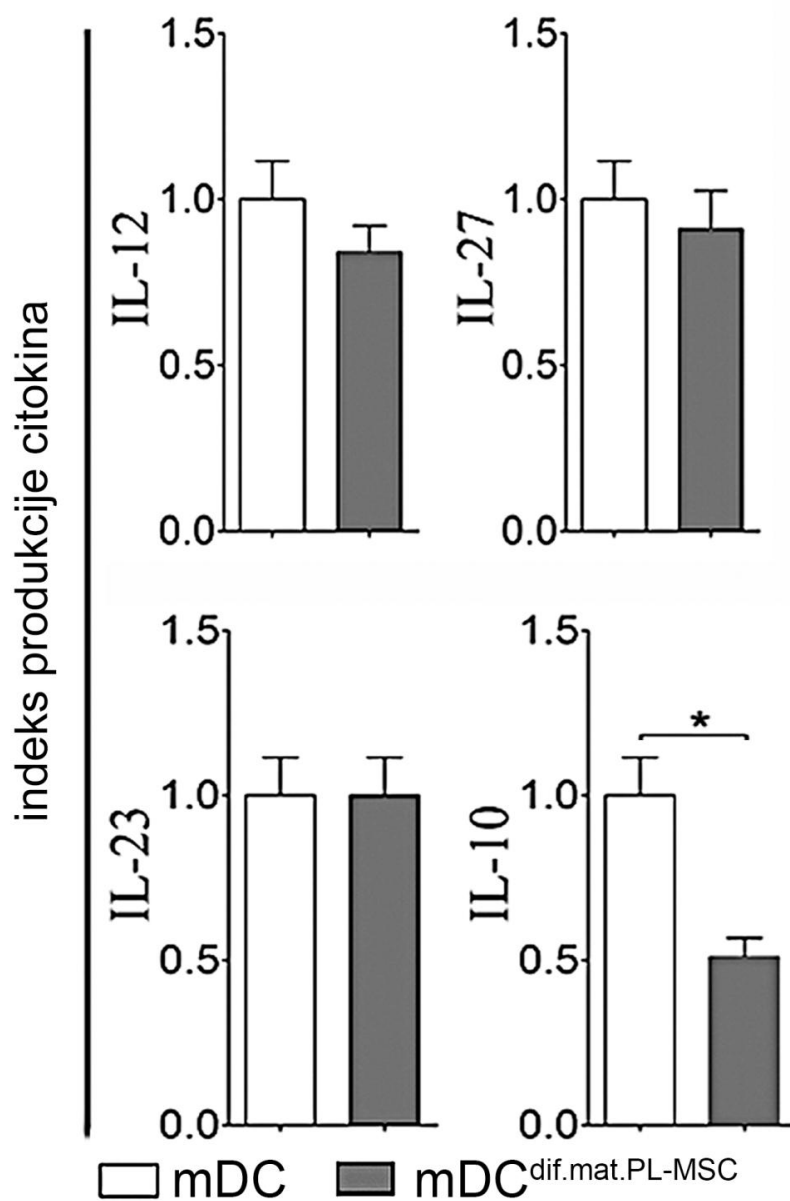
**Figura 40.** Potencijal mDC koje su samo u fazi sazreivanja bile izložene uticaju PL-MSc za polarizaciju Th odgovora.

Dodavanjem pro- inflamacijskog koktela (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) u kulture u prisusvtu (mDC<sup>mat.PL-MSc</sup>) ili bez PL-MSc (mDC) indukovano je sazreivanje već diferentovanih iDC (diferentovanih bez PL-MSc), nakon čega su analizirane. Analiziran je citokinski profil u ko-kulturama DC/CD4<sup>+</sup> T limfocita u odnosu 1:10, nakon tretmana kombinacijom PMA/A23187, i rezultati su prikazani kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-MSc/DC parova. Indeksi su računati za svakog donora deljenjem koncentracije citokina izmerene u supernatantu eksperimentalnog sa koncentracijom citokina u kontrolnom uzorku. \*p<0.05 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



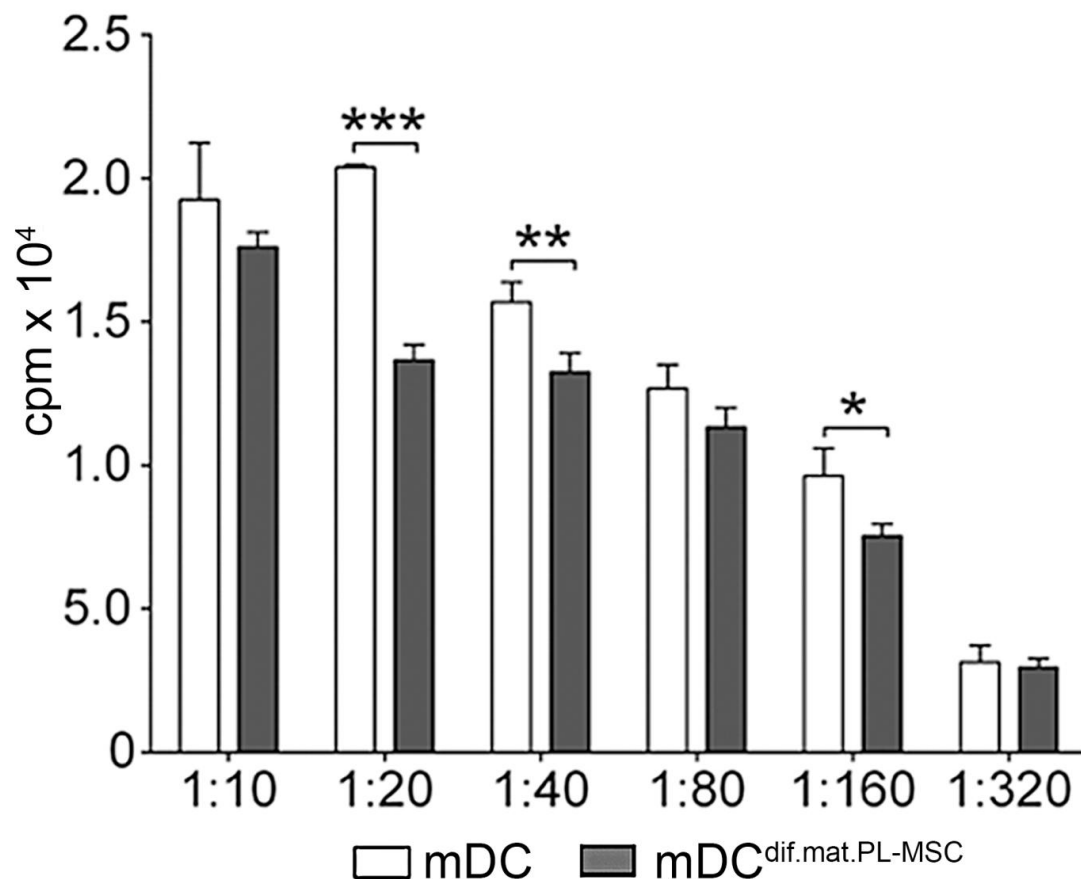
**Figura 41.** Fenotip mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSC (mDC<sup>dif.mat.PL-<sub>MSC</sub></sup>) ili kultivisane bez PL-MSC (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2), nakon čega su analizirane. FACS-analiza fenotipa DC prikazana je (A) kao panel histograma koji pokazuju ekspresiju markera od strane jednog reprezentativnog donora DC (mDC<sup>dif.mat.PL-<sub>MSC</sub></sup>) i (B) kao srednji indeksi ekspresije markera  $\pm$  SD za 6 PL-<sub>MSC</sub>/DC parova. Ekspresija markera od strane iDC koje su još dodatna dva dana bile kultivisane bez pro-inflamacijskog koktela ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane mDC i mDC<sup>dif.PL-<sub>MSC</sub></sup> za svakog donora. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 42.** Produkcija citokina od strane mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSC (mDC<sup>dif.mat.PL-<sup>MSC</sup></sup>) ili kultivisane bez PL-MSC (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-upalnim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2), nakon čega su analizirane. Produkcija citokina od strane mDC i mDC<sup>dif.mat.PL-<sup>MSC</sup></sup> je prikazana kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-<sup>MSC</sup>/DC parova. \* $p < 0.05$  pokazuje nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 43.** Alostimulacioni kapacitet mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MS.

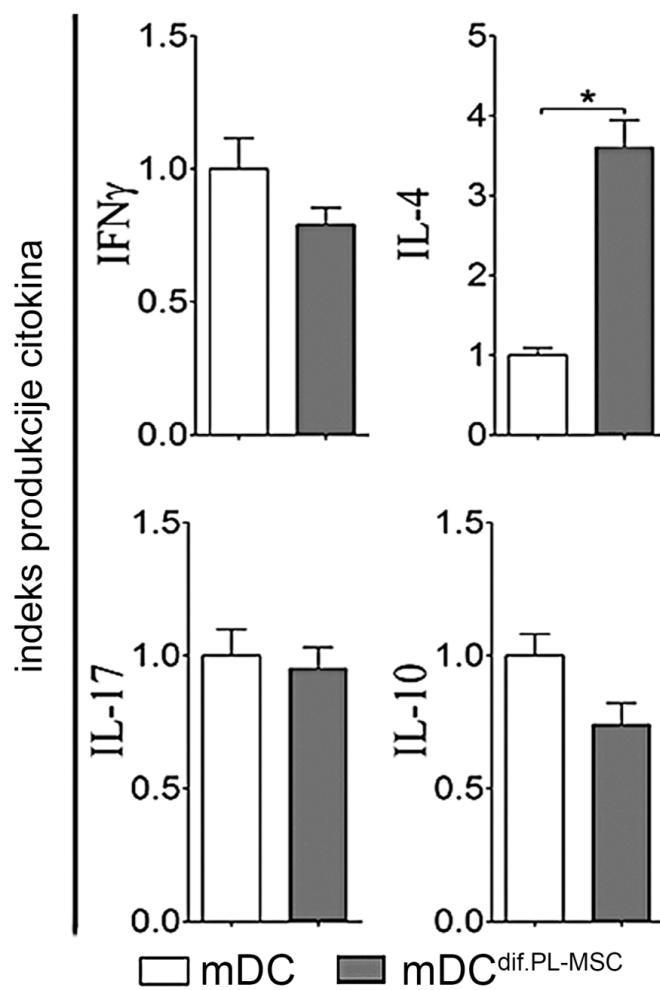
DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MS (mDC<sup>dif.mat.PL-MS</sup>) ili kultivisane bez PL-MS (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacionim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2), nakon čega su analizirane. Alostimulacioni kapacitet mDC i mDC<sup>dif.mat.PL-MS</sup> je analiziran kultivacijom ovih ćelija u različitom broju (od  $1 \times 10^4$  do  $0.031 \times 10^4$ /po bazenu) sa  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment kao srednja vrednost  $\pm$  SD šestoplikata, od 6 urađenih eksperimenata sa različitim DC/PL-MS parovima donora. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



došlo do statistički značajnog smanjenja u produkciji IFN- $\gamma$  i IL-10 u ovim ko-kulturama u poređenju sa kontrolnim (Fig. 44). Kako bi smo ispitali da li PL-MSC imaju ovakav efekat na proces dobijanja DC samo kada je sazrevanje DC izazvano pro-inflamacijskim koktelom, iste analize uradili smo sa DC od istog donora u prisustvu PL-MSC, ali čije je sazrevanje bilo stimulisano LPS-om. Kontrolne mDC stimulisane LPS-om ispoljavale su niži nivo svih markera, osim CCR7, u poređenju sa kontrolnim mDC stimulisanim pro-inflamacijskim koktelom. Takođe, mDC dobijene u prisustvu PL-MSC i stimulisane LPS-om su značajno manje ispoljavale CD83, CCR7 i HLA-DR, u poređenju sa kontrolnim mDC stimulisanim LPS-om (Fig. 45A). U skladu sa fenotipom, kontrolne mDC stimulisane LPS-om pokazale su slabiji potencijal za alostimulaciju, u poređenju sa kontrolnim mDC stimulisanim pro-inflamacijskim koktelom. Slično kao i kod DC čije je sazrevanje bilo indukovano pro-inflamacijskim koktelom, DC dobijene u prisustvu PL-MSC i tretirane LPS-om imale su oslabljen alostimulatorni kapacitet (Fig. 45B). Kako smo ovim paralelnim eksperimentima pokazali da inhibitorni efekat PL-MSC na proces dobijanja DC nije u vezi sa tipom stimulusa koji se koristi za sazrevanje DC, dalja ispitivanja nastavili smo na DC stimulisanim pro-inflamacijskim koktelom.

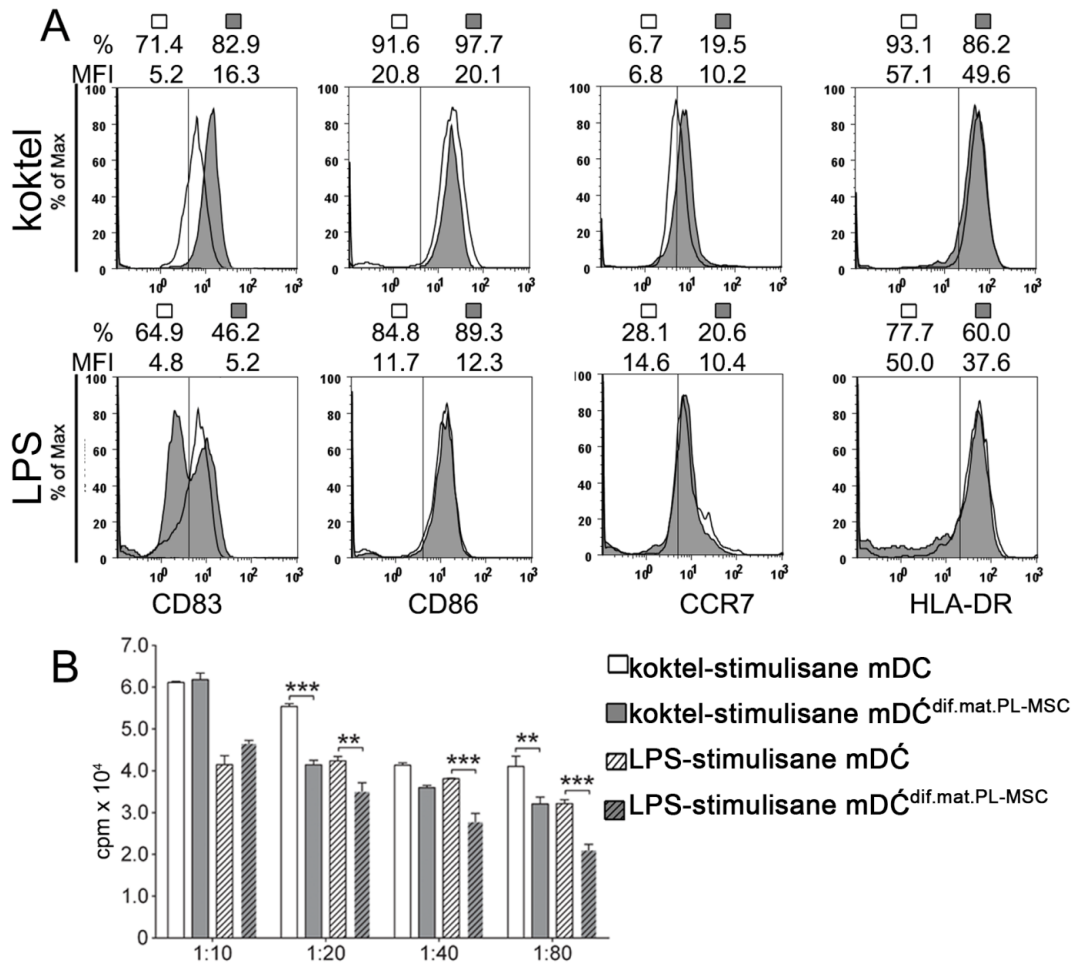
#### **4.3.3.5. Dendritske ćelije koje su i u toku diferencijacije i u toku sazrevanja ko-kultivisane sa PL-MSC indukuju anergiju i funkcionalne Treg populacije mehanizmima koji uključuju IDO-1, ILT-3 i ILT-4**

Naš sledeći cilj bio je da ispitamo zašto mDC dobijene u prisustvu PL-MSC, uprkos njihovom fenotipu i kapacitetu za produkciju citokina IL-12 familije, imaju oslabljen alostimulatorni potencijal i veću sklonost ka polarizaciji odgovora u Th2 smeru. Najpre smo ispitivali ekspresiju inhibitornih molekula IDO-1, ILT-3 i ILT-4, koji su visoko ispoljeni na tolerogenim DC [513-514]. Pro-inflamacijski koktel (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE-2) je značajno smanjio ekspresiju IDO-1 i ILT-3, a povećao nivo ekspresije ILT-4 na kontrolnim mDC (Fig. 46). Međutim, prisustvo PL-MSC tokom procesa dobijanja mDC dovelo je do značajnog porasta ekspresije sva tri molekula na ovim DC u poređenju sa kontrolnim mDC. mDC dobijene u prisustvu PL-MSC ispoljavale su 7.3 do 12.5 puta viši



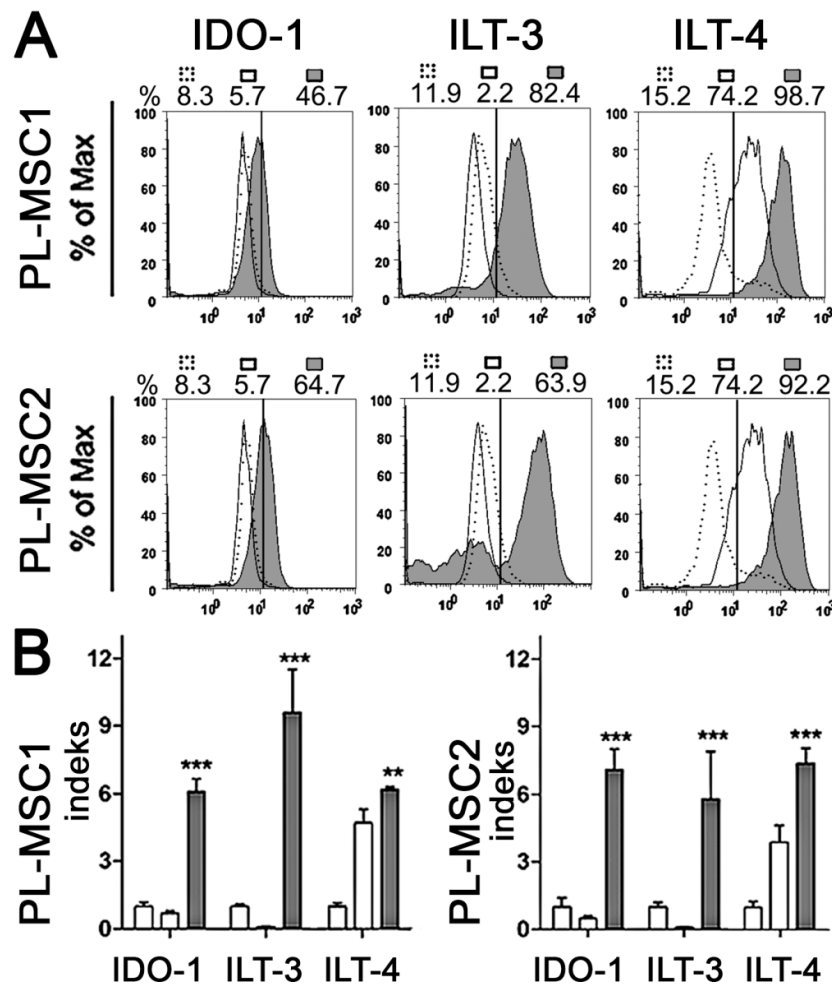
**Figura 44.** Potencijal mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSc za polarizaciju Th odgovora.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSc (mDC<sup>dif.mat.PL-MSc</sup>) ili kultivisane bez PL-MSc (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2), nakon čega su analizirane. Analiziran je citokinski profil u ko-kulturama DC/CD4<sup>+</sup> T limfocita u odnosu 1:10, nakon tretmana kombinacijom PMA/A23187, i rezultati su prikazani kao srednji indeks produkcije citokina  $\pm$  SD za 6 PL-MSc/DC parova. Indeksi su računati za svakog donora deljenjem koncentracije citokina izmerene u supernatantu eksperimentalnog sa koncentracijom citokina u kontrolnom uzorku. \*p<0.05 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 45.** Efekat različitih maturacionih stimulusa na mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

DC od jednog donora su u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivirane u prisustvu PL-MSC od jednog donora (mDC<sup>dif.mat.PL-MSC</sup>) ili kultivirane bez PL-MSC (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2) ili LPS-om, nakon čega su analizirane. (A) FACS-analiza fenotipa DC prikazana je kao panel histograma koji pokazuju ekspresiju markera od strane jednog reprezentativnog donora DC (mDC<sup>dif.mat.PL-MSC</sup>). (B) Alostimulatorni kapacitet ovako dobijenih DC je analiziran kultivacijom ovih ćelija u različitom broju (od  $1 \times 10^4$  do  $0.031 \times 10^4$ /po bazenu) sa  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.

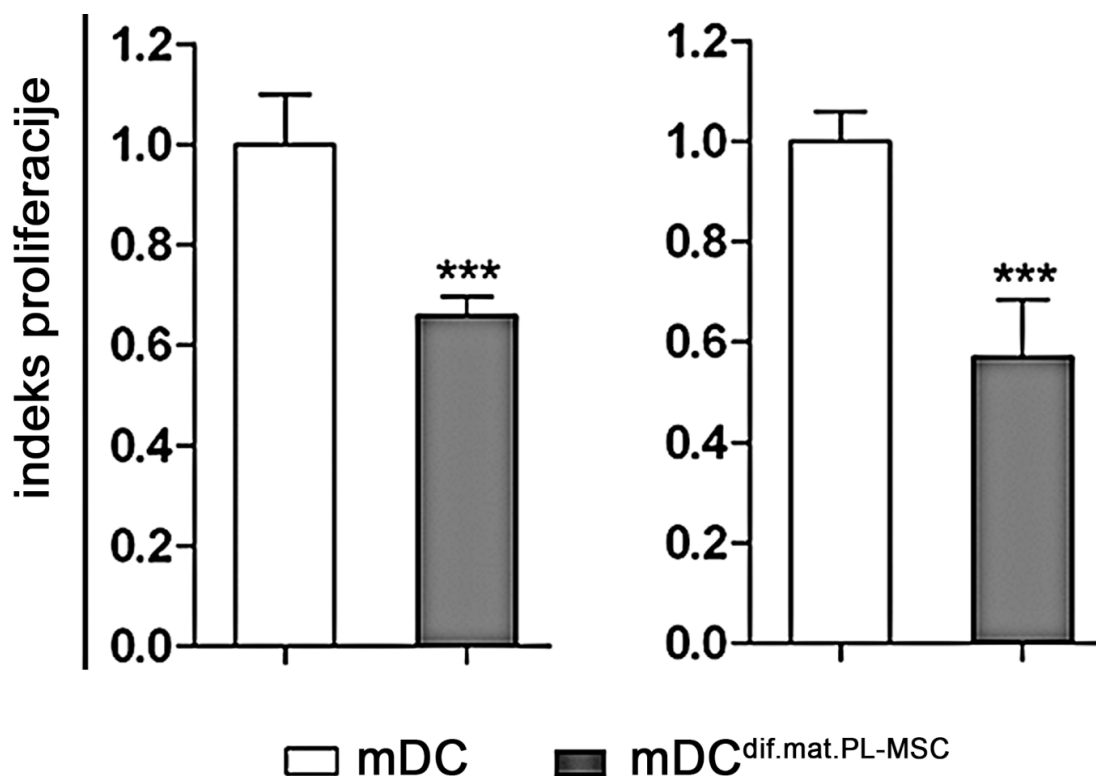


**Figura 46.** Ekspresija inhibitornih molekula na mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSC ( $mDC^{dif.mat.PL-MSC}$ ) ili kultivisane bez PL-MSC ( $mDC$ ). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2), nakon čega su analizirane. FACS-analiza ekspresije IDO-1, ILT-3, ILT-4 na DC prikazana je (A) kao panel histograma koji pokazuju ekspresiju markera od strane jednog reprezentativnog donora DC ( $mDC^{dif.mat.PL-MSC}$ ) i (B) kao srednji indeksi ekspresije markera  $\pm$  SD za 6 PL-MSC/DC parova. Ekspresija markera od strane iDC koje su još dodatna dva dana bile kultivisane bez pro-inflamacijskog koktela ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane mDC i  $mDC^{dif.PL-MSC}$  za svakog donora. \*\*\* $p < 0.005$  pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.

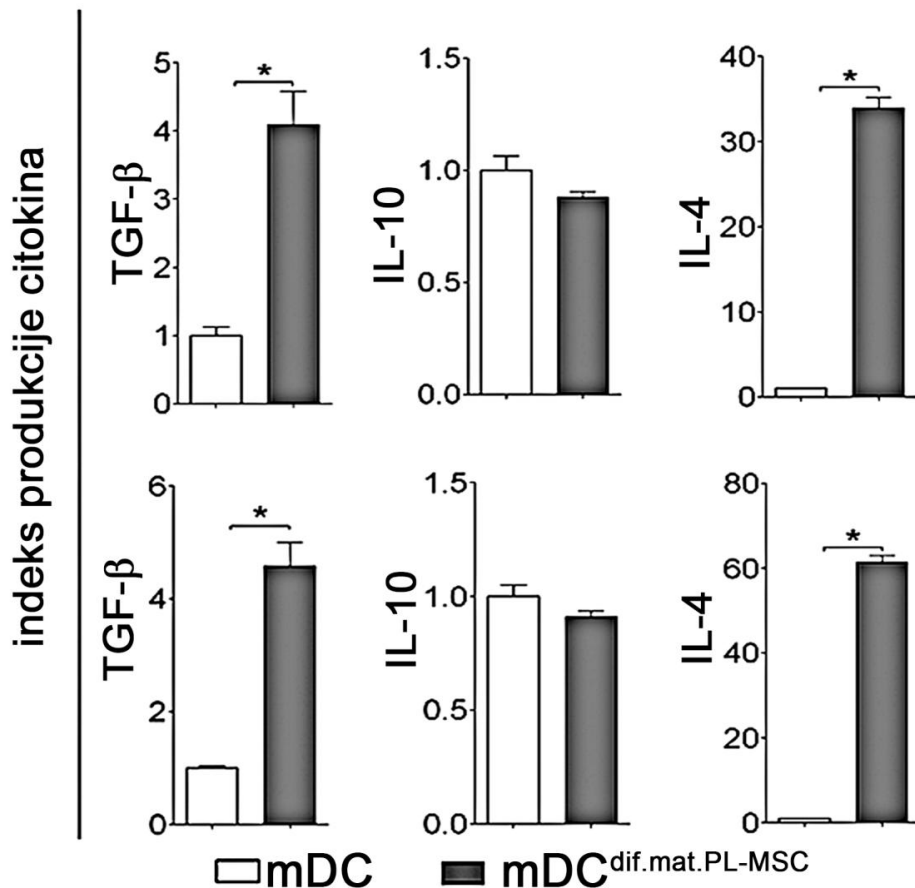
nivoIDO-1 u citoplazmi, 64.4 do 87.3 puta viši nivoILT-3 i 1.3 do 1.7 puta viši nivoILT-4 na svojoj površini (Fig. 46). S obzirom da je ranije pokazano da su ovi ko-inhibitorni molekuli na tolerogenim DC uključeni u indukciju stanja anergije i tolerance [395], merili smo nivo anergije kod  $CD4^+$  T limfocita koji su inicijalno dovedeni u kontakt sa mDC dobijenim u prisustvu PL-MSC ili kontrolnim mDC, nakon čega su tretirani IL-2 i konačno re-stimulisani kontrolnim mDC u sekundarnoj mešanoj leukocitnoj reakciji.  $CD4^+$  T limfociti koji su inicijalno dovedeni u kontakt sa mDC dobijenim u prisustvu PL-MSC slabije su odgovarali na sekundarnu stimulaciju kontrolnim mDC, odnosno postali su hipo-responsivni u poređenju sa  $CD4^+$  T limfocitima koji su bili u kontaktu samo sa kontrolnim mDC (Fig. 47). Takođe, u ko-kulturama ovih hipo-responzivnih limfocita izmerena je značajno veća produkcija TGF- $\beta$  [801.9 (254.8-2044.7) pg/ml] u poređenju sa kontrolnim ko-kulturama [186.1 (0-533.9) pg/ml] i IL-4 [924.1 (115.4-1566.1) pg/ml] u poređenju sa kontrolnim ko-kulturama [22.8 (0-647.6) pg/ml], dok nije bilo razlike u produkciji IL-10 između ovih [352.5 (0-1205.4) pg/ml] i kontrolnih ko-kultura [278.1 (0-991.4) pg/ml] (Fig. 48). Obzirom da su DC koje smo u ovim eksperimentima dobili u prisustvu PL-MSC poreklom od različitih donora pokazale isti trend promena u odnosu na kontrolne DC (Fig. 46-48), potvrdili smo da anti-inflamatorni efekat PL-MSC na proces dobijanja mDC nije zavisao od donora već predstavlja osobinu MSC izolovanih sa mesta periapeksne lezije.

Indukcija anergije je jedan od ključnih mehanizama kojim regulatorni T limfociti regulišu imunski odgovor [515]. Zbog toga smo dalje ispitivali da li su mDC dobijene u prisustvu PL-MSC zapravo sposobne da indukuju razvoj regulatornih T limfocita. Ovu funkciju mDC merili smo preko njihove sposobnosti da u populaciji T limfocita sa kojima su ko-kultivisane indukuju pojavljivanje limfocita koji ispoljavaju  $CD4^+$ , CD25, Foxp3 molekule i CD39 enzim koji je među poslednjim identifikovan kao funkcionalni marker ovih imunosupresivnih ćelija [516-517]. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da mDC dobijene u prisustvu PL-MSC indukuju značajno veći procenat  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$  i  $CD4^+CD25^{high}CD39^+$  ćelija u poređenju sa kontrolnim mDC (Fig. 49). Zanimljivo je da 75% ovako indukovanih  $CD4^+CD25^{high}CD39^+$  ćelija nije istovremeno ispoljavalo Foxp3, ali su sve ćelije sa ovim fenotipom ispoljavale IL-10 u citoplazmi, što nam je ukazalo na to



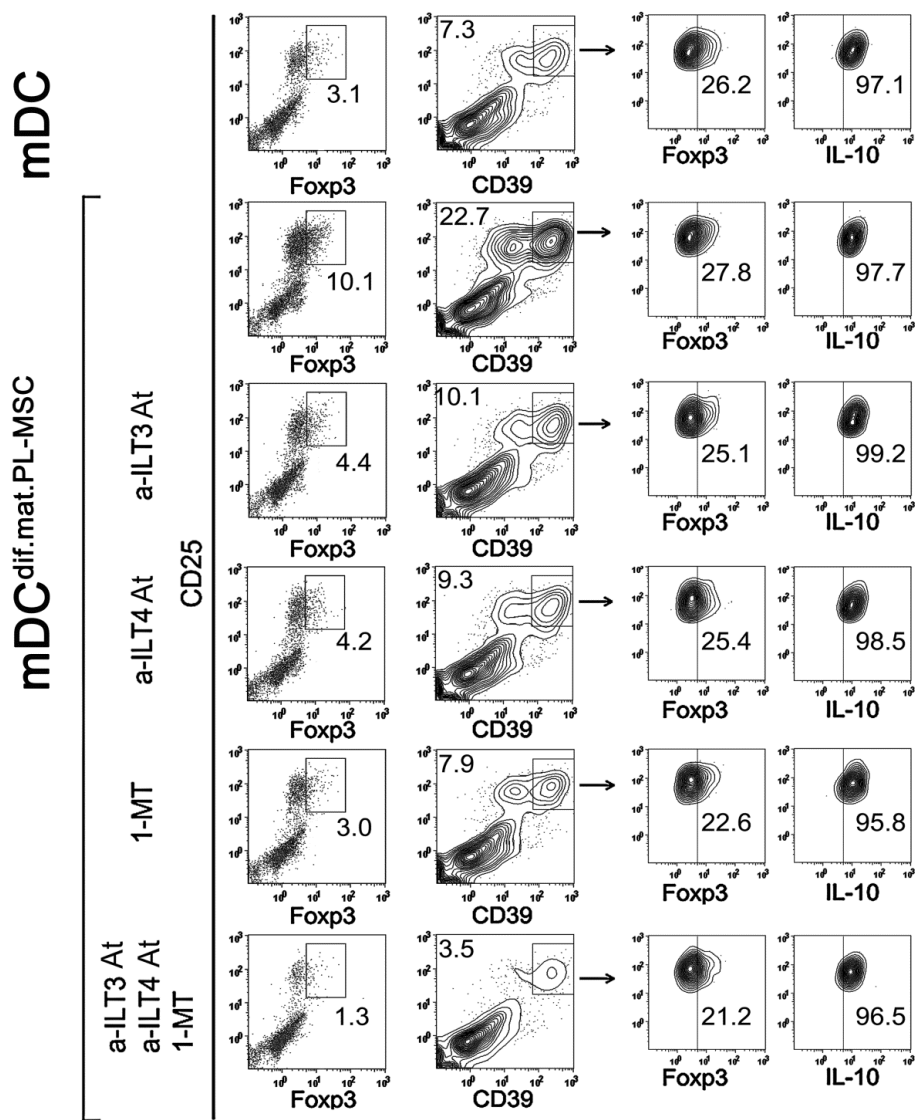
**Figura 47.** Uticaj PL-MSK na proces diferencijacije i sazrevanja DC.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSK (mDC<sup>dif.mat.PL-MSK</sup>) ili kultivisane bez PL-MSK (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2).  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita je tokom tri dana stimulisan sa  $1 \times 10^3$  kontrolnih mDC odnosno mDC<sup>dif.mat.PL-MSK</sup>, nakon toga su sakupljene i prečišćene CD4 magnetnim sortingom. Ovako prečišćeni CD4<sup>+</sup> T limfociti su dva dana stimulisane IL-2 i nakon toga re-stimulisan kontrolnim mDC tokom 5 dana. Rezultati proliferacije su prikazani kao srednji indeksi proliferacije  $\pm$  SD za 6 PL-MSK/DC parova. Proliferacija CD4<sup>+</sup> T limfocita koji su primarno stimulisani kontrolnim mDC ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane mDC<sup>dif.PL-MSK</sup> za svakog donora. \*\*\*p<0.005 pokazuje nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 48.** Uticaj PL-MSC na proces diferencijacije i sazrevanja DC.

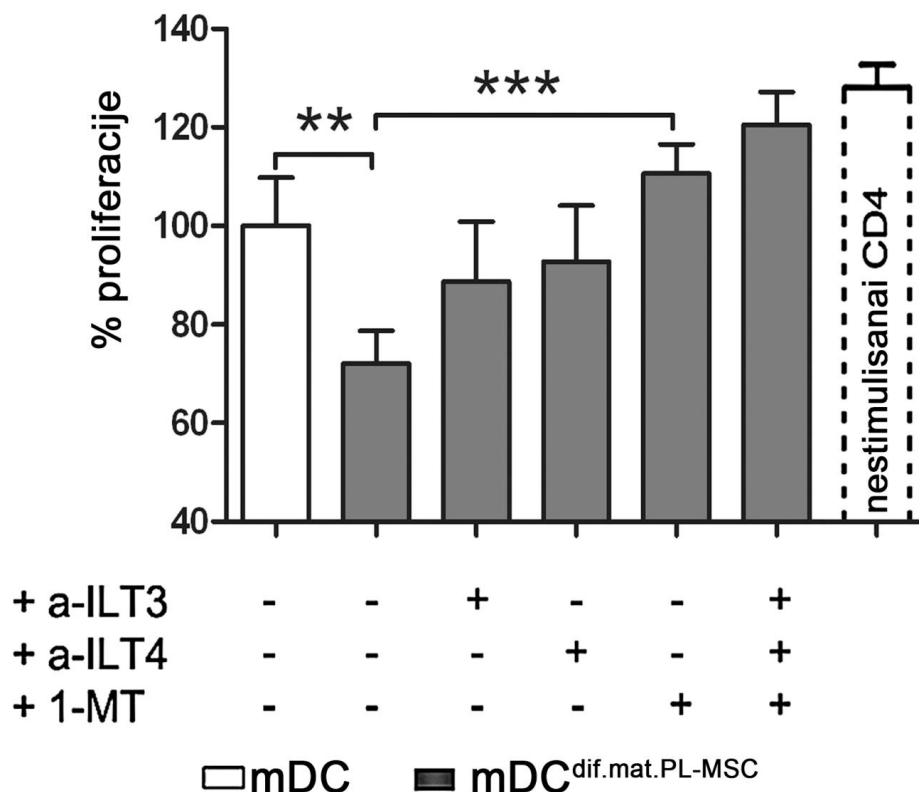
DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSC ( $mDC^{dif.mat.PL-MSC}$ ) ili kultivisane bez PL-MSC ( $mDC$ ). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2).  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita je tokom tri dana stimulisan sa  $1 \times 10^3$  kontrolnih mDC odnosno  $mDC^{dif.mat.PL-MSC}$ , nakon toga su sakupljene i prečišćene CD4 magnetnim sortingom. Ovako prečišćeni CD4<sup>+</sup> T limfociti su dva dana stimulisane IL-2 i nakon toga re-stimulisane kontrolnim mDC tokom 5 dana. Rezultati produkcije citokina u ovim ko-kulturama su prikazani kao srednji indeksi proliferacije  $\pm$  SD za 6 PL-MSC/DC parova. Proliferacija CD4<sup>+</sup> T limfocita koji su primarno stimulisani kontrolnim mDC ima vrednost indeksa 1 i u odnosu na ove vrednosti računat je indeks ekspresije markera od strane  $mDC^{dif.PL-MSC}$  za svakog donora. \* $p < 0.05$  pokazuje nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.



**Figura 49.** Sposobnost mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSC za indukciju regulatornih T limfocita.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSC (mDC<sup>dif.mat.PL-MSC</sup>) ili kultivisane bez PL-MSC (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2).  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita je tokom tri dana stimulirano sa  $1 \times 10^3$  kontrolnih mDC odnosno mDC<sup>dif.mat.PL-MSC</sup>, sa ili bez anti-ILT3 antitela, anti-ILT4 antitela i 1-metil-L-triptofanom. Na ovako stimuliranim CD4<sup>+</sup> T limfocitima analizirana je na FACS-u ekspresija Foxp3, CD25, CD39 i IL-10.





**Figura 50.** Sposobnost mDC koje su i tokom procesa diferencijacije i tokom procesa sazrevanja bile izložene uticaju PL-MSK za indukciju regulatornih T limfocita.

DC su i u toku faze diferencijacije i u toku faze sazrevanja ko-kultivisane u prisustvu PL-MSK (mDC<sup>dif.mat.PL-MSK</sup>) ili kultivisane bez PL-MSK (mDC). Sazrevanje DC indukovano je pro-inflamacijskim koktelom (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i PGE2).  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T limfocita je tokom tri dana stimulisano sa  $1 \times 10^3$  kontrolnih mDC odnosno mDC<sup>dif.mat.PL-MSK</sup>, sa ili bez anti-ILT3 antitela, anti-ILT4 antitela i 1-metil-L-triptofanom. Ovako stimulisani CD4<sup>+</sup> T limfociti su sakupljeni i prečišćeni CD4 magnetnim sortingom.  $0.75 \times 10^5$  ovako prečišćeni CD4<sup>+</sup> T limfociti je, tokom 3 dana, ko-kultivisani sa CD3<sup>+</sup> T limfocitima u odnosu 1:1 u CD3/CD28 uslovima stimulacije. Kulture posebno kultivisanih limfocita, kao i ko-kultura CD4<sup>+</sup> T limfocita koji nisu prethodno ko-kultivisani sa DC (nestimulisanai CD4) i CD3<sup>+</sup> T limfocita, u ovim uslovima kultivacije predstavljali su kontrole. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 pokazuju nivo statističke značajnosti eksperimentalnog u odnosu na kontrolni uzorak.

da ove ćelije imaju fenotip sličan Tipu 1 regulatornih (Tr1) ćelija [518-519]. Dalje, promene u fenotipu ovih CD4<sup>+</sup> T limfocita bile su u skladu sa promenom njihove funkcije pošto su ovi limfociti pokazali značajan anti-proliferativni efekat na CD3<sup>+</sup> limfocite u ko-kulturi u uslovima CD3/CD28 stimulacije (Fig. 50). Konačno da bi smo proverili da li je indukcija ovih regulatornih T limfocita posledica povišene ekspresije IDO-1, ILT-3 ili ILT-4 na mDC dobijenim u prisustvu PL-MSC, ove mDC su tretirane antitelima na ILT-3 i ILT-4 odnosno inhibitrom aktivnosti IDO-1 enzima (1-metil-L-triptofan) u ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocita. Ovim testom smo pokazali da dominantan efekat u indukciji regulatornih T limfocita, kao i u njihovom supresorskom efektu ima mehanizam koji se zasniva na aktivnosti IDO-1 enzima. Ipak, najjači neutralizirajući efekat postignut je blokiranjem sva tri molekula (Fig. 49, 50).

## 5. DISKUSIJA

Većina do danas sprovedenih kliničkih studija o potencijalnom korišćenju adultnih matičnih ćelija kao ćelijske terapije različitih patoloških stanja bavila se ispitivanjem BM-MSK (<http://clinicaltrials.gov>). Imajući u vidu invazivnost procedure uzorkovanja kostne srži, mali prinos BM-MSK (0.001-0.002% ćelija kostne srži) [520], njihov kapaciteta za proliferaciju i potencijala za diferencijaciju koji opada sa godinama starosti davaoca kostne srži [521-522], sve više se ispituju MSC dobijene iz alternativnih izvora. U potrazi za alternativnim izvorima, pokazano je da masno tkivo sadrži značajno veći udeo MSC (1%) [520], zbog čega su AT-MSK preuzele vodeće mesto u studijama koje imaju za cilj ispitivanje potencijalne primene MSC u terapiji i/ili profilaksi različitih bolesti. Sa druge strane, podaci dobijeni u studijama o MSC izolovanim iz dentalnih tkiva pokazali su da ove MSC takođe imaju sposobnost da se *in vitro* diferenciraju u adipocite, osteoblaste, odontoblaste, cementoblaste, neuroblaste i hepatocite [168-169, 523], kao i da ekotopično formiraju dentalne strukture nakon transplantacije u imunokompromitovane miševe [167, 169, 176, 179, 181-182, 193, 197]. Međutim, ove studije su takođe pokazale da se MSC poreklom iz različitih, čak i blisko lokalizovanih dentalnih tkiva značajno razlikuju po usmerenosti ka određenoj liniji u koju se diferencijaciju, pod uticajem indukcionih medijuma *in vitro*, ili primenjene kod imunokompromitovanih model životinja. Ovi rezultati ukazuju na to da dentalna tkiva mogu biti značajan alternativni izvor MSC sa velikim potencijalom za primenu u regenerativnoj medicini.

Uzimajući navedene nalaze u obzir, u prvom delu istraživanja smo upoređivali osnovne morfološke i funkcionalne karakteristike MSC izolovanih iz dentalne pulpe (DP-MSK) i folikula (DF-MSK) trećeg molara. Upoređivanjem MSC iz ovih dentalnih tkiva poreklom od istog zuba isključena je mogućnost da detektovane razlike između dve populacije MSC budu posledica razlike između dva donora, već se sve opisane razlike mogu tumačiti kao jedinstvene karakteristike MSC iz određenog dentalnog tkiva (dentalne pulpe i dentalnog folikula). Upoređivanjem osobina MSC poreklom od istog donora mogu se dobiti podaci koji bi bili značajni pri izboru tkiva kao izvora najpogodnijih MSC za terapiju određene

bolesti. Kako su DP-MSK i DF-MSK izolovane iz tkiva koja pre izolacije nisu bila izložena inflamaciji, osobine ovih MSC, najverovatnije predstavljaju osobine rezidentnih MSC koje su proizvod mikrosredine ovih tkiva u homeostazi. Ipak, naša istraživanja i istraživanja drugih grupa su pokazala da karakteristike MSC izolovanih iz zdravog tkiva mogu biti modifikovane *in vitro* delovanjem molekula karakterističnih za proces inflamacije, kao što su TLR agonisti [228-231, 237, 240, 243], pro-inflamacijski citokini [524-529], i faktori rasta [67, 94-95, 530-533]. Imajući u vidu da u periapexnoj leziji postoji kompleksna mreža pro- i anti-inflamacijskih molekula [418], osobine ispitivanih PL-MSK se moraju razmatrati kao proizvod uticaja ovakve mikrosredine na MSC u periapexnoj leziji. Dodatno je važna i činjenica da endogene BM-MSK, migriraju na mesto inflamacije [534] i povrede tkiva [535-537]. Na osnovu svega možemo pretpostaviti da su osobine PL-MSK, opisane tokom naših istraživanja, proizvod uticaja inflamacijske mikrosredine u periapexnoj leziji na osobine MSC, koje pod njenim uticajem migriraju iz kostne srži i/ili dentalnih i drugih tkiva. Dakle, teško je očekivati da bi detektovana populacija PL-MSK mogla nastati samo iz periodontalnog ligamenta *in vitro*. Pa tako populaciju PL-MSK treba posmatrati kao novi, mogući alternativni izvor MSC. Zbog svega navedenog, sva poređenja između PL-MSK sa jedne strane, i DP-MSK i DF-MSK sa druge strane, imaju za cilj rasvetljavanje potencijalne uloge ovih ćelija u tkivu iz kog su izolovane, i potencijala ovih ćelija za korišćenje u ćelijskoj terapiji kod stanja koja se odlikuju oštećenjem tkiva i/ili zapaljenskim procesom.

U tom cilju, na početku ovih istraživanja, vodeći se uputstvima ISCT, iz 2006. [37], ispitivali smo da li ćelije izolovane postupkom adherence iz dentalne pulpe i dentalnog folikula zdravog zuba, kao i one izolovane iz periapexnih lezija, poseduju morfologiju nalik fibroblastima, kapacitet za samo-obnavljanje, pri čemu formiraju CFU-F, ispoljavaju kombinaciju markera karakterističnu za MSC, i potencijal za diferencijaciju u ćelije mezenhinskog porekla. U skladu sa rezultatima drugih istraživača datih u pregledu *Phinney 2012. godine* [61], rezultati naših istraživanja pokazali su da se DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK odlikuju intra-populacionom heterogenošću, odnosno da se ćelije unutar ovih populacija MSC, razlikuju po veličini, ekspresiji pojedinih markera i po kapacitetu za

diferencijaciju. Osim ove intra-populacione heterogenosti, DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK se i međusobno razlikuju po procentualnom udelu ćelija sa određenim karakteristikama.

### **5.1. DP-MSK, DF-MSK I PL-MSK SE RAZLIKUJU PO FENOTIPU**

Tokom potrage za markerima MSC koji bi omogućili razlikovanje ovih ćelija od drugih tipova ćelija, kao i izolaciju subpopulacija MSC sa osobinama koje bi mogle biti iskorišćene u terapijske svrhe, pokazano je da se različita tkiva u organizmu razlikuju po zastupljenosti subpopulacija MSC sa određenim markerom na svojoj površini. U skladu sa ovim, analizom fenotipskih karakteristika DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK u našim istraživanjima, uočeno je da se ove populacije MSC međusobno razlikuju po ekspresiji CD44, CD46, CD90, CD105, CD73, STRO-1, CD146 i CD271. Ove fenotipske razlike između DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK mogu predstavljati svojevrsno obeležje tkiva iz kojih potiču, odnosno mogu biti posledica mreže mikrosredinskih faktora karakterističnih za svako tkivo. Sa druge strane, različite funkcije nekih od ovih molekula mogu objasniti neke od pokazanih razlika između MSC izolovanih iz tri različita dentalna tkiva. Tako je pokazano da je CD44, važan receptor za hijaluronsku kiselinu, ispoljen na MSC iz različitih tkiva [538-539] i da ga ove, kao i mnoge druge ćelije koriste za interakciju sa ekstracelularnim matriksom. Pored toga, *Zhu i saradnici* [533] su pokazali da nakon stimulacije faktorom rasta poreklom od trombocita (engl. platelet derived growth factor, PDGF), MSC povećavaju ekspresiju CD44, usled čega se povećava stopa njihove migracije. Obzirom da su *Wang i saradnici* [540-541] pokazali da je povećana produkcija PDGF-B i PDGF-C povezana sa nastankom patoloških promena u periapsnoj leziji, viši nivo ekspresije CD44 na PL-MSK, u odnosu MSC iz zdravog tkiva, može biti posledica uticaja mikrosredine koja se formira na mestu periapsne lezije. Stimulacijom ekspresije CD44 na MSC iz okolnih tkiva, PDGF bi mogao da dovede do migracije ovih ćelija u periapsnu leziju. U skladu sa ovom našom pretpostavkom su i rezultati *Kollar i saradnika* [542] koji su pokazali da CD44 ima bitnu ulogu u migraciji MSC na mesto akutnog infarkta miokarda. Osim što povećana ekspresija CD44 može da ukaže na povećanu migratornu sposobnost PL-MSK, povećanje ekspresije ovog markera karakteristično je i za proces diferencijacije ćelija u hondrocite [543], što može da se

doveđe u vezu sa značajnijim hondrogenim potencijalom PL-MSC u odnosu na DP-MSC i DF-MSC.

Fenotipska analiza MSC u našim istraživanjima ukazala je na potrebu korišćenja više metoda kako bi se dobili potpuni podaci o ekspresiji određenih markera. Na primer, analizom fenotipa MSC na protočnom citofluorimetru smo dobili podatak da PL-MSC, DP-MSC i DF-MSC ne ispoljavaju STRO-1. Međutim, naknadna analiza imunocitohemijskom metodom pokazala je da više od 60% PL-MSC, DP-MSC i DF-MSC ispoljava STRO-1 i da je ovaj molekul lokalizovan pretežno intracelularno. Nasuprot ovim našim podacima o intracelularnoj lokalizaciji STRO-1 u DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC, više radova je pokazalo da je površinska ekspresija STRO-1 karakteristična za prekursore fibroblasta, osteoblasta, hondrocita, adipocita i ćelija glatkih mišića, izolovane iz adultne i fetalne kostne srži [544-547]. *Kolf i saradnici* su 2007. godine [57] okarakterisali STRO-1 kao najboljih markera za karakterizaciju MSC. Iako do danas nije otkriven antigen za koji se specifično vezuje STRO-1 antitelo, izvedeno je preko 100 pokušaja karakterizacije i izolacije različitih subpopulacija MSC na osnovu ovog markera. Nekoliko studija je pokazalo da je ekspresija STRO-1 karakteristična za preosteoblaste, i da ćelije na kasnijim stupnjevima osteogeneze *in vitro*, progresivno smanjuju ekspresiju ovog molekula sve do zrelih osteoblasta koje su STRO-1<sup>-</sup> [548-550]. Nasuprot rezultatima ovih studija koji ukazuju na opredeljenost STRO-1<sup>+</sup>MSC ka osteogenezi, rezultati naših istraživanja su pokazali da, iako se DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC razlikuju po potencijalu za osteogenezu *in vitro*, ove populacije MSC se ne razlikuje po procentualnom udelu STRO-1<sup>+</sup> ćelija. Dalje, naši rezultati dobijeni imunocitohemijskim metodama na presecima periapeksnih lezija, pokazali su da su STRO-1<sup>+</sup> ćelije dominantno lokalizovane u zidu krvnih sudova, ali da postoje i izdvojene, pojedinačne STRO-1<sup>+</sup> ćelije. Na presecima adipoznog tkiva dodatno smo pokazali da STRO-1<sup>+</sup> ćelije imaju perivaskularnu lokalizaciju. Ovo je u skladu sa podacima *Shi i Gronthos* [551], koji su pokazali da su STRO-1<sup>+</sup> ćelije lokalizovane u spoljašnjem zidu većih krvnih sudova kostne srži i dentalne pulpe. Osim perivaskularno, ovi autori su pokazali da su STRO-1<sup>+</sup> ćelije u dentalnoj pulpi lokalizovane i u okolini nervnih završetaka (perineurium), što može da ukaže na njihovu funkciju u obnavljanju

nervnih ćelija. Međutim, za razliku od ćelija lokalizovanih u perineuriumu dentalne pulpe, ovi autori su pokazali da STRO-1<sup>+</sup> ćelije u spoljašnjem zidu krvnih sudova dentalne pulpe ispoljavaju i dobro poznat endotelni marker CD146. U skladu sa rezultatima ovih autora, podaci naših istraživanja o lokalizaciji STRO-1<sup>+</sup> ćelija, kao i ekspresiji CD146 na DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC, i pretežnoj lokalizaciji CD146<sup>+</sup> pozitivnih ćelija u zidu krvnih sudova periapeksne lezije, dodatno potvrđuju perivaskularnu lokalizaciju dentalnih MSC. Perivaskularna lokalizacija MSC mogla bi da obezbedi brzu migraciju ovih ćelija na mesto oštećenja i/ili zapaljenja, gde bi one u zavisnosti od lokalnih signala mogle da učestvuju u regeneraciji oštećenog tkiva i/ili u regulaciji imunskog odgovora. Pokazano je da CD146<sup>+</sup> stromalne ćelije kostne srži [286] imaju visok proliferativni kapacitet i izraženi osteogeni potencijal. Naša istraživanja su pokazala da značajno veći procenat DP-MSC i PL-MSC ispoljava CD146 (oko 50%) u poređenju sa DF-MSC (15%). U skladu sa rezultatima gore navedenih studija, upravo su DP-MSC i PL-MSC pokazale značajno veći potencijal za osteogenu diferencijaciju, dok se u odnosu na ove populacije MSC, značajno veći procenat DF-MSC diferencirao u adipocite.

Još jedan od aktuelnih markera za karakterizaciju MSC je CD271, niskoafinitetni receptor za faktor rasta neurona (engl. low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR). CD271 u prenatalnom periodu učestvuje u signalnim putevima uključenim u razviće celokupnog nervnog sistema [552] i tokom razvića je ispoljen na različitim ćelijama mezenhimskog porekla [553]. U studijama njegove ekspresije u postnatalnom periodu, CD271 je opisan kao jedan od najboljih markera populacije BM-MSC [554-555] i AT-MSC [556], koja ima visok proliferativni kapacitet i sposobnost multipotentne diferencijacije. Analiza ekspresije CD271 imunocitohemijskom metodom je pokazala da je ekspresija ovog molekula kod DP-MSC i DF-MSC dominantno intracelularna, dok kod PL-MSC CD271 uopšte nije detektovan. Ovi naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da je membranska ekspresija ovog molekula na BM-MSC i MSC izolovanim iz horionske i amnionske membrane tokom održavanja u kulturi nestabilna, i da se smanjuje tokom vremena kultivacije [557-558]. U skladu sa već navedenim rezultatima na BM-MSC i AT-MSC, sortiranje ćelija dobijenih enzimskim tretmanom dentalne pulpe, dentalnog folikula i

periapiksne lezije prema ekspresiji CD271 pre početka kultivacije, mogao bi da bude koristan korak u obogaćivanju populacija MSC multipotentnim ćelijama. Međutim, rezultati *Watson i saradnika* [559] su pokazali da ćelije izolovane iz krvi pupčane vrpce na osnovu ekspresije CD271 poseduju slab proliferativni kapacitet i potencijal za diferencijaciju, u odnosu na ćelije izolovane na isti način iz kostne srži, što ukazuje na to da se verovatno ni ovaj marker ne može koristiti kao potpuno pouzdan, univerzalni marker multipotentnih MSC sa visokim kapacitetom za samo-obnavljanje.

U poslednje vreme je pokazano da se ekspresija CD105 (endoglin), CD166 i CD90 na BM-*MSC* [560] i UCB-*MSC* [40] značajno smanjuje tokom procesa diferencijacije. Ovi podaci ukazali su na potencijalni značaj ovih molekula za izolaciju subpopulacije nediferenciranih *MSC*. Analiza ekspresije ovih molekula u našim istraživanjima je pokazala da DP-*MSC* ispoljavaju manje CD90, i nešto manje CD166 i CD105 u poređenju sa DF-*MSC*. Ovaj podatak, kao i nešto slabiji kapacitet za proliferaciju i veći potencijal za osteogenezu DP-*MSC in vitro*, u poređenju sa DF-*MSC*, može da ukaže na veću zastupljenost ćelija koje su već usmerene za osteogenu/hondrogenu diferencijaciju unutar DP-*MSC*. Sa druge strane, u skladu sa gore navedenim rezultatima dobijenim na BM-*MSC* i UCB-*MSC* [40, 560], nešto veća ekspresija CD105, CD166 i CD90 kod DF-*MSC* ukazuje na to da populacija DF-*MSC* sadrži veći procenat nediferenciranih, multipotentnih, visoko-proliferativnih ćelija.

5.1.1. Ćelijske populacije izolovane iz dentalne pulpe, dentalnog folikula i periapiksne lezije ne ispoljavaju markere karakteristične za antigen prezentujuće ćelije, B limfocite, monocite i hematopoetske matične ćelije

Pojedine ćelije, kao što su APC, B limfociti, monociti, kao i prekursori HSC, često mogu opstati u kulturama *MSC*, zbog faktora rasta koje *MSC* produkuju i zbog interakcija sa ovim stromalnim ćelijama. Ove kontaminirajuće ćelije, produkcijom različitih molekula i kroz interakcije sa *MSC* i drugim ćelijama u okruženju, mogu ispoljiti značajan modulatorni efekat. Da bi se osiguralo da dobijeni rezultati o uticaju heterogenih populacija *MSC* ne budu pogrešno protumačeni zbog kontaminacije drugim ćelijskim tipovima, ISCT [37] je kao jedan od kriterijuma za karakterizaciju *MSC* preporučila isključivanje ćelija



koje ispoljavaju markere karakteristične za ove ne-mezenhimske tipove ćelija iz kulture MSC. Kako je dobro poznat uticaji APC, B limfocita, monocita i HSC na različite imunske ćelije, njihovo odsustvo iz kultura DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC bio je važan preduslov u našim istraživanjima o uticaju populacija MSC izolovanih iz dentalnih tkiva na karakteristike PBMC i PL-IC *in vitro*. Takođe, DC mogu nastati iz monocita periferne krvi kao i iz HSC *in vitro* [313], zbog čega je bilo posebno važno isključiti prisustvo CD14<sup>+</sup> i CD34<sup>+</sup> ćelija u kulturama MSC, obzirom da je uticaj PL-MSC na proces nastanka DC iz monocita ispitivan u najvažnijem delu naših istraživanja. Uzimajući u obzir ove činjenice, DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC izolovane iz različitih donora, su pažljivo analizirane na protočnom citofluorimetru, i imunocitohemijskom metodom, na prisustvo ćelija koje ispoljavaju markere karakteristične za HSC (CD34), APC (HLA-DR), leukocite (CD45), B limfocite (CD19) i monocite (CD14). Ovim analizama je utvrđeno da kulture DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC nisu kontaminirane ćelijama koje se karakterišu ispitivanim markerima, zbog čega se imunomodulatorni efekti dobijeni u kulturama u nastavku istraživanja mogu tumačiti predominantno efektom ispitivanih MSC.

## **5.2. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC SE MEĐUSOBNO RAZLIKUJU PO POTENCIJALU ZA SAMO-OBNAVLJANJE**

S obzirom da je za postizanje željenog efekta na tok bolesti, najčešće neophodno primeniti više doza velikog broja MSC [81-83], kapacitet za samo-obnavljanje, odnosno mogućnost dobijanja dovoljnog broja ćelija u kratkom periodu, postaje jedan od preduslova za korišćenje ovih ćelija u ćelijskoj terapiji. U svetlu ove činjenice značajni su naši rezultati, da DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC imaju značajno veći proliferativni kapacitet u odnosu na BM-MSC. Ovo je u skladu sa rezultatima *Miura i sardnika* [169], koji su pokazali da DP-MSC imaju značajno veći kapacitet za deobu *in vitro* u odnosu na BM-MSC.

Rezultati naših istraživanja na DP-MSC i DF-MSC pokazali su da se ove dve populacije MSC međusobno razlikuju po kapacitetu za samo-obnavljanje *in vitro*. DP-MSC i DF-MSC, ispitivane tokom naših istraživanja, blago se razlikuju i po prosečnoj veličini ćelija. Veće DF-MSC su pokazale i veći kapacitet za proliferaciju, dok su manje DP-MSC sporije

proliferisale. Nasuprot ovim našim zapažanjima, rana istraživanja povezala su povećanje veličine ćelija u kulturi sa senescencijom ćelija [561-562]. Takođe, je uočeno da MSC nakon dugog održavanja u uslovima kulture postaju veće [73, 563-564] u odnosu na veličinu koju imaju na početku kultivacije. Sa produžavanjem kultivacije MSC formiraju veći broj lamelopodija i šire se po površini suda za kultivaciju [564], a sadrže i značajno više aktinskih filamenata uključenih u ćelijsko kretanje [563]. Međutim, kako su DP-MSK i DF-MSK u našim istraživanjima izolovane istovremeno, iz istog zuba, i kako su ove ćelije održavane *in vitro* pod istim uslovima, razlika u prosečnoj veličini između njih najverovatnije nije posledica starenja. Stoga se male razlike u prosečnoj veličini, izmerene u našim istraživanjima, između DP-MSK i DF-MSK ne mogu smatrati značajnim pokazateljom kapaciteta za samo-obnavljanje.

Dalje, kapacitet PL-MSK za samo-obnavljanje, odnosno procenat ćelija koje formiraju CFU-F, je manji u odnosu na MSC izolovane iz zdravog dentalnog tkiva. Smanjena sposobnost PL-MSK za samo-obnavljanje može biti posledica uticaja inflamacijskih molekula, kao što su citokini, faktori rasta i TLR-agonisti na MSC koje iz okolnih zdravih tkiva migriraju u periapeksnu leziju. Naime, pokazano je da IFN- $\gamma$  posredstvomIDO-1 enzima [524], i TNF- $\alpha$  aktivacijom signalnog puta preko Runx2 [525], ispoljavaju anti-proliferativni efekat na BM-MSK *in vitro*. Dalje, pored ovih pro-inflamacijskih citokina ispitivan je i efekat TLR agonista na kapacitet za samo-obnavljanje MSC iz zdravog tkiva. Tako su *Hwa Cho i saradnici* [228] pokazali inhibitorni efekat TLR9-agonista na proliferaciju AT-MSK, dok su *Lombardo i saradnici* [237] pokazali da aktivacija TLR3 i TLR4 ne utiče na kapacitet AT-MSK za proliferaciju, ali povećava ekspresiju mangansuperoksid dismutaze (MnSOD), za koju je pokazano da štiti ćelije u uslovima oksidativnog stresa [241] i produžava njihovo preživljavanje. Kako je jedan od osnovnih inicijalnih mehanizama borbe protiv patogena produkcija slobodnih kiseoničnih radikala od strane ćelija imunskog sistema, ovaj efekat aktivacije TLR može zaštititi MSC koje migriraju na mesto inflamacije.

### **5.3. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC SE MEĐUSOBNO RAZLIKUJU PO SPOSOBNOSTI ZA DIFERENCIJACIJU U ĆELIJSKE TIPOVE MEZENTHIMSKOG POREKLA**

Ukoliko se zanemari nešto manji potencijal za samo-obnavljanje DP-MSC, veći potencijal za diferencijaciju ovih ćelija u osteoblaste i hondroblaste, u poređenju sa DF-MSC, čini DP-MSC boljim izborom za regeneraciju skeletnih oštećenja. Izdvajanjem subpopulacija MSC čiji je potencijal za diferencijaciju usmeren na tkiva koja je potrebno regenerisati kod određenog oštećenja, smanjuje se broj potrebnih ćelija koje se primenjuju po jednoj dozi. Korišćenjem tkiva koje je bogato subpopulacijom MSC koje poseduje poželjnu osobinu povećava se početni prinos ćelija i smanjuje vreme potrebno za propagaciju ćelija. U ovom smislu, napretku razvoja MSC-terapije značajno su doprinela istraživanja u kojima su opisani površinski markeri MSC čija je ekspresija povezana sa posedovanjem određene karakteristike. *Battula i saradnici* [565] su opisali da se dodatnim sortiranjem CD271 pozitivne BM-MSC populacije na osnovu ekspresije CD56, dobija duplo pozitivna ćelijska populacija koja ima značajno povećanu sposobnost za hondrogenzu i osteogenezu. U skladu sa ovim podacima, veća sklonost DP-MSC, u našim istraživanjima, za diferencijaciju u osteoblaste i hondroblaste, može biti posledica većeg udela ćelija koje na svojoj površini ispoljavaju molekul CD56, u poređenju sa DF-MSC. Stoga bi najveća zastupljenost CD56<sup>+</sup> ćelija u DP-MSC, mogla biti prednost dentalne pulpe kao tkiva izbora za izolaciju MSC za terapiju skeletnih oštećenja i za regeneraciju dentalnog tkiva.

Iako imaju najmanji kapacitet za samo-obnavljanje, PL-MSC su pokazale najveći potencijal za osteogenu i hondrogenu diferencijaciju *in vitro*. Nasuprot ovom našem rezultatu, većina autora, koji su rezultate svojih istraživanja objavili kasnije, pokazala je da MSC izolovane sa mesta zapaljenja imaju značajno smanjen kapacitet za diferencijaciju [277, 566-567]. Međutim, rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su da efekat pojedinih inflamacijskih faktora na diferencijaciju MSC izolovanih iz zdravih tkiva može biti značajno različit. Tako je pokazano da visoke koncentracije IFN- $\gamma$  (100U/ml) preko indukcijeIDO-1 enzima [524], kao i IL-6 [527] i TNF- $\alpha$  [526] inhibiraju proces osteo/hondrogeneze mišijih i humanih

BM-MSK *in vitro*. Nasuprot inhibitornom uticaju ovih citokina, pokazano je da IL-1 $\beta$ , aktivacijom Wnt5a/Ror2 nekanonskog puta [528], i IL-17 [529], snažno stimulišu osteogenezu humanih BM-MSK *in vitro*. Prisustvo IL-1 $\beta$  i IL-17, za koje je pokazano da imaju bitnu ulogu u razvoju periapeksne lezije [418], u periapeksnoj leziji može značajno uticati na potencijal za diferencijaciju MSK koje migriraju na mesto inflamacije, što je u skladu sa našim rezultatima dobijenim na PL-MSK. Pored ovih pro-inflamacijskih citokina, imunoregulatorni molekul TGF- $\beta$  može imati važnu ulogu u regulaciji inflamacijske reakcije u periapeksnoj leziji [275, 568]. Upravo TGF- $\beta$  ima najvažniju ulogu u promociji hondrogeneze MSK izolovanih iz zdravog tkiva, *in vitro* [530-532]. Pored ostalih imunoregulatornih ćelija izolovanih iz periapeksne lezije za koje je pokazano da produkuju TGF- $\beta$  [275], u ovim istraživanjima smo pokazali da i same PL-MSK produkuju ovaj molekul, što bi mogao da bude uzrok jačem potencijalu ovih ćelija za hondrogenezu *in vitro*. Osim TGF- $\beta$ , nivo FGF (posebno FGF-2) je značajno povišen u periapeksnim lezijama kod ljudi [569], a ovaj molekul je, takođe, neophodan za indukciju hondrogeneze MSK [67, 94-95]. Pored citokina, TLR ligandi poreklom od patogena ili nekrotičnih ćelija u periapeksnoj leziji takođe mogu uticati na potencijal za diferencijaciju MSK. *Porphyromonas gingivalis*, za koji se smatra da je ključni patogeni inicijator nastanka i razvića periapeksne lezije, poseduje jedinstvenu kombinaciju atipičnog LPS-a i bakterijskog lipopeptida koja aktivira TLR2 [252-255]. Istraživanja o uticaju aktivacije TLR2 na proces diferencijacije MSK dala su veoma različite rezultate. Tako su *Pevsner-Fischer i saradnici* [229] pokazali da aktivacija TLR2 deluje inhibitorno na potencijal za diferencijaciju BM-MSK. Sa druge strane *Hwa Cho i saradnici* [228] su pokazali da AT-MSK stiču veći osteogeni potencijal nakon tretmana TLR2 agonistom, što je u skladu sa našim rezultatima. Dalje, više puta je pokazano da agonisti drugih TLR utiču na sposobnost MSK za osteogenezu. Potencijal za osteogenezu *in vitro* humanih BM-MSK, AT-MSK i UCB-MSK značajno se povećava nakon tretmana ovih ćelija TLR4 i TLR3 agonistima [228, 237], a smanjuje aktivacijom TLR9 na AT-MSK [228]. Rezultati *Cho i saradnika* [240] su pokazali da TNF- $\alpha$  i TLR3 agonisti inicira aktivaciju NF- $\kappa$ B u AT-MSK i stimuliše njihovu osteogenezu. Dakle, na osnovu do sada pokazanih *in vitro* efekata pojedinih molekula karakterističnih za proces inflamacije, na osobine MSK izolovane iz

zdravih tkiva, sasvim je verovatno da je potencijal za samo-obnavljanje i diferencijaciju PL-MSC detektovan u našim istraživanjima posledica uticaja mreže pro-inflamacijskih i anti-inflamacijskih molekula i ćelija na MSC koje migriraju u periapeksnu leziju.

#### **5.4. DP-MSC, DF-MSC I PL-MSC IZAZIVAJU TRANSPLANTACIJSKU REAKCIJU NAKON *IN VIVO* PRIMENE KOD NEONATALNIH MIŠEVA**

Iako smo pokazali da DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC poseduju osobinu multipotentnosti *in vitro*, nisu uočeni znaci diferencijacije ovih ćelija nakon subkutane ksenogene transplantacije, u neonatalne miševe. Naime, na presecima tkiva izolovanih sa mesta transplantacije, 18 dana nakon transplantacije MSC u region iza uha, bili su uočljivi infiltrati ćelija sastavljeni od inflamacijskih ćelija i fibroblastne kapsule oko tkiva. Sličnu imunološku reakciju detektovali su i *Niemeyer i saradnici* [570] nakon transplatacije BM- MSC, odnosno *Grinnemo i saradnici* [571] nakon transplantacije AT- MSC, u imunokompetentne glodare. Nasuprot ovim podacima, jedan broj laboratorija je u skorije vreme objavio da MSC poseduju jedinstvenu osobinu da indukuju toleranciju u imunokompetentnim primaocima alogenog ili čak ksenogenog transplantata [572-573]. Mehanizmi ove imunotolerancije su ispitivani veoma intenzivno i za sada je pokazano da ulogu imaju tri povezana mehanizma [371, 574]. Primenjene MSC izbegavaju imunološku reakciju primaoca zahvaljujući hipoimunogenom statusu, sposobnosti da moduliraju fenotip T limfocita i deluju imunosupresivno na lokalno okruženje. Sa druge strane, pokazano je da MSC mogu steći pro-inflamacijske karakteristike pod uticajem različitih pro-inflamacijskim stimulusa, među kojima su i DAMP koji se oslobađaju nakon oštećenja tkiva u toku transplantacije [243-244, 299, 575]. Slična aktivacija MSC može objasniti relativno jak ksenogeni odgovor detektovan u našim eksperimentima nakon transplantacije DP- MSC, DF- MSC i PL- MSC *in vivo*. U daljim ispitivanjima potencijala DP- MSC, DF- MSC i PL- MSC za diferencijaciju *in vivo*, potrebno je koristiti imunokompromitovane životinje, koje se standardno koriste u ovakvim esejima [167, 169, 176, 179, 181-182, 193, 197].

Dakle, sve tri ćelijske linije koje smo metodom adherence izolovali iz tri različita tkiva su pokazale sposobnost za samo-obnavljanje, potencijal za diferencijaciju u tri tipa ćelija mezenhinskog porekla, kao i fenotipske i morfološke osobine koje odgovaraju MSC. Na osnovu minimuma kriterijuma neophodnih za karakterizaciju jedne ćelijske linije kao linije MSC, možemo sa sigurnošću reći da su ćelije izolovane iz dva različita zdrava dentalna tkiva kao i ćelije izolovane iz periapeksne lezije po tipu MSC.

## **5.5. DP-MSC, ZA RAZLIKU OD DF-MSC, POSEDUJU IMUNOSUPRESIVNE OSOBINE**

Otkriće imunoregulatornih karakteristika MSC otvorilo je sasvim novo polje istraživanja na kom se objašnjavaju mehanizmi koje ove ćelije koriste u interakcijama sa ćelijama imunskog sistema. Osim uticaja MSC na ćelije u okolini, istraživanja u ovoj oblasti se bave uticajem ćelija i faktora produkovanih na mestu inflamacije na osobine MSC. Do danas je, na animalnim modelima različitih bolesti, ispitivan efekat primene MSC pripremljenih na različite načine. Sva ova istraživanja sprovode se u cilju primene ovih ćelija u ćelijskoj terapiji kod ljudi. Potencijal MSC za regeneraciju tkiva, i njihova sposobnost da deluju imunosupresivno predstavlja kombinaciju poželjnih osobina za terapiju svih patoloških stanja koja se odlikuju neodgovarajućom imunološkom reakcijom, čiji medijatori uzrokuju oštećenje okolnog tkiva. Veliki broj radova pokazao je da BM-MSC, *in vitro* i *in vivo*, poseduju imunomodulatorne i anti-inflamacijske efekte. Retki, noviji radovi su pokazali da MSC iz dentalnih tkiva, gingive [180], PDLSC [191], DP-MSC [576], takođe ispoljavaju anti-proliferativni efekat na PBMC ili T limfocite stimulisane antigenom ili mitogenom, i to u relativno malom odnosu MSC i PBMC (1/10). Manji broj dentalnih MSC u kulturi nije pokazao imunosupresivni efekat u istraživanjima navedenih autora [180, 191, 576]. Međutim, *Bocelli-Tyndall i saradnici* [577] su pokazali da humane BM-MSC primenjene u ovom odnosu mogu ispoljiti i alostimulatorni efekat na PBMC stimulisane pojedinačnim citokinima, IL-2, IL-7 ili IL-15, i indukovati povećanu produkciju IL-2 i IFN- $\gamma$  u ko-kulturi. Po našem i po mišljenju drugih autora [577] Odnos MSC/PBMC 1/10 u ko-kulturi bi mogao da bude relevantniji za *in vivo* uslove, kad pod uticajem pro-inflamacijskih

molekula, retke MSC migriraju na mesto inflamacije, od odnosa u kome su MSC zastupljene u većem broju. Upravo zbog toga je u našim istraživanjima ispitivan efekat MSC iz dentalnog tkiva na PBMC pri odnosu 1/10 ovih ćelija u ko-kulturama. Odsustvo efekta DF-MSC na proliferaciju PBMC u ovim ko-kulturama u skladu je sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da BM-MSC moraju biti pre-tretirane pro-inflamacijskim molekulima (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) da bi ispoljile imunosupresivni potencijal [288, 292, 295]. U ovom smislu, *Chan i saradnici* [299] su objavili zanimljive rezultate o regulaciji imunomodulatorne funkcije MSC pod uticajem IFN- $\gamma$ . Oni su pokazali da MSC same, u odsustvu dodatnih tretmana, produkuju niske koncentracije IFN- $\gamma$ , koji preko IFNR-I indukuje ekspresiju MHC II što čini ove ćelije slabim antigen prezentujućim ćelijama sa ograničenim alostimulatornim kapacitetom. Sličan efekat se postiže ako se MSC izlože niskim koncentracijama IFN- $\gamma$  (10U/ml), dok visoke koncentracije IFN- $\gamma$  (100U/ml) inhibiraju ekspresiju MHC II i alostimulatorni kapacitet MSC. Po tumačenju ovih autora, rezultati ukazuju na to da MSC, usled endogene produkcije IFN- $\gamma$ , poseduju funkciju APC u stanju homeostaze, a da visoka produkcija ovog molekula tokom snažnog inflamacijskog odgovora stimuliše imunosupresivne karakteristike MSC. Sa druge strane, DP-MSC su u ovim ko-kulturama ispoljile anti-proliferativni efekat na PBMC stimulisane mitogenom (PHA) iako prethodno nisu bile tretirane nikakvim pro-inflamacijskim molekulima. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima koje su objavili *Di Nikola i saradnici* [371] o imunosupresivnom kapacitetu netretiranih BM-MSC. *Mougiakakos i saradnici* [294] su pokazali da humane BM-MSC, pod uticajem solubilnih molekula produkovanih tokom ko-kulture sa stimulisanim PBMC, imaju značajno veći kapacitet za indukciju Treg ćelija u sekundarnoj MLR, u poređenju sa BM-MSC u primarnoj MLR. U skladu sa ovim rezultatima može se pretpostaviti da od podložnosti određene populacije MSC uticaju pro-inflamacijskih faktora, može zavisiti da li će one biti imunosupresivne tek nakon prethodnog tretmana visokim koncentracijama ovih molekula *in vitro* [299], ili ovakvu osobinu mogu steći i pod uticajem mikrosredine koja se stvara u toku ko-kultivacije u MLR [294]. U ovom smislu DP-MSC mogu biti osetljivije na pro-inflamacijske molekule, pa je dovoljno prisustvo molekula koje PHA-stimulisane PBMC produkuju u ko-kulturi da bi se ispoljio njihov imunosupresivni efekat. Sa druge strane, DF-MSC mogu biti otpornije na

uticaj ovih molekula te u istovetnim kulturama ne dolazi do aktivacije njihove imunosupresivne funkcije. Ovi naš rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživača [300-301] koji su ukazali na to da inflamacijski status lokalne sredine reguliše osobine MSC i može dovesti do sasvim suprotnih efekata pri njihovom eventualnom korišćenju u terapiji.

## **5.6. AGONISTI TLR MENJAJU IMUNOMODULATORNE OSOBINE DP-MSC I DF-MSC**

Uzimajući u obzir da oralnu duplju naseljava veliki broj sojeva mikroorganizama [250], i da svakodnevno preko hrane unosimo veliki broj mikroorganizama, sasvim je očekivano da dentalna tkiva tokom života svakog čoveka budu izložena različitim PAMP-ovima i pro-inflamacijskim molekulima, produktima aktiviranih imunskih ćelija. Ćelije imunskog sistema preko različitih urođenih receptora, među kojima su najbitniji TLR, mogu da detektuju prisustvo mikroorganizama, i kao odgovor na ove stimulse proizvode različite pro-inflamacijske molekule, što omogućava razvijanje odgovarajućeg imunskog odgovora i eliminaciju patogena. Receptore urođene imunosti ispoljavaju i ćelije koje ne pripadaju imunskom sistemu, kao što su fibroblasti [233], endotelne ćelije [578], a pokazano je da ligandi za ove receptore mogu da menjaju i osobine BM-MSC, AT-MSC i UCB-MSC [228-231, 237, 240, 243]. Rezultati naših istraživanja po prvi put su pokazali da DP-MSC, DF-MSC i PL-MSC ispoljavaju TLR3 i TLR4. Na osnovu ovih rezultata, može se pretpostaviti da infekcija dentalnih tkiva može značajno da menja osobine lokalnih MSC, tako da ove ćelije mogu biti aktivni učesnici u odgovoru organizma na patogene. U cilju provere ove naše pretpostavke, po prvi put je u našim istraživanjima ispitivan *in vitro* efekat TLR3 i TLR4 agonista na imunomodulatorne karakteristike MSC izolovane iz zdravih dentalnih tkiva, DP-MSC i DF-MSC.

Pored ispitivanja uloge TLR agonista na endogene MSC u cilju otkrivanja funkcije ovih ćelija na mestu inflamacije i oštećenja tkiva, podaci o uticaju TLR agonista na biologiju MSC su važni i u ispitivanjima potencijalnog korišćenja ovih ćelija u terapijske svrhe. Naime, terapijski efekat primenjenih MSC se, makar delimično, zasniva na njihovoj



migraciji na mesto inflamacije i/ili oštećenja tkiva, čija je važna odlika prisustvo povišenih koncentracija PAMP-ova i/ili DAMP-ova. Takođe, minimalna oštećenja tkiva su neizbežna i pri samom postupku primene MSC (intravenski, intraarterijski, intraventrikularno ili primena MSC na samom mestu oštećenja/inflamacije) pri čemu se oslobađa određena koncentracija DAMP-ova. Iz ovih razloga, istraživanja o ulozi DAMP-ova i PAMP-ova na biologiju MSC predstavljaju ključni preduslov za njihovu primenu u ćelijskoj terapiji kod ljudi.

O ulozi agonista TLR3 i TLR4 receptora na imunomodulatorne efekte BM-MSC postoje kontradiktorni rezultati. *Liotta i saradnici* [230] su pokazali da tretman humanih BM-MSC TLR3 i TLR4 agonistima smanjuje sposobnost ovih ćelija da inhibiraju proliferaciju T limfocita, dok su nasuprot njima, *Optize i saradnici* [231] pokazali da aktivacija istih TLR receptora na BM-MSC povećava anti-proliferativni efekat ovih ćelija na PBMC. Najverovatniji razlog za dobijanje suprotnih rezultata je što su *Liotta i saradnici* dodavali TLR agoniste u ko-kulturu BM-MSC i PBMC, pa povećana proliferacija može biti posledica direktnog uticaja TLR agonista ne samo na BM-MSC, već i na PBMC koje ispoljavaju TLR3 i TLR4. Sa druge strane, *Optize i saradnici* su tretirali same BM-MSC, koje su tek nakon ispiranja od ostataka agonista ko-kultivisali sa PBMC. Ono što je zajedničko rezultatima ove dve grupe autora je da TLR3 i TLR4 ispoljavaju isti efekat na BM-MSC. Nasuprot ovim rezultatima, *Waterman i saradnici* [243] su pokazali da nakon tretmana TLR4-agonistom BM-MSC stižu pro-inflamacijske karakteristike, dok tretman TLR3-agonistom potencira njihove imunosupresivne efekte.

Naši rezultati su pokazali da kvalitet efekata TLR3 i TLR4 agonista zavisi od porekla MSC. Tako smo pokazali da netretirane DF-MSC ne menjaju proliferaciju PBMC u ko-kulturi, ali da stižu imunosupresivnu funkciju nakon poly(I:C) i LPS tretmana tokom 24h. Aktivacija DP-MSC TLR3-agonistom takođe stimuliše njihov anti-proliferativni efekat na PBMC u ko-kulturi. Međutim, iako smo pokazali da i u odsustvu tretmana, DP-MSC poseduju anti-proliferativni efekat na PBMC u ko-kulturi, nakon tretmana LPS-om one gube ovu imunosupresivnu funkciju. Ovakav različit efekat LPS-a na DF-MSC i DP-MSC može biti posledica različitog nivoa ekspresije TLR4 na ovim ćelijama, pri čemu smo pokazali da

DP-MSC ispoljavaju značajno viši nivo mRNK za ovaj receptor. Ovakva pretpostavka je u skladu sa podacima drugih autora o različitom odgovoru ćelija na različite koncentracije LPS-a [579], kao i od nivoa ekspresije TLR4 [580]. Sem toga, TLR4 je jedini TLR koji nakon aktivacije pokreće dve signalne kaskade molekula, jednu preko MyD88 molekula i jednu preko TRIF molekula. Ovi signalni putevi regulisani su mnogobrojnim regulatornim molekulima što ostavlja mogućnost značajne modulacije odgovora ćelije na aktivaciju agonistima TLR4 [202]. Puno podataka ukazuje da je baš TLR4 [581-583] odgovoran za prepoznavanje molekula koji se oslobađaju iz oštećenih ćelija, zbog čega je neminovna aktivacija ovog receptora na MSC koje bi se primenile u terapiji različitih poremećaja. Na osnovu naših rezultata, potencijalna primena DP-MSC i DF-MSC u ćelijskoj terapiji može dovesti do sasvim različitih ishoda ukoliko dođe do aktivacije TLR4 na njihovoj površini.

## **5.7. IMUNOSUPRESIVNI MEHANIZMI DP-MSC I DF-MSC PODLOŽNI SU MODULACIJI TLR AGONISTIMA**

Pokazano je da mnogobrojni solubilni molekuli sa već dobro poznatim imunosupresivnim efektima (TGF- $\beta$ , IL-10, PGE2, NO,IDO-1, TSG6, MMP-CCL2, HLA-G, IL-6, LIF, HO-1) posreduju i u imunomodulatornim mehanizmima MSC [584].

U skladu sa ovim podacima, naša istraživanja su pokazala da je sposobnost netretiranih DP-MSC da inhibiraju proliferaciju PBMC u ko-kulturi u korelaciji sa visokom produkcijom TGF- $\beta$ 1 od strane DP-MSC u kulturi. Neutralizacija TGF- $\beta$  u ko-kulturama PBMC i netretiranih DP-MSC dovela je do potpunog oporavka proliferacije PBMC, na osnovu čega smo zaključili da je TGF- $\beta$  značajan posrednik u imunosupresivnom efektu DP-MSC u odsustvu TLR stimulacije. Ovi rezultati su u skladu sa podacima *Di Nicola i saradnika* [371], koji su identifikovali TGF- $\beta$ 1 i HGF kao značajne posrednike imunosupresivnih efekata netretiranih BM-MSC.

Pored kontradiktornih podataka o efektu TLR3-agonista i TLR4-agonista na BM-MSC, postoje i različiti podaci o mehanizmima BM-MSC na koje ovi TLR-agonisti deluju. Tako su *Liotta i saradnici* [230] pokazali da tretman BM-MSC poly(I:C)-om ili LPS-om nema

efekta na produkciju solubilnih molekula (PGE-2, produkti aktivnostiIDO-1 enzima) od strane ovih ćelija, već dovodi do snižavanja ekspresije Jagged-1 molekula u BM-MS. Jagged-1 u interakciji sa Notch receptorom, posreduje u anti-proliferativnom efektu BM-MS na T limfocite, i snižavanje ekspresije ovog molekula u BM-MS rezultuje smanjenjem imunosupresivne aktivnosti ovih ćelija. Nasuprot ovim rezultatima, *Optize i saradnici* [231] su pokazali da aktivacija istih TLR receptora na BM-MS deluje u smeru povećanja ekspresijeIDO-1 enzima, čime se povećava anti-proliferativni efekat ovih ćelija na PBMC. Takođe, oni su pokazali da je povećanje ekspresijeIDO-1 enzima u BM-MS posledica uticaja povećanih koncentracijaIFN- $\beta$  na ove ćelije, pri čemu same BM-MS povećavaju produkciju ovog citokina nakon tretmana TLR3 i TLR4 agonistima. *Watterman i saradnici* [243] su pokazali da BM-MS nakon 1h tretmana LPS-om proizvode značajno veće koncentracije IL-6 i IL-8, ispoljavaju značajno veći nivo Jagged-1 i ne menjaju nivo ekspresijeIDO-1, dok nakon jednočasovnog tretmana poly(I:C)-om BM-MS značajno povećavaju produkciju IP10 i RANTES, i u nešto manjoj meri IL-4 i IL-10, značajno smanjuju produkciju TGF- $\beta$ 1,3, ispoljavaju niži nivo Jagged-1 molekula, ali značajno viši nivoIDO-1 enzima. Posledica ovakvih promena je da su BM-MS nakon tretmana TLR4-agonistom delovale alostimulatorno na proliferaciju PBMC, dok netretirane ili tretirane TLR3-agonistom BM-MS nisu pokazale nikakav efekat na proliferaciju PBMC.

Pored uloge TGF- $\beta$  u imunosupresivnom efektu netretiranih DP-MS, pokazali smo da DP-MS i DF-MS nakon tretmana TLR-agonistima značajno povećavaju produkciju ovog molekula u kulturama. Takođe, DP-MS i DF-MS zadržavaju isti odnos produkcije TGF- $\beta$  i nakon ispiranja ćelija od TLR agonista, što ukazuje na to da su efekti aktivacije TLR na produkciju ovog citokina od strane MS proizvedeni. Na osnovu ovog podatka se može pretpostaviti da su promene u produkciji TGF- $\beta$  od strane DP-MS i DF-MS nastale nakon tretmana TLR agonistima, povezane sa promenama imunomodulatornog efekta tretiranih MS u ko-kulturama sa PBMC, u odnosu na efekte netretiranih MS. U skladu sa ovom pretpostavkom, jači imunosupresivni efekat koji su DP-MS i DF-MS ispoljile nakon tretmana TLR3-agonistom je u korelaciji sa povećanjem produkcije TGF- $\beta$  od strane ovih ćelija. LPS je imao još značajniji stimulatorni efekat na produkciju TGF- $\beta$

od strane DF-MS, dok isti tretman kod DP-MS značajno inhibira produkciju TGF- $\beta$ . Inhibicija produkcije TGF- $\beta$  od strane DP-MS tretiranih LPS-om je u korelaciji sa odsustvom anti-proliferativnog efekta ovih ćelija na alogene PBMC. Ovim rezultatima smo pokazali da je upravo TGF- $\beta$ -posredovan imunomodulatorni mehanizam DP-MS i DF-MS podložan modulaciji TLR-agonistima. Ipak, neutralizacija TGF- $\beta$  u ko-kulturama PBMC i dentalnim MS koje su pre-tretirane TLR-agonistima, nije dovela do potpunog oporavka proliferacije. Ovi rezultati pokazuju da TGF- $\beta$ -posredovan mehanizam nije jedini imunomodulatorni mehanizam koji pokreće tretman DP-MS i DF-MS TLR-agonistima. Nasuprot našim rezultatima, *Optiz i saradnici* [231] su pokazali da aktivacija TLR3 i TLR4 na BM-MS ne utiče na produkciju TGF- $\beta$  već dovodi do povećanja ekspresijeIDO-1 enzima u ovim ćelijama.IDO-1 posreduje u degradaciji triptofana [585], što predstavlja jedan od važnih mehanizama imunosupresivnog efekta MS na T limfocite [293]. Pored efekta izgladnjivanja aktivno-proliferišućih limfocita usled nedostatka triptofana, produkti degradacije triptofana kao što je kinurenin, takođe su direktno uključeni u anti-proliferativne efekte MS na PBMC u ko-kulturi. Naime, nedavno je pokazano da kinurenin preko AHR direktno deluje na T limfocite tako što povećava ekspresiju Foxp3 i inicira diferencijaciju Treg [435]. Pored povećanja ekspresijeIDO-1 nakon tretmana BM-MS TLR-agonistima [231], pokazano je da se ekspresija ovog enzima u BM-MS povećava i u prisustvu visokih koncentracija IFN- $\gamma$  [292]. Uzimajući u obzir ove podatke o uloziIDO-1 u imunosupresivnoj funkciji BM-MS, u nastavku istraživanja smo ispitivali ulogu ovog enzima u imunomodulatornim mehanizmima MS iz zdravih dentalnih tkiva. Naši rezultati su u skladu sa već pokazanom imunosupresivnom ulogomIDO-1, i pokazuju da netretirane DP-MS ispoljavaju viši nivoIDO-1 u poređenju sa netretiranim DF-MS, što je u korelaciji sa pokazanim imunosupresivnim efektom netretiranih DP-MS i odsustvom ovakvog efekta u slučaju netretiranih DF-MS. Pored toga, pokazali smo da je ovaj imunosupresivni mehanizam podložan modulaciji TLR agonistima. Tako, DP-MS i DF-MS nakon tretmana LPS-om ispoljavaju značajno niži nivoIDO-1. Ovakva promena u ekspresijiIDO-1 kod DP-MS je u korelaciji sa gubitkom imunosupresivnog efekta ovih ćelija nakon tretmana LPS-om. Međutim, i pored snižavanja ekspresije ovog imunosupresivnog enzima u DF-MS nakon tretmana LPS-om, ovaj tretman indukuje

sposobnost DF-MSC da deluju anti-proliferativno na PBMC u ko-kulturi. Analizom efekta LPS-a na produkciju TGF- $\beta$  iIDO-1 enzima od strane DP-MSC i DF-MSC, može se pretpostaviti da je efekat ovih ćelija na PBMC u ko-kulturi proizvod promena u produkciji ova dva imunosupresivna molekula. Stoga se gubitak imunosupresivnog efekta DP-MSC nakon tretmana LPS-om može objasniti inhibitornim efektom LPS-a na produkciju TGF- $\beta$  i ekspresiju IDO-1 u ovim ćelijama. Sa druge strane, indukcija imunosupresivnog efekta kod DF-MSC nakon tretmana LPS-om, može biti proizvod snažnog stimulatornog efekta ovog TLR4-agonista na produkciju TGF- $\beta$ , čiji efekti prevazilaze efekat blagog snižavanja ekspresije IDO-1 u istim uslovima kultivacije DF-MSC. Slabiji inhibitorni efekat LPS-a na ekspresiju IDO-1 kod DF-MSC može biti posledica nižeg nivoa ekspresije TLR4 na ovim ćelijama u odnosu na DP-MSC. Inhibitorni efekat LPS-a na ekspresiju IDO-1 u oba tipa dentalnih MSC, može da ukaže na to da LPS pre svega inhibira direktni anti-proliferativni efekat ovi ćelija. Sa druge strane, tretman TLR3 agonistom u našim istraživanjima nije uticao na ekspresiju IDO-1 u DP-MSC i DF-MSC, dok je snažno stimulisao produkciju TGF- $\beta$  od strane ovih ćelija. Ovi rezultati koji ukazuju na suštinski drugačiji imunomodulatorni efekat dentalnih MSC tretiranih TLR4 agonistom u odnosu na tretman TLR3 agonistom, je u skladu sa rezultatima *Waterman i saradnika* [243] koji su pokazali da LPS stimuliše BM-MSC sa pro-inflamacijskim osobinama, dok TLR3 podstiče imunosupresivne efekte BM-MSC [243]. Dobijene razlike između naših rezultata, i rezultata koje su dobili *Optize i Waterman sa saradnicima*, mogu biti posledica različite podložnosti dentalnih MSC na uticaje TLR agonista u odnosu na BM-MSC.

Pored uticaja na ove ekskluzivno imunosupresivne molekule, *Romieu-Mourez i saradnici* [244] su pokazali da BM-MSC tretirane TLR3 ili TLR4 agonistima produkuju IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i CCL5 i tako privlače inflamacijske ćelije, stvarajući pro-inflamacijsko jezgro. Rezultat ovih autora u skladu je sa našim podacima o povećanoj produkciji IL-6 od strane DP-MSC i DF-MSC nakon tretmana ovih ćelija TLR3 agonistom. Obzirom na pro-inflamacijske efekte IL-6 ovo može biti u suprotnosti sa detektovanim anti-proliferativnim efektom dentalnih MSC tretiranih TLR3 agonistom na PBMC u ko-kulturi. Međutim, u tumačenju ovih rezultata ne sme se zaboraviti da je povećana produkcija IL-6 praćena i

povećanom produkcijom TGF- $\beta$  od strane dentalnih MSC tretiranih TLR3 agonistom. IL-6 i TGF- $\beta$  već dugo se ispituju kao potencijalni regulatori diferencijacije Th17 i Treg ćelija, pri čemu TGF- $\beta$  indukuje diferencijaciju Treg, a IL-6 stimuliše Th17 ćelije [586]. Pored mnogih radovi koji su ukazali na to da prisustvo oba citokina stimuliše T limfocite miša koji proizvode IL-17 [586], *McGeachy i saradnici* [587] su pokazali da je IL-6 neophodan za indukciju mišijih Th17, a da nakon dodavanja TGF- $\beta$  u kulture ovi T limfociti, oni počinju da proizvode imunoregulatorni citokin IL-10. Obzirom na ove rezultate, visoke koncentracije TGF- $\beta$  i IL-6, produkovanih od strane dentalnih MSC tretiranih poly(I:C)-om, mogle bi da indukuju diferencijaciju ovakvih, IL-10 proizvodećih T limfocita iz PBMC u ko-kulturi. Diferencijacija ovakvih imunosupresivnih ćelija mogla bi donekle da bude odgovorna za uočeni imunosupresivni efekat dentalnih MSC tretiranih TLR3-agonistom, na proliferaciju PBMC u ko-kulturi. Ovaj efekat poly(I:C), da stimuliše imunosupresivne sposobnosti dentalnih MSC, mogao bi u narednim eksperimentima da bude iskorišćen za supresiju kseno-transplantacijske reakcije uočene u našim eksperimentima nakon transplantacije netretiranih dentalnih MSC u neonatalne miševе.

Obzirom na pokazani potencijal za diferencijaciju i imunomodulatorne sposobnosti DP-MSK i DF-MSK, primena ovih ćelija u terapiji može dovesti do sasvim različitih ishoda.

Obzirom da su pod uticajem TLR3-agonista i TLR4-agonista DF-MSK ispoljile anti-inflamacijski efekat one bi mogle da budu iskorišćene u terapiji bolesti koje se karakterišu hroničnom inflamacijom.

Sa druge strane, DP-MSK mogu biti primenjene u terapiji skeletnih oštećenja, obzirom na njihov potencijal za osteo/hondrogenu diferencijaciju. Međutim, pošto je više puta pokazano da TLR-agonisti mogu da utiču na potencijal MSC za diferencijaciju, istraživanja u cilju primene DP-MSK za regeneraciju oštećenog tkiva, morala bi da uključe i ispitivanje eventualnog efekta TLR4-agonista i drugih molekula na potencijal za diferencijaciju ovih ćelija.

## **5.8. PL-MSC ISPOLJAVAJU ANTI-PROLIFERATIVNI I ANTI-INFLAMATORNI EFEKAT NA MONONUKLEARE PERIFERNE KRVI *IN VITRO***

Zbog činjenice da *in vitro* postavljeni sistemi nikada ne mogu da u potpunosti odgovaraju uslovima u živom organizmu, da bi se što bolje opisala uloga MSC na mestu inflamacije te omogućilo ispitivanje moguće modulacije ovih ćelija u terapijske svrhe, potrebno je ispitati osobine MSC izolovanih sa mesta inflamacije. Rezultati naših istraživanja na PL-MSC, koji su deo ove disertacije, predstavljaju apsolutno pionirske podatke o imunomodulatornim osobinama MSC izolovanih sa mesta inflamacije. Obzirom da su PL-MSC unutar periapsne lezije, *in vivo*, bile izložene kompleksnoj mreži inflamacijskih molekula, a među kojima i TLR agonistima poreklom od patogena, uzročnika ove bolesti, osobine PL-MSC nam mogu dodatno rasvetliti potencijalnu ulogu ovih ćelija na mestu inflamacije. Tako nasuprot rezultatima *Prasanna i saradnici* [588], koji su pokazali da BM-MSC tretirane visokim koncentracijama IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  *in vitro* povećavaju ekspresiju MHC klase II na površini i tako stižu funkciju APC i stimulišu proliferaciju PBMC u ko-kulturi, naša istraživanja su pokazala da, i pored toga što upravo ovi citokini imaju značajnu ulogu u razvoju periapsne lezije, PL-MSC testirane nakon trećeg pasaža ne ispoljavaju MHC klase II, i u skladu sa tim nisu pokazale alostimulatornu sposobnost u ko-kulturi sa PBMC. Slaba imunogenost PL-MSC značajno može doprineti izboru ovih ćelija za primenu u ćelijskoj terapiji. Dalje, nasuprot osobinama DF-MSC pokazanim u našim istraživanjima, kao i mnogim radovima koji su pokazali da MSC iz zdravih tkiva stižu imunosupresivnu funkciju tek nakon tretmana pro-inflamacijskim molekulima [279, 292-293, 589], netretirane PL-MSC, bez ikakvog pre-tretmana *in vitro*, ispoljavaju snažan imunosupresivni efekat na proliferaciju PBMC u ko-kulturi. Anti-proliferativni efekat PL-MSC na PBMC u ko-kulturi u korelaciji je sa inhibitornim efektom ovih ćelija na produkciju IL-2, dobro poznatog faktora rasta limfocita. Ovi rezultati o imunosupresivnoj funkciji PL-MSC mogu da ukaže na bitnu ulogu ovih ćelija u regulaciji inflamacije u periapsnoj leziji. Nasuprot rezultatima *Prasanna i saradnika* [588], koji su pokazali da je za anti-proliferativnu funkciju MSC izolovanih iz zdravog tkiva neophodno da bude očuvana proliferacija samih

MSC, u našim istraživanjima su PL-MSC, čija je proliferacija inhibirana tretmanom mitomicinom B, ipak ispoljavale ovakav immunosupresivni efekat na PBMC u ko-kulturi. Pored inhibitornog efekta na proliferaciju PBMC, PL-MSC su delovale inhibitorno i na produkciju IFN- $\gamma$  i IL-5 u ko-kulturi. Povećana produkcija TGF- $\beta$  u ko-kulturama sa PBMC može biti posledica visoke produkcije TGF- $\beta$  od strane samih PL-MSC u kulturi. Anti-proliferativni i anti-inflamacijski efekat PL-MSC u ko-kulturama sa PBMC može biti posledica visoke produkcije TGF- $\beta$  od strane PL-MSC, obzirom da je pokazano da TGF- $\beta$  pored inhibicije proliferacije limfocita inhibira i njihovu diferencijaciju u Th1 i Th2 ćelije, i stimuliše diferencijaciju, i posreduje u immunosupresivnim funkcijama Treg ćelija [440].

## **5.9. PL-MSC ISPOLJAVAJU ANTI-INFLAMATORNI EFEKAT NA MONONUKLEARE IZOLOVANE IZ PERIAPEKSNE LEZIJE *IN VITRO***

Znajući da je TGF- $\beta$  važan imunoregulatorni medijator u regulaciji inflamacijskog odgovora u periapeksnoj leziji [418, 568], kao i njegovu važnu ulogu u razvoju i immunosupresivnom efektu Treg u periapeksnoj leziji [275], dalje smo ispitivali da li PL-MSC sa ovakvim imunomodulatornim osobinama, imaju sposobnost da utiču na produkciju pro-inflamacijskih citokina, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, koji imaju značajnu ulogu u patogenezi periapeksne lezije i aktivno učestvuju u resorpciji alveolarne kosti, najkardinalnijeg znaka ove bolesti [590-593]. Nivo produkcije IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  od starne PL-MSC u našim istraživanjima bio je na donjoj granici detekcije, dok su ove ćelije produkovale visoke koncentracije IL-6 i nešto niže IL-8. Ovi rezultati su u skladu sa podacima *Sumanasinghe i saradnika* [594] o niskoj produkciji IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , i visokoj produkciji IL-6 i IL-8 od strane BM-MSC. Da bi smo ispitali efekat PL-MSC na produkciju ovih citokina od starne PL-IC, upoređivali smo nivo citokina koji je produkovan u ko-kulturi PL-MSC i PL-IC, sa sumom produkcije ovih citokina u odvojenim kulturama ovih ćelija. PL-MSC su pokazale snažan anti-inflamacijski efekat na produkciju svih ispitivanih citokina, što još jednom ukazuje na to da ove ćelije mogu biti važni regulatori produkcije inflamacijskih medijatora u periapeksnoj leziji. Rezultati o produkciji citokina bez



direktnog ćelijskog kontakta pokazali su da su za ovakav anti-inflamacijski efekat odgovorni solubilni molekuli koje proizvode PL-MSC što je u skladu sa mnogobrojnim rezultatima drugih autora (pregled podataka dali su Ghannam i saradnici [584]). Takođe, ovi rezultati pokazali su da je za inhibični efekat na produkciju IL-8 potreban direktan ćelijski kontakt. Regulacija produkcije zavisa od direktnog ćelijskog kontakta može biti karakteristika regulacije IL-8 koja nije vezana samo za efekat PL-MSC na produkciju ovog citokina od strane PL-IC. Naime, pokazano je da je stimulacija produkcije IL-8 od strane monocita zavisa od direktnog kontakta sa T limfocitima [595].

Na osnovu pokazanog kapaciteta PL-MSC za samo-obnavljanje u kulturi, koji ukazuje na mogućnost uspešne ekspanzije, na osnovu njihovog potencijala za osteo/hondrogenu diferencijaciju i pre svega na osnovu pokazanih anti-inflamacijskih efekata u kulturi sa PBMC/PL-IC, ove ćelije mogu predstavljati ozbiljnog kandidata za ćelijsku terapiju periodontalnih bolesti, kao i drugih bolesti koje se istovremeno odlikuju i hroničnim inflamacijskim procesom i oštećenjem skeletnog tkiva.

## **5.10. PL-MSC RAZLIČITO UTIČU NA PROCES DOBIJANJA DENDRITSKIH ĆELIJA IZ MONOCITA PERIFERNE KRVI *IN VITRO***

Inhibični efekat PL-MSC na proliferaciju i produkciju citokina u ko-kulturama sa PBMC i PL-IC jednim delom može biti posledica direktnog inhibičnog efekta PL-MSC ili njihovih produkata na T limfocite. Međutim, u skorije vreme je objavljeno više podataka koji su pokazali da BM-MSC mogu značajno da utiču na proces nastanka DC i na funkcije DC [412]. Obzirom da se DC smatraju ćelijama koje ključno usmeravaju razvoj imunskog odgovora [596], uključujući njihovu ulogu u razvoju hroničnih inflamacijskih stanja kao što je periapeksna lezija [417, 597], efekat PL-MSC na funkcije DC mogao bi da bude značajan mehanizam imunoregulacije PL-MSC. Obzirom da monociti koji čine 10-30% PBMC [598], predstavljaju značajne prekursorske ćelije DC, supresivni efekat PL-MSC na monocite i DC takođe može imati značajnu ulogu u pokazanim immunosupresivnim efektima PL-MSC na PBMC i PL-IC u ko-kulturi.

Analiza preseka periapeksnih lezija, pokazala je da su MSC (detektovanih kao CD146<sup>+</sup> i STRO-1<sup>+</sup> ćelije) dominantno lokalizovane u perivaskularnom prostoru, ali da postoje i pojedinačne izdvojene ćelije unutar infiltrata. Ovakav položaj MSC u spoljašnjem zidu krvnih sudova mogao bi da im omogući kontakt sa mnogim ćelijama imunskog sistema koje migriraju na mesto inflamacije, kao što su monociti periferne krvi, koji ekstravazacijom iz krvnih sudova na mesto inflamacije. Pod uticajem pro-inflamacijskih faktora monociti se diferenciraju u inflamacijske DC [599]. U skladu sa ovom pretpostavkom, rezultati daljih analiza na presecima periapeksnih lezija pokazali su da nezrele DC (CD209<sup>+</sup>) i zrele DC (CD83<sup>+</sup>) ko-lokalizuju sa perivaskularno postavljenim MSC, kao i da postoje kontakti između DC i MSC izvan krvnih sudova, u infiltratu. Ovi preliminarni rezultati ukazali su na mogućnost da MSC u lezijama, zaista mogu deo svojih efekata da ostvare uticanjem na proces diferencijacije inflamacijskih DC, kao i na funkcije već diferenciranih DC u infiltratu. Da bi smo ovo ispitali u *in vitro* sistemu, monocite izolovane iz periferne krvi ili već diferencirane nezrele DC kultivisali smo same, ili na sloju adherentnih PL-MSK, i sazrevanje DC smo indukovali pro-inflamacijskim koktelom.

#### 5.10.1. PL-MSK deluju inhibitorno na diferencijaciju dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi *in vitro*

Na ovom, *in vitro* modelu inflamacijskih DC, smo pokazali da PL-MSK deluju inhibitorno na proces diferencijacije nezrelih DC iz monocita. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima o inhibitornom efektu humanih BM-MSK na proces diferencijacije nezrelih DC iz monocita [411] i CD34<sup>+</sup> progenitora kostne srži [413]. Takođe, pokazali smo da PL-MSK ovakav immunosupresivni efekat ostvaruju najvećim delom preko solubilnih faktora. Iako smo prethodno pokazali da PL-MSK proizvode značajne koncentracije IL-6, neutralizacijom ovog citokina u ko-kulturama PL-MSK i monocita, smo pokazali da ovaj citokin nema značajnu ulogu u supresivnom efektu PL-MSK na proces diferencijacije nezrelih DC iz monocita. Zaključili smo da ovakvom efektu PL-MSK značajnije doprinosi neki drugi solubilni molekuli. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima koje su *Nauta i saradnici* [412] dobili o mehanizmima koji dominantno posreduju u supresivnom efektu BM-MSK na

proces diferencijacije DC iz monocita. Na osnovu ovih rezultata potrebno je dalje ispitivati ulogu drugi faktori kao što su TGF- $\beta$ , HGF, PGE2 i drugih za koje je pokazano da posreduju u imunosupresivnom efektu MSC na DC [416, 584, 600].

### 5.10.2. Dendritske ćelije diferencirane u prisustvu PL-MS, nakon faze sazrevanja indukuju Th2/Th17 odgovor

Dalje, iako je u prisustvu PL-MS diferencijacija monocita u nezrele DC bila poremećena, dalji proces sazrevanja ovih ćelija, u odsustvu PL-MS, pod uticajem pro-inflamacijskog koktela nije bio izmenjen u odnosu na kontrolne DC. Ovo je u suprotnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa koje su pokazale da inhibitorni efekat MSC u toku diferencijacije DC, ne može biti prevaziđen tokom faze sazrevanja ovih ćelija pod uticajem LPS, CD40L ili TNF- $\alpha$  [411-413, 416]. Ove razlike između naših i rezultata drugih grupa, mogu delom biti posledica korišćenja različitog stimulusa u fazi sazrevanja, obzirom da je više puta pokazano da upravo od vrste stimulusa zavisi fenotip, alostimulatorni kapacitet zrelih DC, kao i sposobnost ovih ćelija da prevaziđu supresivni uticaj koji su na njih ispoljile MSC u toku faze diferencijacije [412, 601]. Ovu pretpostavku potvrdili smo eksperimentima u kojima je ispitivana sposobnost DC da pod uticajem LPS-a odnosno pro-inflamacijskog koktela prevaziđu inhibitorni uticaj PL-MS tokom faze diferencijacije. Naime, pokazali smo da DC diferencirane u prisustvu PL-MS, nakon indukcije sazrevanja pod uticajem pro-inflamacijskog koktela dostižu isti nivo ekspresije markera zrelosti i ispoljavaju istu alostimulatornu sposobnost kao odgovarajuće kontrolne DC. Sa druge strane, DC diferencirane u prisustvu PL-MS, nakon stimulacije LPS-om stiču fenotip sličan odgovarajućim kontrolnim DC, ali je njihova alostimulatorna sposobnost značajno slabija u poređenju sa kontrolnih DC. Pored toga što korišćenje različitog stimulusa za sazrevanje DC može u različitoj meri da dovede do prevazilaženja supresivnog efekat MSC u fazi diferencijacije DC, *van der Berk i saradnici* [512] su pokazali da MSC izolovane iz različitih tkiva mogu ispoljiti različite efekte na DC. Obzirom na ovaj podatak, efekat PL-MS na DC *in vitro*, bi mogao da bude posledica dugoročnih promena nastalih kod MSC koje migriraju u periapeksnu leziju pod uticajem jedinstvene mikrosredine. Najznačajnija

osobina zrelih DC koje su samo u fazi diferencijacije bile izložene direktnom uticaju PL-  
MSC, je njihova sposobnost da indukuju istovremeno značajniju produkciju IL-4 i IL-17 u  
ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima, u odnosu na kontrolne DC. Međutim, na osnovu  
produkcije citokina od strane ovih DC nije jasno kako one dovode do ovakve polarizacije  
Th odgovora. Ipak moguće je da se citokinski profil ovih DC menja pod uticajem citokina i  
kontakta sa limfocitima u MLR, pa bi ovakva merenja mogla dodatno da razjasne način na  
koji ove DC specifično usmeravaju diferencijaciju Th odgovora. Obzirom da je u skorije  
vreme pokazano da populacija CD4<sup>+</sup> T limfocita koji istovremeno proizvode i IL-4 i IL-17  
ima potencijalnu ulogu u patogenezi astme [602], bilo bi zanimljivo ispitati da li zrele DC  
koje su diferencirane u prisustvu PL-MSC, indukuju jednu populaciju limfocita koja  
istovremeno proizvode oba citokina, ili ipak dve populacije ćelija koje proizvode isključivo  
IL-4 ili IL-17.

### 5.10.3. Dendritske ćelije čije je sazrevanje indukovano u prisustvu PL-MSC indukuju snažniji Th1 odgovor

Dalje, naši rezultati o ulozi PL-MSC na proces sazrevanja već diferenciranih DC (koje su  
diferencirane bez prisustva PL-MSC, konvencionalne nezrele DC) u potpunoj su  
suprotnosti sa podacima drugih istraživačkih grupa, koje su pokazale da MSC ne  
ispoljavaju značajne efekte na nezrele DC u fazi sazrevanja [413, 416, 512]. Naime, PL-  
MSC su u našim istraživanjima ispoljile snažan pro-inflamacijski efekat na sazrevanje  
konvencionalnih nezrelih DC. Ovakve DC su značajno povećale ekspresiju svih testiranih  
markera zrelosti, ispoljile značajniji alostimulatorni efekat i pokazale značajno snažniju  
sposobnost da indukuju Th1 odgovor, u poređenju sa kontrolnim DC. Poznato je da snažna  
produkcija IFN- $\gamma$  inhibira IL-4 i IL-10, preko inhibicije GATA3 [603], što korelira sa Th  
profilom dobijenim u ko-kulturama CD4<sup>+</sup> T limfocita i DC koje su u fazi sazrevanja  
izložene uticaju PL-MSC. Iako su ove DC pokazale snažnu Th1-polarizujuću sposobnost,  
one su značajno manje proizvele IL-12 u odnosu na kontrolne DC. Postoji mogućnost da  
DC tokom ko-kulture u MLR počinju, pod uticajem IFN- $\gamma$ , da proizvode veće  
koncentracije IL-12 čime bi se objasnila njihova sposobnost da indukuju snažan Th1

odgovor. Pored ove mogućnosti, nekoliko radova je u skorije vreme pokazalo da Th1 odgovor, odnosno aktivacija STAT-1 i T-bet, može biti indukovan i posredstvom IL-27, nezavisno od IL-12 [604]. Pored povećane produkcije IL-27, ove DC su proizvodile i veće koncentracije IL-23, citokina koji podstiče funkciju Th17 ćelija, u odnosu na kontrolne DC [605]. Međutim, ovo nikako nije uticalo na produkciju IL-17 u ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima, što može biti objašnjeno inhibitorynim efektom IL-27 na diferencijaciju Th17 ćelija [606]. U skladu sa ovim našim rezultatima je rezultat o značajnoj produkciji IL-27 u periapsnoj leziji, kao i da egzogeno dodati IL-27 može favorizovati Th1 odgovor i inhibirati produkciju citokina od strane Th17 ćelija [508]. Pored toga, produkcija IL-27 detektovana je oko krvnih sudova u periapsnoj leziji [508], a rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da su PL-MSDC dominantno lokalizovane perivaskularno i da same značajno povećavaju produkciju IL-27 pod uticajem pro-inflamatornog koktela. Svi ovi rezultati idu u prilog pretpostavci da PL-MSDC mogu imati značajnu ulogu u IL-27 zavisnoj indukciji Th1 odgovora u periapsnoj leziji, i to direktno na T limfocite i delom kao posledica njihovog uticaja na DC.

#### 5.10.4. Dendritske ćelije koje su i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja bile izložene direktnom uticaju PL-MSDC stiču imunosupresivne karakteristike

Nasuprot pro-inflamatornim karakteristikama DC koje su samo u fazi sazrevanja bile izložene direktnom uticaju PL-MSDC, DC koje su tokom čitavog procesa dobijanja od monocita bile u ko-kulturi sa PL-MSDC (skraćeno DC dobijene u prisustvu PL-MSDC) su ispoljile imunosupresivni karakter. Ove DC su, iako ispoljavaju sličan nivo svih testiranih markera zrelosti kao i kontrolne DC, pokazale značajno niži alostimulatorni kapacitet, povećanu sposobnost da usmere odgovor CD4<sup>+</sup> T limfocita u ko-kulturi u Th2 smeru i da indukuju Treg populaciju ćelija. Više radova je pokazalo da MSC izolovane iz različitih tkiva indukuju tolerogene DC [411-413, 512, 584], ali smo mi po prvi put u ovim istraživanjima pokazali mehanizme koje ovako dobijene DC koriste za indukciju Treg. Tako smo pokazali da ove DC ispoljavaju značajno viši nivoIDO-1, ILT-3 i ILT-4 u

poređenju sa kontrolnim zreim DC, kao i da su upravo ovi molekuli odgovorni za kapacitet DC dobijenih u prisustvu PL-MSK da indukuju funkcionalne Treg. Ovi rezultati su u saglasnosti sa već dobro opisanom imunosupresivnom ulogom IDO-1, ILT-3 i ILT-4 ispoljenih na tolerogenim DC [513-514]. U cilju ispitivanja sposobnosti DC dobijenih u prisustvu PL-MSK da indukuju Treg, ispitivana je ekspresija Foxp3 na CD4<sup>+</sup> T limfociti koji su tokom 3 dana ko-kultivisani sa ovim DC. Pored korišćenja ovog standardnog markera za detekciju Treg, analizirali smo i ekspresiju CD39 na CD4<sup>+</sup> T limfocitima koji jako ispoljavaju CD25. Za razliku od Foxp3 za koji se smatra da ima funkciju prevashodno u razviću Treg [607], CD39 je direktno uključen u imunosupresivnu funkciju ćelija koje ga ispoljavaju. Naime, dobro je poznata uloga CD39 u konverziji pro-inflamacijskog ATP-a u AMP, koji se onda pomoću CD73 konvertuje u imunosupresivni adenozin [516, 608]. Naši podaci pokazuju da se značajno povećava udeo CD39<sup>+</sup> ćelija unutar CD4<sup>+</sup> T limfocitima koji jako ispoljavaju CD25, ali da samo 25% ovih ćelija istovremeno ispoljava i Foxp3 molekul. Ovaj rezultat ukazuje na indukciju i Foxp3<sup>-</sup> populacije supresorskih T limfocita nakon kontakta sa DC dobijenih u prisustvu PL-MSK. U skladu sa ovim našim rezultatima u radovima drugih autora je pokazano da IDO-1<sup>+</sup>ILT4<sup>+</sup> DC mogu da indukuju Tr1 populaciju ćelija koja proizvodi IL-10 i ima imunosupresivnu funkciju [609-610]. O imunosupresivnoj funkciji ovih ćelija govori i naš rezultat da sve CD39<sup>+</sup> ćelije, nezavisno od ekspresije Foxp3, ispoljavaju intracelularno IL-10. U skladu sa ovim našim rezultatima su i podaci drugih autora koji su ispitivali osobine ove posebne populacije IL-10-proizvodičkih supresorskih T limfocita i pokazali da ove ćelije ne ispoljavaju konstitutivno Foxp3 [519], i da ispoljavaju CD39 [518]. Dodatno, niži procenat CD25<sup>jako</sup> CD39<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u odnosu na procenat CD25<sup>jako</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija, može biti objašnjen činjenicom da Foxp3 može biti ispoljen prolazno kod efektorskih T limfocita [611], što takođe govori u prilog tome da je CD39 mnogo bolji marker funkcionalnih Treg ćelija.

Sa druge strane, uzimajući u obzir rezultate dobijene u istraživanju uticaja PL-MSK na DC, može se zaključiti da PL-MSK mogu različito da menjaju funkcije DC i odgovor T limfocita u periapeksnoj leziji. Na početku bolesti, PL-MSK bi potencijalno mogle da podstaknu sazrevanje rezidentnih DC tako da one otpočnu polarizaciju T limfocita u Th1

smeru. Nasuprot ulozi PL-MSK u ovim ranim fazama inflamacije, u kasnijim fazama bolesti, koje se karakterišu povećanom ekstravazacijom monocita [612], perivaskularno postavljene PL-MSK bi uticajem na monocite mogle da favorizuju razvoj tolerogenih DC sa sposobnošću polarizacije limfocita u Th2 smeru i indukcije Treg. U ovim naprednim fazama razvoja periapeksne lezije, PL-MSK bi mogle na ovaj način da doprinesu supresiji inflamacije i regeneraciji oštećenog tkiva [275, 418].

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

### **1. Linije mezenhimskih matičnih ćelija uspostvaljene iz dentalne pulpe, dentalnog folikula i periapexnih lezija se razlikuju po fenotipskim i diferencijacionim svojstvima**

Ovaj zaključak zasnovan je na rezultatima:

- Sve uspostavljene ćelijske linije poseduju kapacitet za samo-obnavljanje, potencijal za diferencijaciju i ispoljavaju markere karakteristične za MSC.
- DF-MSK imaju nešto veći prosečni prečnik i nešto veći kapacitet za samo-obnavljanje, u poređenju sa DP-MSK, što je u korelaciji sa većim udelom ćelija koje ispoljavaju CD90, i nešto većom ekspresijom CD105 i CD166 u populaciji DF-MSK.
- DP-MSK imaju izraženiji potencijal za diferencijaciju u osteoblaste i hondrocite što korelira se većom zastupljenošću CD56<sup>+</sup> i CD146<sup>+</sup> ćelija u ovoj populaciji MSC, u poređenju sa DF-MSK koje poseduju izraženiji adipogeni potencijal.
- PL-MSK imaju slabiji kapacitet za samo-obnavljanje i manji procenat ćelija koje formiraju CFU-F, u poređenju sa DP-MSK i DF-MSK.
- PL-MSK poseduju veći potencijal za diferencijaciju u osteoblaste i hondrocite, u poređenju sa DP-MSK i DF-MSK.
- Veći procenat PL-MSK ispoljava CD44, molekul uključen u migraciju ćelija, u poređenju sa DP-MSK i DF-MSK, koje ispoljavaju manje CD44 molekula.
- Sva tri tipa MSC ispoljavaju STRO-1 intracelularno.
- Ekspresija CD146<sup>+</sup> i STRO-1<sup>+</sup> na PL-MSK korelira sa njihovom pretežno perivaskularnom lokalizacijom unutar periapexnih lezija.
- DP-MSK i DF-MSK ispoljavaju CD271 intracelularno, dok PL-MSK ne ispoljavaju ovaj molekul.



- DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK ne ispoljavaju markere karakteristične za APC, B limfocite, monocite i HSC.

## **2. DP-MSK, DF-MSK i PL-MSK ispoljavaju različit imunomodulatorni potencijal**

Ovaj zaključak zasniva se na sledećim rezultatima:

- DP-MSK i PL-MSK, za razliku od DF-MSK, ispoljavaju anti-proliferativni efekat na fitohemaglutininom stimulisane PBMC u ko-kulturi.
- Ovakav immunosupresivni efekat je povezan sa produkcijom TGF- $\beta$  i sa većom ekspresijom IDO-1 od strane DP-MSK, u poređenju sa DF-MSK.
- PL-MSK deluju supresivno i na produkciju IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-5 i stimulišu produkciju TGF- $\beta$  u ko-kokulturi sa fitohemaglutininom stimulisanim PBMC.
- PL-MSK posredstvom solubilnih molekula smanjuju produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 od strane PL-IC u ko-kulturi, dok je za inhibiciju produkcije IL-8 neophodan direktan ćelijski kontakt.

## **3. Imunomodulatorna svojstva DP-MSK i DF-MSK su podložna delovanju TLR agonista**

- Sva tri tipa izolovanih, ispitivanih MSC ispoljavaju TLR3 i TLR4.
- DF-MSK i DP-MSK nakon tretmana sa poly(I:C) (agonistom TLR3) tokom 24h, povećavaju produkciju TGF- $\beta$  što je u korelaciji sa snažnijim anti-proliferativnim efekatom ovih ćelija na fitohemaglutininom stimulisane PBMC u ko-kulturi
- Tretman sa poly(I:C) ne utiče na ekspresiju IDO-1 kod DP-MSK i DF-MSK
- Tretman sa LPS-om (agonistom TLR4) podstiče produkciju TGF- $\beta$  i immunosupresivne funkcije DF-MSK

- Gubitak imunosupresivnog efekta DP-MSC nakon tretmana sa LPS-om je u korelaciji sa smanjnom produkcijom TGF- $\beta$  i nižom ekspresijom IDO-1 u ovim ćelijama.
- Tretman TLR3- ili TLR4-agonistom stimuliše produkciju IL-6 od strane DP-MSC i DF-MSC

#### 4. PL-MSC ispoljavaju imunomodulatorna svojstva delovanjem na dendritske ćelije

Ovaj zaključak zasniva se na sledećim rezultatima:

- Nezrele (CD209<sup>+</sup>) DC i zrele (CD83<sup>+</sup>) DC pretežno ko-lokalizuju sa perivaskularnim (STRO-1<sup>+</sup> i CD146<sup>+</sup>) MSC u periapeksnoj leziji.
- PL-MSC inhibiraju proces diferencijacije DC iz monocita periferne krvi *in vitro*, i to posredstvom solubilnih molekula koje ove MSC proizvode.
- DC diferencijovane u prisustvu PL-MSC stiču fenotip i alostimulatornu sposobnost zrelih DC posle tretmana sa pro-inflamacijskim medijatorima, ali indukuju jači Th2/Th17 odgovor u ko-kulturi sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima, u poređenju sa kontrolnim zrelim DC.
- DC izložene uticaju PL-MSC samo tokom faze sazrevanja ispoljavaju fenotip karakterističan za zrele DC, ali proizvode viši nivo IL-27 i IL-23 i niži nivo IL-12, ispoljavaju snažniju alostimulatornu sposobnost i indukuju značajno jači Th1 odgovor, u poređenju sa kontrolnim zrelim DC.
- DC ko-kultivisane sa PL-MSC i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja, iako ispoljavaju fenotipske markere karakteristične za zrele DC, poseduju značajno slabiju alostimulatornu sposobnost, u odnosu na kontrolne zrele DC, i stimulišu Th2 odgovor..
- DC ko-kultivisane sa PL-MSC i tokom faze diferencijacije i tokom faze sazrevanja indukuju anergiju CD4<sup>+</sup> T limfocita u ko-kulturi što je povezano sa ekspresijom ILT3, ILT4 i IDO-1 i indukcijom diferencijacije funkcionalnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD39<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> regulatornih T ćelija.

## 6. Literatura

1. Meregalli, M., A. Farini, and Y. Torrente, *Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases*. Stem Cells in Clinic and Research, 2011: p. 437-468.
2. Mountford, J.C., *Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy*. Transfus Med, 2008. **18**(1): p. 1-12.
3. Brook, F.A. and R.L. Gardner, *The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5709-12.
4. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
5. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
6. Morrison, S.J., et al., *The aging of hematopoietic stem cells*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1011-6.
7. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2319-45.
8. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 2000. **100**(1): p. 143-55.
9. Dickens, B.M. and R.J. Cook, *Acquiring human embryos for stem-cell research*. Int J Gynaecol Obstet, 2007. **96**(1): p. 67-71.
10. Thomson, J.A., *Primate embryonic stem cells*. 1998, Google Patents.
11. Stocum, D.L., *Stem cells in regenerative biology and medicine*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(6): p. 429-42.
12. Mummery, C., et al., *Stem cells: scientific facts and fiction*. 2010: Academic Press.
13. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
14. Blum, B. and N. Benvenisty, *The tumorigenicity of human embryonic stem cells*. Advances in cancer research, 2008. **100**: p. 133-158.
15. Liao, L.M., Q. Han, and C.H. Zhao, *[Application of mesenchymal stem cell in immunotherapy--review]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2005. **13**(1): p. 158-63.
16. Sloan, A.J. and R.J. Waddington, *Dental pulp stem cells: what, where, how?* Int J Paediatr Dent, 2009. **19**(1): p. 61-70.
17. Tavassoli, M. and W.H. Crosby, *Transplantation of marrow to extramedullary sites*. Science, 1968. **161**(3836): p. 54-56.
18. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
19. Fridenshtein, A., *Osteogenic stem cells of the bone marrow*. Ontogenez, 1991. **22**(2): p. 189.
20. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood cells, 1977. **4**(1-2): p. 7-25.
21. Dexter, T.M. and E. Spooner, *Growth and differentiation in the hemopoietic system*. Annual review of cell biology, 1987. **3**(1): p. 423-441.
22. Allen, T. *Haemopoietic microenvironment in vitro: Ultrastructural aspects*. in *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation.* CIBA Foundation Symposium. 1981.

23. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
24. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
25. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. British journal of haematology, 2000. **109**(1): p. 235-242.
26. Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine*. J Dent Res, 2009. **88**(9): p. 792-806.
27. Gronthos, S., et al., *Surface protein characterization of human adipose tissue - derived stromal cells*. Journal of cellular physiology, 2001. **189**(1): p. 54-63.
28. Riekstina, U., et al., *Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions*. Cytotechnology, 2008. **58**(3): p. 153-162.
29. Jackson, W.M., L.J. Nesti, and R.S. Tuan, *Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells*. Expert opinion on biological therapy, 2010. **10**(4): p. 505-517.
30. Najimi, M., et al., *Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes?* Cell transplantation, 2007. **16**(7): p. 717-728.
31. Fan, J., et al., *Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(1): p. 75-86.
32. Baertschiger, R.M., et al., *Mesenchymal stem cells derived from human exocrine pancreas express transcription factors implicated in beta-cell development*. Pancreas, 2008. **37**(1): p. 75-84.
33. Jarvinen, L., et al., *Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4389-96.
34. In 't Anker, P.S., et al., *Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1548-9.
35. Li, C.D., et al., *Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation*. Cell Res, 2005. **15**(7): p. 539-47.
36. Chong, P.P., et al., *Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2012. **30**(4): p. 634-42.
37. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
38. Baksh, D., J.E. Davies, and P.W. Zandstra, *Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion*. Experimental hematology, 2003. **31**(8): p. 723-732.
39. Spiropoulos, A., et al., *Rapid clinical-scale propagation of mesenchymal stem cells using cultures initiated with immunoselected bone marrow CD105+ cells*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(9): p. 1983-8.
40. Jin, H.J., et al., *Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 676-81.
41. Barry, F., et al., *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 519-24.

42. Eckle, T., et al., *Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8127-37.
43. Ode, A., et al., *CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells*. Eur Cell Mater, 2011. **22**: p. 26-42.
44. Williams, A.F. and J. Gagnon, *Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin*. Science, 1982. **216**(4547): p. 696-703.
45. Haeryfar, S.M. and D.W. Hoskin, *Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3581-8.
46. Saalbach, A., U.F. Haustein, and U. Anderegg, *A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(5): p. 882-8.
47. He, H.T., et al., *Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca2(+)-independent mechanism*. J Exp Med, 1991. **173**(2): p. 515-8.
48. Craig, W., et al., *Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells*. J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1331-42.
49. Jones, E., et al., *Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1944-54.
50. Jones, E.A., et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 817-27.
51. Ishii, M., et al., *Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 297-303.
52. Chan, N.L., et al., *Umbilical vein and placental vessels from newborns with hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1 genotype are normal despite reduced expression of endoglin*. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 208-17.
53. Narravula, S., et al., *Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5262-8.
54. Rojewski, M., B. Weber, and H. Schrezenmeier, *Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues*. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2008. **35**(3): p. 168-184.
55. Riekstina, U., et al., *Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis*. Stem Cell Rev, 2009. **5**(4): p. 378-86.
56. Pierantozzi, E., et al., *Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(5): p. 915-23.
57. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): p. 204.
58. Saraswati, S., D. Bastakoty, and P.P. Young, *Molecular and Signaling Pathways That Modulate Mesenchymal Stem Cell Self-renewal*, in *Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 6*. 2012, Springer. p. 131-141.
59. Knoblich, J.A., *Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(12): p. 849-860.

60. Morin, X. and Y. Bellaïche, *Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development*. *Developmental cell*, 2011. **21**(1): p. 102-119.
61. Phinney, D.G., *Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(9): p. 2806-12.
62. Méndez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
63. Friedenstein, A. and A.I. Kuralesova, *Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras*. *Transplantation*, 1971. **12**(2): p. 99-108.
64. Schwartz, J., et al., *Paracrine interactions within the pituitary gland*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **839**: p. 239-43.
65. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(8): p. 896-904.
66. Metcalf, D., *The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor*. *Stem Cells*, 2003. **21**(1): p. 5-14.
67. Tsutsumi, S., et al., *Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(2): p. 413-9.
68. Marie, P.J., J.D. Coffin, and M.M. Hurley, *FGF and FGFR signaling in chondrodysplasias and craniosynostosis*. *J Cell Biochem*, 2005. **96**(5): p. 888-96.
69. Salazar, K.D., S.M. Lankford, and A.R. Brody, *Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(5): p. L1002-11.
70. Boland, G.M., et al., *Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells*. *J Cell Biochem*, 2004. **93**(6): p. 1210-30.
71. Digirolamo, C.M., et al., *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*. *Br J Haematol*, 1999. **107**(2): p. 275-81.
72. Banfi, A., et al., *Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(6): p. 901-10.
73. Baxter, M.A., et al., *Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion*. *Stem Cells*, 2004. **22**(5): p. 675-82.
74. Woodbury, D., K. Reynolds, and I.B. Black, *Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis*. *Journal of neuroscience research*, 2002. **69**(6): p. 908-917.
75. Woodbury, D., et al., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. *Journal of neuroscience research*, 2000. **61**(4): p. 364-370.
76. Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(19): p. 10711-10716.
77. Eglitis, M.A. and É. Mezey, *Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(8): p. 4080-4085.
78. Petersen, B., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1168-1170.

79. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-705.
80. Wakitani, S., T. Saito, and A.I. Caplan, *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5 - azacytidine*. Muscle & nerve, 1995. **18**(12): p. 1417-1426.
81. Bang, O.Y., et al., *Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients*. Annals of neurology, 2005. **57**(6): p. 874-882.
82. Chen, S.-l., et al., *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction*. The American journal of cardiology, 2004. **94**(1): p. 92-95.
83. Park, J.H., et al., *Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans*. Neurosurgery, 2012. **70**(5): p. 1238-47; discussion 1247.
84. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. Journal of cell science, 2000. **113**(7): p. 1161-1166.
85. Okamoto, T., et al., *Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **295**(2): p. 354-361.
86. Russell, K.C., et al., *In Vitro High - Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment*. Stem Cells, 2010. **28**(4): p. 788-798.
87. Banfi, A., et al., *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy*. Experimental hematology, 2000. **28**(6): p. 707-715.
88. Russell, K.C., et al., *Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency*. Biotechnology and bioengineering, 2011. **108**(11): p. 2716-2726.
89. Sengers, B.G., J.I. Dawson, and R.O. Oreffo, *Characterisation of human bone marrow stromal cell heterogeneity for skeletal regeneration strategies using a two-stage colony assay and computational modelling*. Bone, 2010. **46**(2): p. 496-503.
90. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 726-736.
91. Freyria, A.M., S. Courtes, and F. Mallein-Gerin, *[Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]*. Pathol Biol (Paris), 2008. **56**(5): p. 326-33.
92. Barrilleaux, B., et al., *Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(11): p. 3007-19.
93. Studer, D., et al., *Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells*. Eur Cell Mater, 2012. **24**: p. 118-35; discussion 135.
94. Solchaga, L.A., et al., *FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2005. **203**(2): p. 398-409.
95. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2521-9.

96. Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
97. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
98. Schmitt, B., et al., *BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture*. Differentiation, 2003. **71**(9): p. 567-577.
99. Miljkovic, N., G. Cooper, and K. Marra, *Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells*. Osteoarthritis and Cartilage, 2008. **16**(10): p. 1121-1130.
100. Boskey, A.L., et al., *BMP-6 accelerates both chondrogenesis and mineral maturation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures*. J Cell Biochem, 2002. **84**(3): p. 509-19.
101. Gooch, K.J., et al., *Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage*. Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 591-601.
102. Nochi, H., et al., *Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(1): p. 111-22.
103. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(1): p. 32-45.
104. Kelc, R., et al., *Novel Therapies for the Management of Sports Injuries*. 2013.
105. Goumans, M.J. and C. Mummery, *Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice*. Int J Dev Biol, 2000. **44**(3): p. 253-65.
106. Torreggiani, E., et al., *Role of Slug transcription factor in human mesenchymal stem cells*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(4): p. 740-51.
107. Leung, V.Y., et al., *SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression*. PLoS Genet, 2011. **7**(11): p. e1002356.
108. Itoh, S., et al., *Trps1 plays a pivotal role downstream of Gdf5 signaling in promoting chondrogenesis and apoptosis of ATDC5 cells*. Genes Cells, 2008. **13**(4): p. 355-63.
109. Yang, K.G., et al., *Impact of expansion and redifferentiation conditions on chondrogenic capacity of cultured chondrocytes*. Tissue Eng, 2006. **12**(9): p. 2435-47.
110. Hartmann, C., *A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(3): p. 151-8.
111. Enomoto-Iwamoto, M., et al., *The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis*. Developmental biology, 2002. **251**(1): p. 142-156.
112. Tuli, R., et al., *Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41227-36.
113. Felka, T., et al., *Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2010. **12**(2): p. 143-53.
114. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, *The cell*. 2000: ASM press Washington.
115. Auletta, J.J., et al., *Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Expansion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells without Diminishing Their Immunosuppressive Potential*. Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 235176.



116. Cournil-Henrionnet, C., et al., *Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion*. *Biorheology*, 2008. **45**(3-4): p. 513-26.
117. Gardner, O.F., et al., *Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering*. *Histol Histopathol*, 2013. **28**(1): p. 23-42.
118. Adesida, A.B., A. Mulet-Sierra, and N.M. Jomha, *Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2012. **3**(2): p. 9.
119. Grigolo, B., et al., *Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits*. *Biomaterials*, 2001. **22**(17): p. 2417-24.
120. Williams, R., et al., *Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage*. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13246.
121. Xiao, G., et al., *Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells*. *J Bone Miner Res*, 2002. **17**(1): p. 101-10.
122. Dennis, J.E. and A.I. Caplan, *Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H - 2Kb - tsA58 transgenic mouse*. *Journal of cellular physiology*, 1996. **167**(3): p. 523-538.
123. Deng, Z.L., et al., *Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2001-21.
124. Friedman, M.S., M.W. Long, and K.D. Hankenson, *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6*. *J Cell Biochem*, 2006. **98**(3): p. 538-54.
125. Jeon, E.J., et al., *Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(24): p. 16502-11.
126. Miller, J., et al., *The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation*. *Nat Genet*, 2002. **32**(4): p. 645-9.
127. Kundu, M., et al., *Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development*. *Nat Genet*, 2002. **32**(4): p. 639-44.
128. Yoshida, C.A., et al., *Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development*. *Nat Genet*, 2002. **32**(4): p. 633-8.
129. Westendorf, J.J. and S.W. Hiebert, *Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia*. *J Cell Biochem*, 1999. **Suppl 32-33**: p. 51-8.
130. Kahler, R.A. and J.J. Westendorf, *Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 11937-44.
131. Otto, F., M. Lubbert, and M. Stock, *Upstream and downstream targets of RUNX proteins*. *J Cell Biochem*, 2003. **89**(1): p. 9-18.
132. Newberry, E.P., et al., *Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(8): p. 1129-44.
133. Shimizu-Sasaki, E., et al., *Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(8): p. 5459-66.
134. Harada, H., et al., *Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(11): p. 6972-8.

135. Kern, B., et al., *Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7101-7.
136. Selvamurugan, N., et al., *Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10647-57.
137. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
138. Kirkham, G., et al., *Genes and Proteins involved in the regulation of Osteogenesis*. Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E, editores. Topics in Tissue Engineering, 2007. **3**.
139. Shui, C., et al., *Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(2): p. 213-21.
140. Xiao, G., et al., *Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32988-94.
141. Karsenty, G., *Bone formation and factors affecting this process*. Matrix Biol, 2000. **19**(2): p. 85-9.
142. Ducy, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 448-52.
143. Qi, H., et al., *Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3305-10.
144. Lian, J.B. and G.S. Stein, *Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(32): p. 2677-85.
145. Rubin, J., et al., *IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4273-9.
146. Gaspar, C. and R. Fodde, *APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 377-86.
147. Gaur, T., et al., *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33132-40.
148. Dennis, J.E. and P. Charbord, *Origin and differentiation of human and murine stroma*. Stem Cells, 2002. **20**(3): p. 205-214.
149. Dennis, J.E., et al., *A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(5): p. 700-709.
150. Ross, S.E., et al., *Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling*. Science, 2000. **289**(5481): p. 950-953.
151. Tong, Q., et al., *Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition*. Science, 2000. **290**(5489): p. 134-138.
152. Symonds, M.E., *Adipose tissue biology*. 2012: Springer.
153. Nuttall, M.E. and J.M. Gimble, *Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(3): p. 290-4.
154. Hong, J.H., et al., *TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation*. Science, 2005. **309**(5737): p. 1074-8.
155. Jakkaraju, S., et al., *TIPs are tension-responsive proteins involved in myogenic versus adipogenic differentiation*. Dev Cell, 2005. **9**(1): p. 39-49.

156. McBeath, R., et al., *Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 483-95.
157. Duailibi, S.E., et al., *Prospects for tooth regeneration*. Periodontology 2000, 2006. **41**(1): p. 177-187.
158. Mitsiadis, T.A., et al., *Development of teeth in chick embryos after mouse neural crest transplantations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(11): p. 6541-6545.
159. Kratochwil, K., et al., *Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development*. Genes & development, 1996. **10**(11): p. 1382-1394.
160. Vainio, S., et al., *Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development*. Cell, 1993. **75**(1): p. 45-58.
161. Nadiri, A., et al., *Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2004. **52**(1): p. 103-112.
162. Bei, M. and R. Maas, *FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development*. Development, 1998. **125**(21): p. 4325-4333.
163. Kettunen, P., et al., *Associations of FGF - 3 and FGF - 10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis*. Developmental Dynamics, 2000. **219**(3): p. 322-332.
164. Dassule, H.R. and A.P. McMahon, *Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth*. Developmental biology, 1998. **202**(2): p. 215-227.
165. Sire, J.-Y., et al., *The origin and evolution of enamel mineralization genes*. Cells Tissues Organs, 2007. **186**(1): p. 25-48.
166. Bluteau, G., et al., *Stem cells for tooth engineering*. Eur Cell Mater, 2008. **16**: p. 1-9.
167. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
168. Iohara, K., et al., *Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2493-503.
169. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5807-12.
170. Seo, B.M., et al., *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament*. Lancet, 2004. **364**(9429): p. 149-55.
171. Huang, G.T.-J., K. Shagrananova, and S.W. Chan, *Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro*. Journal of endodontics, 2006. **32**(11): p. 1066-1073.
172. Gronthos, S., et al., *Stem cell properties of human dental pulp stem cells*. Journal of dental research, 2002. **81**(8): p. 531-535.
173. d'Aquino, R., et al., *Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation*. Cell Death & Differentiation, 2007. **14**(6): p. 1162-1171.
174. Laino, G., et al., *In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp*. Journal of Craniofacial Surgery, 2006. **17**(3): p. 511-515.

175. Zhang, W., et al., *Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation*. Tissue engineering, 2006. **12**(10): p. 2813-2823.
176. Batouli, S., et al., *Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis*. Journal of dental research, 2003. **82**(12): p. 976-981.
177. Carinci, F., et al., *Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells*. Journal of Craniofacial Surgery, 2008. **19**(3): p. 616-625.
178. Kerkis, I., et al., *Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers*. Cells Tissues Organs, 2007. **184**(3-4): p. 105-116.
179. Seo, B., et al., *SHED repair critical - size calvarial defects in mice*. Oral diseases, 2008. **14**(5): p. 428-434.
180. Zhang, Q., et al., *Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7787-98.
181. Sonoyama, W., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine*. PLoS One, 2006. **1**: p. e79.
182. Morsczeck, C., et al., *Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth*. Matrix Biol, 2005. **24**(2): p. 155-65.
183. McCulloch, C.A. and S. Bordin, *Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 1): p. 144-54.
184. Bordin, S., R.C. Page, and A.S. Narayanan, *Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype*. Science, 1984. **223**(4632): p. 171-3.
185. Somerman, M., et al., *Evolution of periodontal regeneration: from the roots' point of view*. Journal of periodontal research, 1999. **34**(7): p. 420-442.
186. Pitaru, S., et al., *Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones*. Connective tissue research, 2002. **43**(2-3): p. 257-264.
187. Kubo, K., et al., *Characterization of nodules induced by bioactive glass on cultured periodontal - ligament fibroblasts*. Journal of biomedical materials research, 1995. **29**(4): p. 503-509.
188. D'errico, J., et al., *Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture*. Bone, 1999. **25**(1): p. 39-47.
189. Trubiani, O., et al., *Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament*. International journal of immunopathology and pharmacology, 2005. **18**(2): p. 213.
190. Nagatomo, K., et al., *Stem cell properties of human periodontal ligament cells*. Journal of periodontal research, 2006. **41**(4): p. 303-310.
191. Wada, N., et al., *Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells*. Journal of cellular physiology, 2009. **219**(3): p. 667-676.
192. Trubiani, O., et al., *Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT - 4, SSEA - 1, SSEA - 4, and frizzled - 9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells*. Journal of cellular physiology, 2010. **225**(1): p. 123-131.

193. Sonoyama, W., et al., *Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study*. Journal of endodontics, 2008. **34**(2): p. 166-171.
194. Abe, S., S. Yamaguchi, and T. Amagasa, *Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex*. Oral Science International, 2007. **4**(1): p. 45-58.
195. Huang, G.T.-J., et al., *The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering*. Journal of endodontics, 2008. **34**(6): p. 645-651.
196. Kémoun, P., et al., *Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro*. Cell and tissue research, 2007. **329**(2): p. 283-294.
197. Morsczeck, C., et al., *Gene expression of nestin, collagen type I and type III in human dental follicle cells after cultivation in serum-free medium*. Oral Maxillofac Surg, 2008. **12**(2): p. 89-92.
198. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
199. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
200. Beutler, B., *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 257-63.
201. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
202. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
203. Bell, J.K., et al., *Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors*. Trends Immunol, 2003. **24**(10): p. 528-33.
204. Ulevitch, R.J., *Therapeutics targeting the innate immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 512-20.
205. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
206. Matsui, K., et al., *Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5785-9.
207. Honda, K., T. Mizutani, and T. Taniguchi, *Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2416-21.
208. Kawai, T., et al., *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1061-8.
209. Hemmi, H., et al., *The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3059-64.
210. Hoebe, K., et al., *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 743-8.
211. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
212. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.

213. Sasai, M., et al., *Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 27-30.
214. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 204-7.
215. Oganessian, G., et al., *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 208-11.
216. Sarkar, S.N., et al., *Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1060-7.
217. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
218. Hasan, U.A., G. Trinchieri, and J. Vlach, *Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20620-7.
219. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nature immunology, 2004. **5**(7): p. 730-737.
220. Kanneganti, T.-D., M. Lamkanfi, and G. Núñez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 549-559.
221. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 2851-2858.
222. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nature immunology, 2003. **4**(7): p. 702-707.
223. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-1587.
224. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(11): p. 8869-8872.
225. Kim, H.S., et al., *Implication of NOD1 and NOD2 for the differentiation of multipotent mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e15369.
226. van den Berk, L.C., et al., *Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3415-26.
227. Raicevic, G., et al., *The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties*. Cell Immunol, 2011. **270**(2): p. 207-16.
228. Hwa Cho, H., Y.C. Bae, and J.S. Jung, *Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2744-52.
229. Pevsner-Fischer, M., et al., *Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1422-32.
230. Liotta, F., et al., *Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 279-89.
231. Opitz, C.A., et al., *Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R*. Stem Cells, 2009. **27**(4): p. 909-19.
232. Tomchuck, S.L., et al., *Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 99-107.

233. Wang, J., et al., *Toll - like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring*. Journal of cellular physiology, 2011. **226**(5): p. 1265-1273.
234. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(11): p. 5721-5732.
235. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(12): p. 3770-3783.
236. Raicevic, G., et al., *Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells*. Hum Immunol, 2010. **71**(3): p. 235-44.
237. Lombardo, E., et al., *Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(7): p. 1579-89.
238. Mo, I.F., et al., *Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 52.
239. Yu, S., et al., *Role of MyD88 in TLR agonist-induced functional alterations of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 143-50.
240. Cho, H.H., et al., *NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 168-77.
241. Tsan, M.F., et al., *Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(6): p. C1422-30.
242. Nurmenniemi, S., et al., *Toll-like receptor 9 ligands enhance mesenchymal stem cell invasion and expression of matrix metalloprotease-13*. Exp Cell Res, 2010. **316**(16): p. 2676-82.
243. Waterman, R.S., et al., *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10088.
244. Romieu-Mourez, R., et al., *Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7963-73.
245. Page, R.C. and H.E. Schroeder, *Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1976. **34**(3): p. 235-249.
246. Mandell, L., et al., *Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4*. Infection and immunity, 2004. **72**(11): p. 6446-6454.
247. Kikkert, R., et al., *Activation of toll - like receptors 2 and 4 by gram - negative periodontal bacteria*. Oral microbiology and immunology, 2007. **22**(3): p. 145-151.
248. Sugawara, Y., et al., *Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells*. Journal of dental research, 2006. **85**(6): p. 524-529.
249. Ren, L., et al., *The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis*. Journal of periodontology, 2005. **76**(11): p. 1950-1959.

250. Handal, T., et al., *Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth*. Journal of oral microbiology, 2009. **1**.
251. Eriksen, H.M., L.-L. Kirkevang, and K. Petersson, *Endodontic epidemiology and treatment outcome: general considerations*. Endodontic Topics, 2002. **2**(1): p. 1-9.
252. Burns, E., et al., *Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to Porphyromonas gingivalis: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(12): p. 8296-8300.
253. Hajishengallis, G., et al., *Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis with the Toll - like receptor 2 - centred pattern recognition apparatus*. Cellular microbiology, 2006. **8**(10): p. 1557-1570.
254. Pulendran, B., et al., *Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(9): p. 5067-5076.
255. Yoshimura, A., et al., *Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria Porphyromonas gingivalis and Capnocytophaga ochracea are antagonists for human toll-like receptor 4*. Infection and immunity, 2002. **70**(1): p. 218-225.
256. Gemmell, E., K. Yamazaki, and G. Seymour, *Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response*. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 2002. **13**(1): p. 17-34.
257. Johnson, R. and F. Serio, *Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease*. Journal of periodontology, 2005. **76**(5): p. 785-790.
258. Salvi, G., et al., *Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis*. Journal of periodontal research, 1998. **33**(3): p. 212-225.
259. Ebersole, J.L. and M.A. Taubman, *The protective nature of host responses in periodontal diseases*. Periodontology 2000, 1994. **5**(1): p. 112-141.
260. Stashenko, P., et al., *Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by Porphyromonas gingivalis*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 203-13.
261. Manhart, S.S., et al., *Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis*. Journal of periodontology, 1994. **65**(9): p. 807-813.
262. Aoyagi, T., et al., *Interleukin 4 (IL - 4) and IL - 6 - producing memory T - cells in peripheral blood and gingival tissues in periodontitis patients with high serum antibody titers to Porphyromonas gingivalis*. Oral microbiology and immunology, 1995. **10**(5): p. 304-310.
263. Tokoro, Y., et al., *Relevance of local Th2 - type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases*. Clinical & Experimental Immunology, 1997. **107**(1): p. 166-174.
264. Sigusch, B., et al., *Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes*. Journal of periodontology, 1998. **69**(10): p. 1098-1104.
265. Lappin, D., et al., *Anti - inflammatory cytokine IL - 10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue*. Clinical & Experimental Immunology, 2001. **123**(2): p. 294-300.
266. Bártoová, J., et al., *Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings*. Mediators of inflammation, 2000. **9**(2): p. 115-120.
267. Garlet, G., et al., *Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors*. Oral microbiology and immunology, 2006. **21**(1): p. 12-20.



268. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
269. Yu, J.J., et al., *The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against Porphyromonas gingivalis-induced periodontal bone loss*. Infect Immun, 2008. **76**(9): p. 4206-13.
270. Čolić, M., et al., *Interleukin - 17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions*. European Journal of Oral Sciences, 2007. **115**(4): p. 315-320.
271. Lexberg, M.H., et al., *Th memory for interleukin - 17 expression is stable in vivo*. European journal of immunology, 2008. **38**(10): p. 2654-2664.
272. Nakajima, T., et al., *Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues*. Journal of dental research, 2005. **84**(7): p. 639-643.
273. Ernst, C., et al., *Diminished forkhead box P3/CD25 double - positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor - kB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease*. Clinical & Experimental Immunology, 2007. **148**(2): p. 271-280.
274. Cardoso, C.R., et al., *Characterization of CD4+ CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis*. Journal of leukocyte biology, 2008. **84**(1): p. 311-318.
275. Colic, M., et al., *Regulatory T-cells in periapical lesions*. J Dent Res, 2009. **88**(11): p. 997-1002.
276. Guilliams, M., et al., *Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis*. J Infect Dis, 2008. **198**(5): p. 781-91.
277. Alongi, D.J., et al., *Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential*. Regen Med, 2010. **5**(4): p. 617-31.
278. Maeda, H., et al., *Human periapical granulation tissue contains osteogenic cells*. Cell Tissue Res, 2004. **315**(2): p. 203-8.
279. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. Exp Hematol, 2002. **30**(1): p. 42-8.
280. Griffin, M.D., T. Ritter, and B.P. Mahon, *Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies*. Human gene therapy, 2010. **21**(12): p. 1641-1655.
281. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow - derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL - 1  $\alpha$* . Journal of cellular physiology, 1996. **166**(3): p. 585-592.
282. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **98**(5): p. 1076-1084.
283. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.
284. Caplan, A., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. The Journal of pathology, 2009. **217**(2): p. 318-324.
285. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-313.
286. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. **131**(2): p. 324-36.

287. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. *Lancet*, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
288. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(2): p. 141-50.
289. Sun, L., et al., *Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans*. *Stem Cells*, 2009. **27**(6): p. 1421-32.
290. Inoue, S., et al., *Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model*. *Transplantation*, 2006. **81**(11): p. 1589-95.
291. Sudres, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice*. *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7761-7.
292. Krampera, M., et al., *Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(2): p. 386-98.
293. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. *Blood*, 2004. **103**(12): p. 4619-21.
294. Mougiakakos, D., et al., *The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells*. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4826-35.
295. Sheng, H., et al., *A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1*. *Cell Res*, 2008. **18**(8): p. 846-57.
296. Xu, G., et al., *Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells*. *Cell Res*, 2007. **17**(3): p. 240-8.
297. Ren, G., et al., *Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression*. *Stem Cells*, 2009. **27**(8): p. 1954-62.
298. Nauta, A.J., et al., *Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting*. *Blood*, 2006. **108**(6): p. 2114-20.
299. Chan, J.L., et al., *Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma*. *Blood*, 2006. **107**(12): p. 4817-24.
300. Romieu-Mourez, R., et al., *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*, 2007. **179**(3): p. 1549-58.
301. Tang, K.C., et al., *Down-regulation of MHC II in mesenchymal stem cells at high IFN-gamma can be partly explained by cytoplasmic retention of CIITA*. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1826-33.
302. Heng, T.S., et al., *Stem cells—meet immunity*. *Journal of molecular medicine*, 2009. **87**(11): p. 1061-1069.
303. Kahan, B.D., *Individuality: the barrier to optimal immunosuppression*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(10): p. 831-838.
304. Tu, Z., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H*. *Stem cells and development*, 2010. **19**(11): p. 1803-1809.
305. Komoda, H., et al., *Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **16**(4): p. 1143-1155.

306. Schraufstatter, I.U., et al., *C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(6): p. 3827-3836.
307. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(11): p. 850-861.
308. Sotiropoulou, P.A., et al., *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells*. Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 74-85.
309. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells*. Transplantation, 2003. **76**(8): p. 1208-13.
310. Maccario, R., et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype*. haematologica, 2005. **90**(4): p. 516-525.
311. Le Blanc, K., *Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells*. Cytotherapy, 2003. **5**(6): p. 485-9.
312. Spaggiari, G.M., et al., *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1484-90.
313. Hespel, C. and M. Moser, *Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity*. European journal of immunology, 2012. **42**(10): p. 2535-2543.
314. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
315. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells as sensors of infection*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 495-8.
316. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
317. Inaba, K., et al., *The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli*. J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 927-36.
318. Scandella, E., et al., *CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1595-601.
319. Sallusto, F., et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
320. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends in immunology, 2002. **23**(9): p. 445-449.
321. de Jong, E.C., H.H. Smits, and M.L. Kapsenberg, *Dendritic cell-mediated T cell polarization*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 289-307.
322. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, *Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 163-70.
323. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
324. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
325. Reis e Sousa, C., *Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 21-5.

326. Matzinger, P., *Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?* Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 11-3.
327. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers.* Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 506-8.
328. Ma, X. and G. Trinchieri, *Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells.* Adv Immunol, 2001. **79**: p. 55-92.
329. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.* Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
330. Djuretic, I.M., et al., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells.* Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
331. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon.* Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 1957. **147**(927): p. 258-267.
332. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, *Viruses and interferon: a fight for supremacy.* Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(9): p. 675-687.
333. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons.* Annual review of biochemistry, 1998. **67**(1): p. 227-264.
334. Decker, T., M. Müller, and S. Stockinger, *The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection.* Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(9): p. 675-687.
335. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
336. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell.* Nature, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
337. Bennett, S.R., et al., *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.* Nature, 1998. **393**(6684): p. 478-80.
338. Chuvpilo, S., et al., *Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter.* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(24): p. 5694-704.
339. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao, *Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun.* EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4783-95.
340. Ouyang, W., et al., *Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment.* Immunity, 2000. **12**(1): p. 27-37.
341. Lee, H.J., et al., *Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: a role for a GATA-binding protein.* J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2343-52.
342. Zheng, W.-p. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.* Cell, 1997. **89**(4): p. 587-596.
343. Zhang, D.-H., et al., *Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(34): p. 21597-21603.
344. Leon, B., et al., *Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells.* Nat Immunol, 2012. **13**(7): p. 681-90.
345. Gao, Y., et al., *Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells.* Immunity, 2013. **39**(4): p. 722-32.
346. Yoshimoto, T., et al., *Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells.* Nature immunology, 2009. **10**(7): p. 706-712.

347. Usui, T., et al., *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(3): p. 755-766.
348. Evans, R.L., et al., *Detection, isolation, and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens*. J Exp Med, 1977. **145**(1): p. 221-33.
349. Hunter, C.A., *New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 521-31.
350. Dong, C., *IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations*. J Immunotoxicol, 2008. **5**(1): p. 43-6.
351. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, *Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 221-42.
352. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
353. Matsuzaki, G. and M. Umemura, *Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections*. Microbiol Immunol, 2007. **51**(12): p. 1139-47.
354. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
355. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
356. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.
357. Pflanz, S., et al., *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 779-90.
358. Fitzgerald, D.C., et al., *Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells*. Nature immunology, 2007. **8**(12): p. 1372-1379.
359. Awasthi, A., et al., *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells*. Nature immunology, 2007. **8**(12): p. 1380-1389.
360. Stumhofer, J.S., et al., *Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10*. Nature immunology, 2007. **8**(12): p. 1363-1371.
361. Hubbell, J.A., S.N. Thomas, and M.A. Swartz, *Materials engineering for immunomodulation*. Nature, 2009. **462**(7272): p. 449-460.
362. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
363. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 841-55.
364. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
365. Eisenstein, E.M. and C.B. Williams, *The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity*. Pediatric research, 2009. **65**: p. 26R-31R.
366. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.

367. Khoo, U.Y., I.E. Proctor, and A.J. Macpherson, *CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3626-34.
368. Potian, J.A., et al., *Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(7): p. 3426-3434.
369. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. TRANSPLANTATION-BALTIMORE-, 2003. **75**(3): p. 389-397.
370. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex*. Scandinavian journal of immunology, 2003. **57**(1): p. 11-20.
371. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
372. Krampera, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3722-3729.
373. Djouad, F., et al., *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3837-3844.
374. Sato, K., et al., *Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells*. Blood, 2007. **109**(1): p. 228-234.
375. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
376. Plumas, J., et al., *Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells*. Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1597-1604.
377. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin - 2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin - activated lymphocytes*. Scandinavian journal of immunology, 2004. **60**(3): p. 307-315.
378. Rasmusson, I., *Immune modulation by mesenchymal stem cells*. Experimental cell research, 2006. **312**(12): p. 2169-2179.
379. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms*. Experimental cell research, 2005. **305**(1): p. 33-41.
380. Matysiak, M., et al., *Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2*. Journal of neuroimmunology, 2011. **233**(1): p. 106-111.
381. Nasef, A., et al., *Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells*. Gene Expr, 2007. **13**(4-5): p. 217-26.
382. Patel, S.A., et al., *Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta*. The Journal of Immunology, 2010. **184**(10): p. 5885-5894.
383. Ghannam, S., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 302-12.
384. Nasef, A., et al., *Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression*. Cellular immunology, 2008. **253**(1): p. 16-22.

385. Najar, M., et al., *Adipose-Tissue-Derived and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells Suppress Lymphocyte Responses by Secreting Leukemia Inhibitory Factor*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(11): p. 3537-3546.
386. Brusko, T.M., et al., *An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(9): p. 5181-5186.
387. English, K., et al., *Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non - redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+ CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells*. Clinical & Experimental Immunology, 2009. **156**(1): p. 149-160.
388. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
389. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1755-1761.
390. Glennie, S., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2821-2827.
391. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
392. King, I.L. and B.M. Segal, *Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of T regulatory cells*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 641-5.
393. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.
394. Tisch, R., *Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation*. Int Rev Immunol, 2010. **29**(2): p. 111-8.
395. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
396. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 279-88.
397. Hintzen, G., et al., *Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7346-54.
398. Jang, M.H., et al., *CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 803-10.
399. Worbs, T., et al., *Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 519-27.
400. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(8): p. 610-621.
401. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
402. Langenkamp, A., et al., *T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 2046-54.
403. Cohen, N., et al., *GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2037-44.
404. Penna, G., et al., *Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3490-7.

405. Suci-Foca, N., J.S. Manavalan, and R. Cortesini, *Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells*. *Transpl Immunol*, 2003. **11**(3-4): p. 235-44.
406. Manavalan, J.S., et al., *High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells*. *Transpl Immunol*, 2003. **11**(3-4): p. 245-58.
407. Cella, M., et al., *A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing*. *J Exp Med*, 1997. **185**(10): p. 1743-51.
408. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
409. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 237-43.
410. Suci-Foca, N. and R. Cortesini, *Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade*. *Cell Immunol*, 2007. **248**(1): p. 59-67.
411. Jiang, X.X., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4120-6.
412. Nauta, A.J., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ derived and monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(4): p. 2080-7.
413. Li, Y.P., et al., *Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway*. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1598-608.
414. Djouad, F., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*. *Stem Cells*, 2007. **25**(8): p. 2025-32.
415. Park, S.J., et al., *IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3844-54.
416. Spaggiari, G.M., et al., *MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2*. *Blood*, 2009. **113**(26): p. 6576-83.
417. Colic, M., et al., *Production of IL - 10 and IL - 12 by antigen - presenting cells in periapical lesions*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2010. **39**(9): p. 690-696.
418. Colic, M., et al., *Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions*. *Mol Immunol*, 2009. **47**(1): p. 101-13.
419. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. *Nature Reviews Immunology*, 2004. **4**(10): p. 762-774.
420. Stone, T.W. and L.G. Darlington, *Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development*. *Nature reviews Drug discovery*, 2002. **1**(8): p. 609-620.
421. Munn, D.H., et al., *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase*. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 633-642.
422. Fallarino, F., et al., *T cell apoptosis by kynurenines*, in *Developments in tryptophan and serotonin metabolism*. 2003, Springer. p. 183-190.
423. Puccetti, P. and U. Grohmann, *IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF- $\kappa$ B activation*. *Nature Reviews Immunology*, 2007. **7**(10): p. 817-823.
424. Sharma, M.D., et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes*. *Blood*, 2009. **113**(24): p. 6102-6111.
425. Baban, B., et al., *IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(4): p. 2475-2483.
426. Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti, *Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO*. *Trends in immunology*, 2003. **24**(5): p. 242-248.



427. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nature immunology, 2003. **4**(12): p. 1206-1212.
428. Taylor, M.W. and G.S. Feng, *Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism*. FASEB J, 1991. **5**(11): p. 2516-22.
429. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nature immunology, 2002. **3**(11): p. 1097-1101.
430. Du, M.X., W.D. Sotero-Esteve, and M.W. Taylor, *Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(2): p. 133-42.
431. Romani, L. and P. Puccetti, *Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism*. Trends in microbiology, 2006. **14**(4): p. 183-189.
432. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-1870.
433. Curti, A., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2871-2877.
434. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor  $\zeta$ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(11): p. 6752-6761.
435. Mezrich, J.D., et al., *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3190-8.
436. Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz, *Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13519-24.
437. Quintana, F.J. and I.R. Cohen, *Regulatory T cells and immune computation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 903-7.
438. Epstein, F.H., et al., *Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(18): p. 1350-1358.
439. Govinden, R. and K. Bhoola, *Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$* . Pharmacology & therapeutics, 2003. **98**(2): p. 257-265.
440. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
441. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Abrogation of TGF $\beta$  signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 171-181.
442. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-61.
443. Datto, M.B., et al., *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5545-9.
444. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
445. Coffey, R.J., Jr., et al., *Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3088-93.
446. Nelson, B.H., et al., *Uncoupling of prometogenic and antiapoptotic functions of IL-2 by Smad-dependent TGF- $\beta$  signaling*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(11): p. 5563-5570.

447. Genestier, L., et al., *Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(2): p. 231-239.
448. Ruegemer, J.J., et al., *Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2-and IL-4-dependent T cell-cycle progression*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(5): p. 1767-1776.
449. Cottrez, F. and H. Groux, *Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 773-8.
450. Sung, J.L., J.T. Lin, and J.D. Gorham, *CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naive CD4+ T cells*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(2): p. 233-45.
451. de Jong, R., et al., *Differential effect of transforming growth factor-beta 1 on the activation of human naive and memory CD4+ T lymphocytes*. Int Immunol, 1994. **6**(4): p. 631-8.
452. Weinberg, A.D., et al., *Transforming growth factor-beta enhances the in vivo effector function and memory phenotype of antigen-specific T helper cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2109-17.
453. Swain, S.L., et al., *Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 2991-3000.
454. Ludviksson, B.R., et al., *The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 2101-11.
455. Swain, S.L., et al., *From naive to memory T cells*. Immunol Rev, 1996. **150**: p. 143-67.
456. Zhang, X., et al., *Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion*. J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 699-709.
457. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 46-53.
458. Sad, S. and T.R. Mosmann, *Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype*. J Immunol, 1994. **153**(8): p. 3514-22.
459. Ranges, G.E., et al., *Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 991-8.
460. Smyth, M.J., et al., *Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3289-97.
461. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
462. Veldhoen, M., et al., *TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-189.
463. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
464. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
465. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.

466. Akhurst, R.J. and A. Hata, *Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease*. Nature reviews Drug discovery, 2012.
467. Ichiyama, K., et al., *Foxp3 inhibits ROR $\gamma$ mat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR $\gamma$ mat*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17003-8.
468. Strobl, H. and W. Knapp, *TGF-beta1 regulation of dendritic cells*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1283-90.
469. Geissmann, F., et al., *Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 961-6.
470. Hacker, C., et al., *Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 380-6.
471. Strobl, H., et al., *flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1425-34.
472. Rajkovic, I., et al., *Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells*. Immunology, 2011. **132**(2): p. 217-25.
473. Geissmann, F., et al., *TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4567-75.
474. Hirano, T., *Interleukin 6 and its receptor: ten years later*. Int Rev Immunol, 1998. **16**(3-4): p. 249-84.
475. Sofi, M.H., et al., *Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKCtheta and NF-kappaB induces Th2 cytokine production*. Mol Immunol, 2009. **46**(7): p. 1443-50.
476. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 510-4.
477. Bernhard, H., et al., *The gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL-6 promotes the expansion of human hematopoietic progenitor cells capable to differentiate into functional dendritic cells*. Exp Hematol, 2000. **28**(4): p. 365-72.
478. Hawrylowicz, C. and A. O'garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(4): p. 271-283.
479. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annual review of immunology, 2001. **19**(1): p. 683-765.
480. O'Garra, A., et al., *Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 114-31.
481. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
482. Sellon, R.K., et al., *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5224-31.
483. Suzuki, T., et al., *Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors*. The Journal of experimental medicine, 1995. **182**(2): p. 477-486.
484. Liu, Y., et al., *The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor*. The Journal of Immunology, 1997. **158**(2): p. 604-613.

485. Spencer, S.D., et al., *The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(4): p. 571-578.
486. Kotenko, S.V., et al., *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. The EMBO journal, 1997. **16**(19): p. 5894-5903.
487. O'Farrell, A.-M., et al., *Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(9): p. 4607-4615.
488. Brooks, D.G., et al., *Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1301-9.
489. Ejrnaes, M., et al., *Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2461-72.
490. O'Garra, A. and P. Vieira, *T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 425-8.
491. Li, C., I. Corraliza, and J. Langhorne, *A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4435-42.
492. Gazzinelli, R.T., et al., *In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 798-805.
493. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
494. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 801-5.
495. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 28-50.
496. Maynard, C.L. and C.T. Weaver, *Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 219-33.
497. Trinchieri, G., *Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 239-43.
498. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 816-22.
499. Murray, P.J., *Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 379-86.
500. Mitra, R.S., et al., *Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(6): p. 2668-2677.
501. Macatonia, S.E., et al., *Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production*. The Journal of Immunology, 1993. **150**(9): p. 3755-3765.
502. Förtsch, D., M. Röllinghoff, and S. Stenger, *IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(2): p. 978-987.

503. Tze, L.E., et al., *CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(1): p. 149-165.
504. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(7): p. 4312-4318.
505. Manuzak, J., S. Dillon, and C. Wilson, *Differential interleukin-10 (IL-10) and IL-23 production by human blood monocytes and dendritic cells in response to commensal enteric bacteria*. Clinical and Vaccine Immunology, 2012. **19**(8): p. 1207-1217.
506. Grazia Roncarolo, M., et al., *Interleukin - 10 - secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunological reviews, 2006. **212**(1): p. 28-50.
507. Barrat, F.J., et al., *In vitro generation of interleukin 10–producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)–and Th2-inducing cytokines*. The Journal of experimental medicine, 2002. **195**(5): p. 603-616.
508. Colic, M., et al., *Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions*. J Dent Res, 2009. **88**(12): p. 1142-7.
509. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
510. Klyushnenkova, E., et al., *T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression*. J Biomed Sci, 2005. **12**(1): p. 47-57.
511. Soilleux, E.J., et al., *Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 445-57.
512. van den Berk, L.C., et al., *Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells*. Immunology, 2009. **128**(4): p. 564-72.
513. Brenk, M., et al., *Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 145-54.
514. Yan, Y., et al., *IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5953-61.
515. Qiao, M., A.M. Thornton, and E.M. Shevach, *CD4+ CD25+ regulatory T cells render naive CD4+ CD25- T cells anergic and suppressive*. Immunology, 2007. **120**(4): p. 447-55.
516. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
517. Mandapathil, M., et al., *Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression*. J Immunol Methods, 2009. **346**(1-2): p. 55-63.
518. Mandapathil, M., et al., *Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27571-80.
519. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5986-93.
520. Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends in biotechnology, 2006. **24**(4): p. 150-154.

521. Nishida, S., et al., *Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation*. Journal of bone and mineral metabolism, 1999. **17**(3): p. 171-177.
522. Mueller, S.M. and J. Glowacki, *Age - related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three - dimensional collagen sponges*. Journal of cellular biochemistry, 2001. **82**(4): p. 583-590.
523. Rodríguez - Lozano, F.J., et al., *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues*. International endodontic journal, 2011. **44**(9): p. 800-806.
524. Croitoru-Lamoury, J., et al., *Interferon-gamma regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e14698.
525. Ghali, O., et al., *TNF-alpha's effects on proliferation and apoptosis in human mesenchymal stem cells depend on RUNX2 expression*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1616-26.
526. Zhao, L., et al., *Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1*. Stem Cells, 2011. **29**(10): p. 1601-10.
527. Wei, H., et al., *The role of IL-6 in bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) proliferation and chondrogenesis*. Cell Tissue Bank, 2013. **14**(4): p. 699-706.
528. Sonomoto, K., et al., *Interleukin-1beta induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3355-63.
529. Huang, H., et al., *IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling*. Cell Death Differ, 2009. **16**(10): p. 1332-43.
530. Weiss, S., et al., *Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 84-93.
531. Ogawa, T., T. Akazawa, and Y. Tabata, *In vitro proliferation and chondrogenic differentiation of rat bone marrow stem cells cultured with gelatin hydrogel microspheres for TGF-beta1 release*. J Biomater Sci Polym Ed, 2010. **21**(5): p. 609-21.
532. Longobardi, L., et al., *Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(4): p. 626-36.
533. Zhu, H., et al., *The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 928-35.
534. Koning, J.J., et al., *Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation*. Frontiers in immunology, 2013. **4**.
535. Chen, Y., et al., *Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver*. Journal of cellular and molecular medicine, 2010. **14**(6b): p. 1494-1508.
536. Deng, J., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue*. Neurological Sciences, 2011. **32**(4): p. 641-651.
537. Hamou, C., et al., *Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization*. Plastic and reconstructive surgery, 2009. **123**(2 Suppl): p. 45S.
538. Schieker, M., et al., *The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells*. J Anat, 2004. **204**(2): p. 133-9.
539. Schieker, M., et al., *Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence*. J Anat, 2007. **210**(5): p. 592-9.

540. Wang, L., R. Zhang, and B. Peng, *Expression of a novel PDGF isoform, PDGF-C, in experimental periapical lesions*. J Endod, 2009. **35**(3): p. 377-81.
541. Wang, L. and B. Peng, *Correlation between platelet-derived growth factor B chain and bone resorption in rat periapical lesions*. J Endod, 2007. **33**(6): p. 709-11.
542. Kollar, K., et al., *Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction*. Int J Cell Biol, 2009. **2009**: p. 904682.
543. Knudson, W. and R.F. Loeser, *CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 36-44.
544. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood, 1991. **78**(1): p. 55-62.
545. Gronthos, S., et al., *The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4164-4173.
546. Oyajobi, B.O., et al., *Isolation and Characterization of Human Clonogenic Osteoblast Progenitors Immunoselected from Fetal Bone Marrow Stroma Using STRO - 1 Monoclonal Antibody*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(3): p. 351-361.
547. Dennis, J.E., et al., *The STRO-1+ marrow cell population is multipotential*. Cells Tissues Organs, 2001. **170**(2-3): p. 73-82.
548. Ahdjoudj, S., et al., *Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO - 1+ cells*. Journal of cellular biochemistry, 2001. **81**(1): p. 23-38.
549. Gronthos, S., et al., *Differential cell surface expression of the STRO - 1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(1): p. 47-56.
550. Stewart, K., et al., *Further characterization of cells expressing STRO - 1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(8): p. 1345-1356.
551. Shi, S. and S. Gronthos, *Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(4): p. 696-704.
552. Roux, P.P. and P.A. Barker, *Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor*. Prog Neurobiol, 2002. **67**(3): p. 203-33.
553. Wheeler, E.F. and M. Bothwell, *Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis*. J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 930-45.
554. Buhning, H.J., et al., *Novel markers for the prospective isolation of human MSC*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 262-71.
555. Quirici, N., et al., *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies*. Exp Hematol, 2002. **30**(7): p. 783-91.
556. Meyerrose, T.E., et al., *In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 220-7.
557. Soncini, M., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 296-305.
558. Churchman, S.M., et al., *Transcriptional profile of native CD271+ multipotential stromal cells: evidence for multiple fates, with prominent osteogenic and Wnt pathway signaling activity*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2632-43.
559. Watson, J.T., et al., *CD271 as a marker for mesenchymal stem cells in bone marrow versus umbilical cord blood*. Cells Tissues Organs, 2013. **197**(6): p. 496-504.

560. Lee, H.J., et al., *Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2325-32.
561. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
562. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
563. Stenderup, K., et al., *Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells*. Bone, 2003. **33**(6): p. 919-26.
564. Mauney, J.R., D.L. Kaplan, and V. Volloch, *Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion*. Biomaterials, 2004. **25**(16): p. 3233-43.
565. Battula, V.L., et al., *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. haematologica, 2009. **94**(2): p. 173-184.
566. Park, J.C., et al., *Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations*. J Clin Periodontol, 2011. **38**(8): p. 721-31.
567. Ge, S., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy*. Regen Med, 2012. **7**(6): p. 819-32.
568. Danin, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. **90**(4): p. 514-7.
569. Moldauer, I., I. Velez, and S. Kuttler, *Upregulation of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions*. J Endod, 2006. **32**(5): p. 408-11.
570. Niemeyer, P., et al., *Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice*. Cytotherapy, 2008. **10**(8): p. 784-95.
571. Grinnemo, K.H., et al., *Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(5): p. 1293-300.
572. Le Blanc, K. and O. Ringden, *Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience*. J Intern Med, 2007. **262**(5): p. 509-25.
573. Le Blanc, K., et al., *HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 890-6.
574. Atoui, R., et al., *Marrow stromal cells as universal donor cells for myocardial regenerative therapy: their unique immune tolerance*. Ann Thorac Surg, 2008. **85**(2): p. 571-9.
575. Kilroy, G.E., et al., *Cytokine profile of human adipose - derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro - inflammatory factors*. Journal of cellular physiology, 2007. **212**(3): p. 702-709.
576. Pierdomenico, L., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp*. Transplantation, 2005. **80**(6): p. 836-842.
577. Bocelli-Tyndall, C., et al., *Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(8): p. 1352-9.



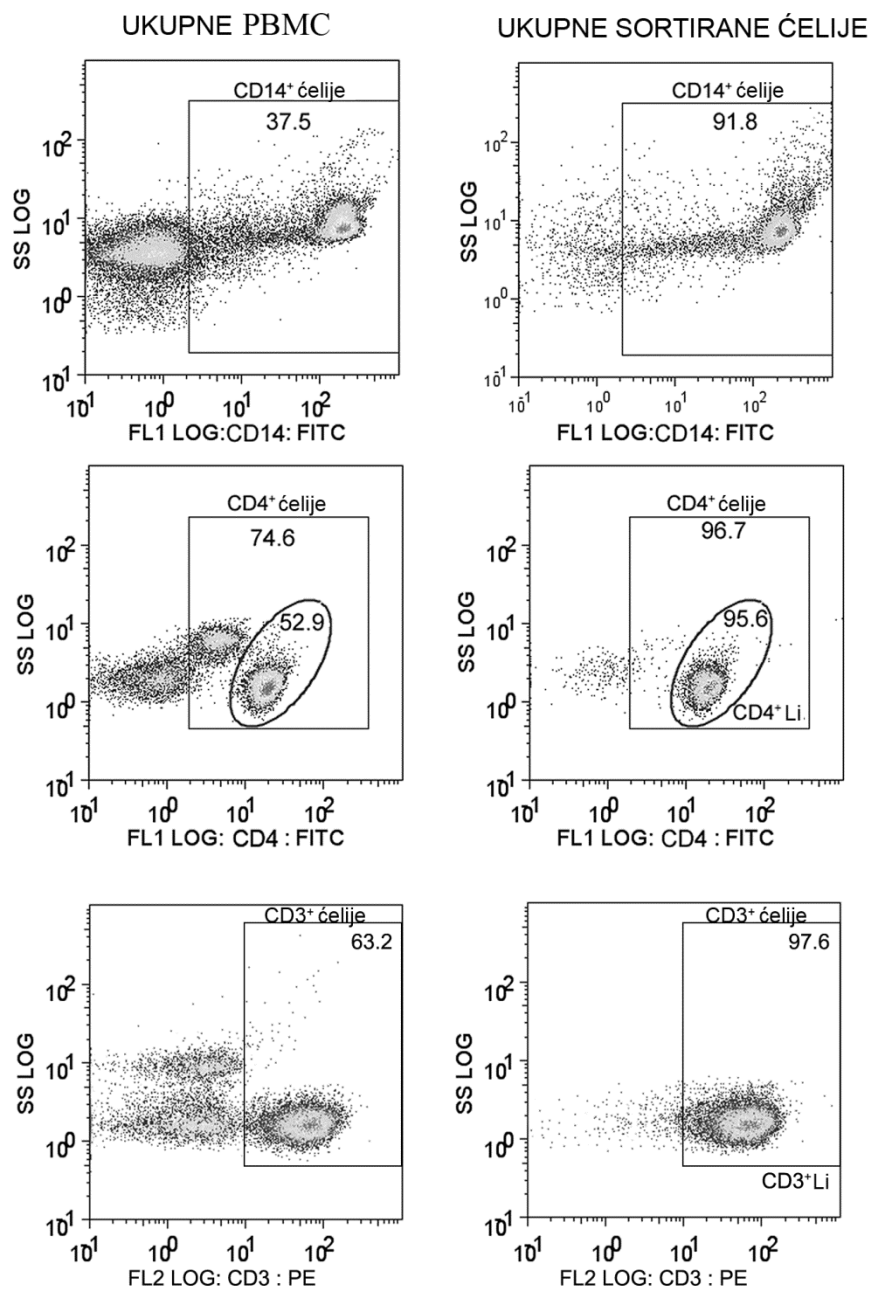
578. Fitzner, N., et al., *Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008. **15**(1): p. 138-146.
579. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. *The Journal of experimental medicine*, 2002. **196**(12): p. 1645-1651.
580. Togbe, D., et al., *TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation*. *Journal of leukocyte biology*, 2006. **80**(3): p. 451-457.
581. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(13): p. 10229-10233.
582. Cohen-Sfady, M., et al., *Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway*. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**(6): p. 3594-3602.
583. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. *The Journal of Immunology*, 2000. **164**(2): p. 558-561.
584. Ghannam, S., et al., *Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications*. *Stem Cell Res Ther*, 2010. **1**(1): p. 2.
585. Jaspersen, L.K., et al., *Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality*. *Blood*, 2009. **114**(24): p. 5062-5070.
586. Hatton, R.D., *TGF-beta in Th17 cell development: the truth is out there*. *Immunity*, 2011. **34**(3): p. 288-90.
587. McGeachy, M.J., et al., *TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1390-7.
588. Prasanna, S.J., et al., *Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9016.
589. Ryan, J.M., et al., *Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **149**(2): p. 353-63.
590. Wuyts, A., et al., *Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78*. *Eur J Biochem*, 1998. **255**(1): p. 67-73.
591. Thomson, B.M., G.R. Mundy, and T.J. Chambers, *Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption*. *J Immunol*, 1987. **138**(3): p. 775-9.
592. Carty, T.J. and R.E. Laliberte, *Meeting report. The biochemistry and pharmacology of interleukins-1 and -6*. *Agents Actions*, 1989. **26**(3-4): p. 391-3.
593. Pacifici, R., et al., *Spontaneous release of interleukin 1 from human blood monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(13): p. 4616-20.
594. Sumanasinghe, R.D., et al., *Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain*. *J Cell Physiol*, 2009. **219**(1): p. 77-83.
595. Beech, J.T., et al., *T-cell contact-dependent regulation of CC and CXC chemokine production in monocytes through differential involvement of NFkappaB: implications for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(6): p. R168.

596. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*, in *From Innate Immunity to Immunological Memory*. 2006, Springer. p. 17-58.
597. Lukić, A., et al., *Characterization of antigen - presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry*. International endodontic journal, 2006. **39**(8): p. 626-636.
598. de Almeida, M.C., et al., *A simple method for human peripheral blood monocyte isolation*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. **95**(2): p. 221-3.
599. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
600. Duffy, M.M., et al., *Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor*. Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 2840-51.
601. Čolić, M.J., et al., *Comparison of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro*. Vojnosanitetski preglod, 2004. **61**(5): p. 471-478.
602. Cosmi, L., et al., *Th17 cells: new players in asthma pathogenesis*. Allergy, 2011. **66**(8): p. 989-998.
603. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision - making: how does the immune system decide to mount a helper T - cell response?* Immunology, 2008. **123**(3): p. 326-338.
604. Lucas, S., et al., *IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(25): p. 15047-15052.
605. Awasthi, A., et al., *Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(10): p. 5904-5908.
606. Yoshimura, T., et al., *Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(8): p. 5377-5385.
607. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nature immunology, 2007. **8**(5): p. 457-462.
608. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-67.
609. Gandhi, R., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3+ regulatory T cells*. Nature immunology, 2010. **11**(9): p. 846-853.
610. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. Blood, 2010. **116**(6): p. 935-944.
611. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells*. European journal of immunology, 2007. **37**(1): p. 129-138.
612. Kaneko, T., et al., *Heterogeneity of dendritic cells in rat apical periodontitis*. Cell and tissue research, 2008. **331**(3): p. 617-623.

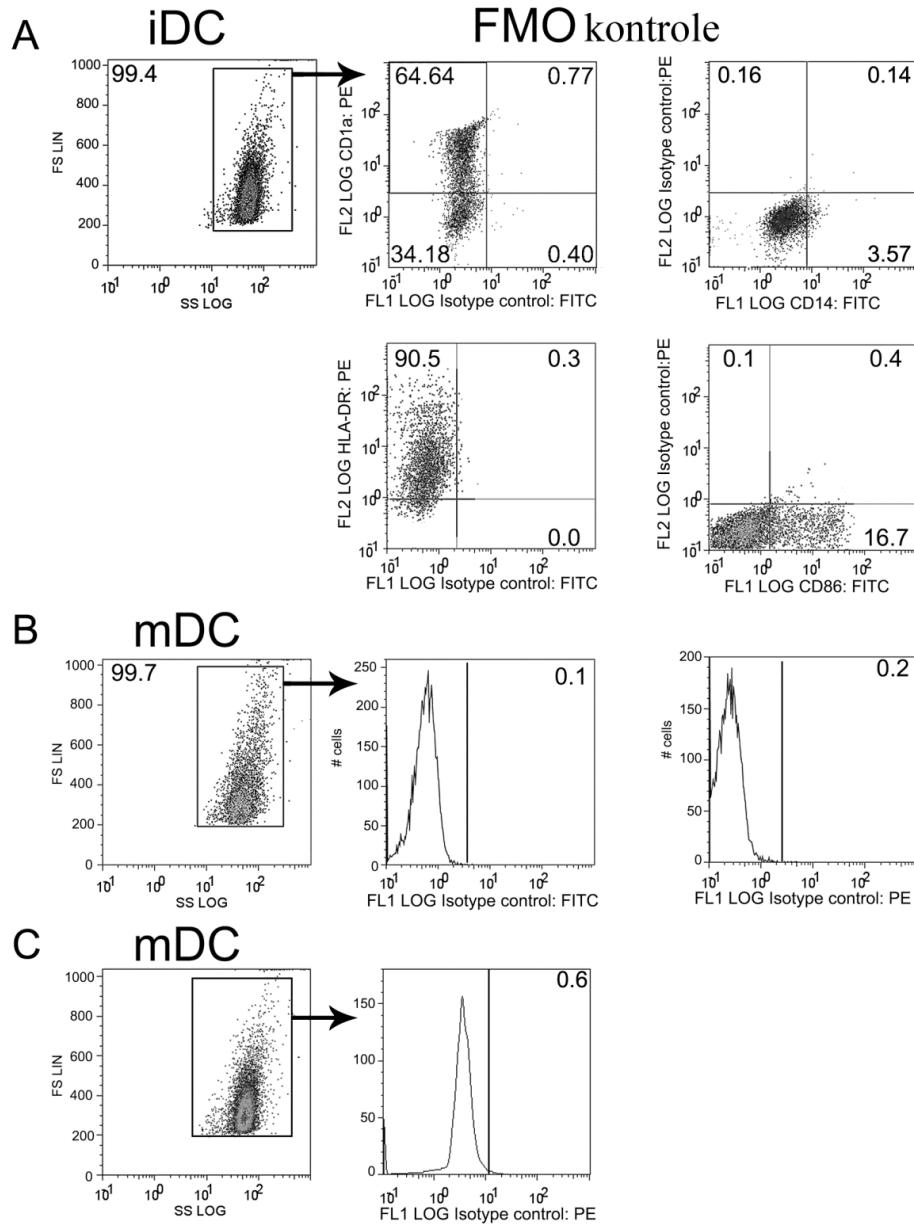
## - PRILOZI -

### Rezultati prikazani u disertaciji su objavljeni u sledećim člancima:

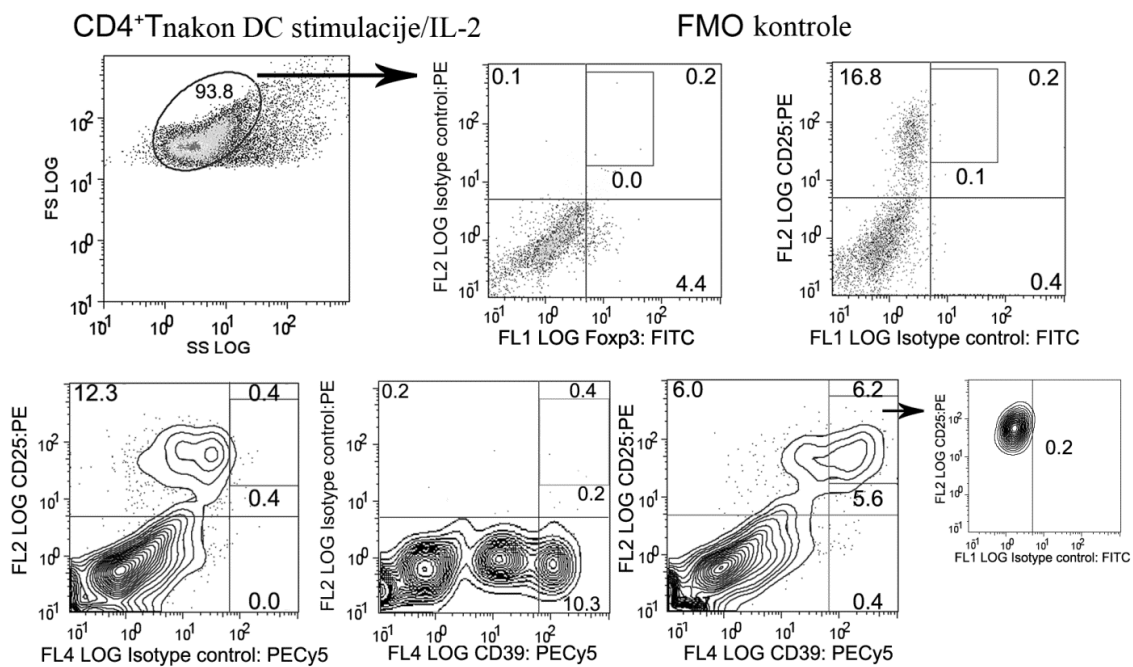
1. Tomić, S., Djokic, J., Vasilijc, S., Vucevic, D., Todorović, V., Supic, G., Colić, M., *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists*. Stem cells and development, 2011. **20**(4): p. 695-708.
2. Djokic, J., Tomić, S., Cerović, S., Todorović, V., Rudolf, R., Colić, M., *Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions*. Journal of clinical periodontology, 2012. **39**(9): p. 807-816.
3. Djokic, J., Tomić, S., Markovic, M., Milosavljevic, P., Colić, M., *Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells*. European journal of immunology, 2013. **43**(79): p. 1862-1872.



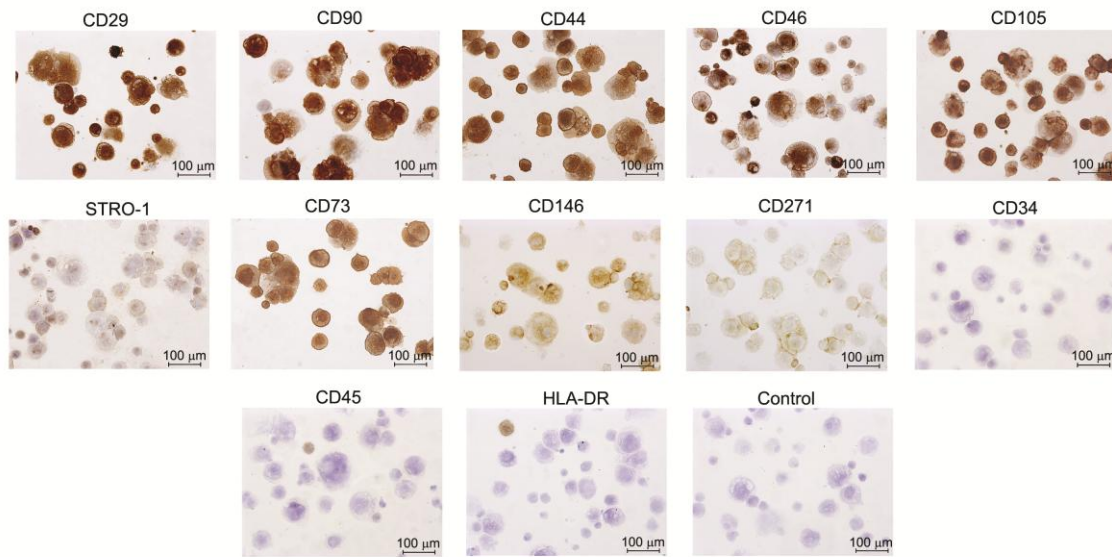
**Prilog 1.** CD14<sup>+</sup> monociti, CD3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> limfociti izolovani sortiranjem PBMC dobrovoljnih davaoca. Reprezentativna analiza markera karakterističnih za dobijene ćelijske populacije.



**Prilog 2.** Analiza vezivanja nespecifičnih izotipskih antitela (Isotype control) konjugovanih sa FITC ili PE u cilju podešavanja graničnika metodom FMO (ehgl. fluorescence minus one) za analizu ekspresije antitela specifičnih za markere nezrelih DC (iDC) i zrelih DC (mDC).

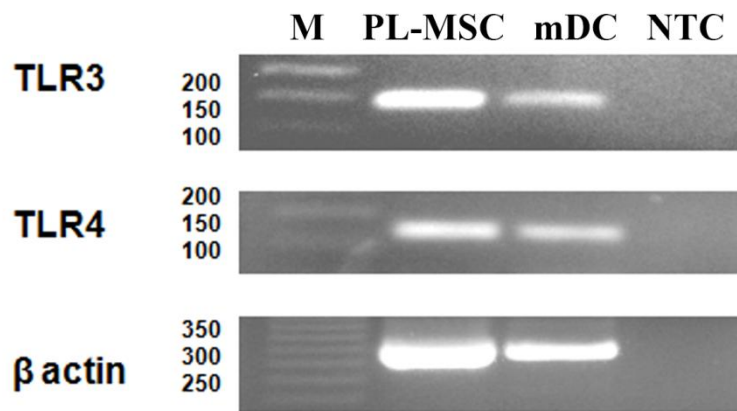


**Prilog 3.** Analiza vezivanja nespecifičnih izotipskih antitela (Isotype control) konjugovanih sa FITC, PE i PECy5 u cilju podešavanja graničnika metodom FMO (ehgl. fluorescence minus one) za analizu ekspresije antitela specifičnih za regulatorne T limfocite (Foxp3, CD25, CD39, IL-10).



#### **Prilog 4.** Fenotipske karakteristike BM-MSC.

Na ćelijama postavljenim na citospinovima je imunocitohemijskom metodom detektovana ekspresija molekula naznačenog iznad svake fotografije. Pozitivne ćelije se vide kao različite nijanse braon boje karakteristične za imunoperoksidaznu reakciju korišćenu u analizi. Ćelije su analizirane na svetlosnom mikroskopu.



**Prilog 5.** Ekspresija TLR3 i TLR4 iRNK u PL-MSC.

(A) Analiza ekspresije iRNK za TLR3, TLR4, i  $\beta$ -aktin u PL-MSC urađena RT-PCR-om. M-marker; NTC-negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola za ekspresiju TLR analizirane su zrele DC dobijene iz monocita (mDC)



# Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp and Dental Follicle are Susceptible to Activation by Toll-Like Receptor Agonists

Sergej Tomic,<sup>1</sup> Jelena Djokic,<sup>1</sup> Sasa Vasilijic,<sup>1</sup> Dragana Vucevic,<sup>1</sup> Vera Todorovic,<sup>2,3</sup>  
Gordana Supic,<sup>1</sup> and Miodrag Colic<sup>1</sup>

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) have recently become a potent tool in regenerative medicine. Due to certain shortcomings of obtaining bone marrow MSCs, alternate sources of MSCs have been sought. In this work, we studied MSCs from dental pulp (DP-MSCs) and dental follicle (DF-MSCs), isolated from the same tooth/donor, to define differences in their phenotypic properties, differentiation potential, and immunomodulatory activities. Both cell types showed colony-forming ability and expressed typical MSCs markers, but differed in the levels of their expression. DF-MSCs proliferated faster, contained cells larger in diameter, exhibited a higher potential to form adipocytes and a lower potential to form chondrocytes and osteoblasts, compared with DP-MSCs. In contrast to DF-MSCs, DP-MSCs produced the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and suppressed proliferation of peripheral blood mononuclear cells, which could be neutralized with anti-TGF- $\beta$  antibody. The treatment with toll-like receptor 3 (TLR3) agonist augmented the suppressive potential of both cell types and potentiated TGF- $\beta$  and interleukin-6 secretions by these cells. TLR4 agonist augmented the suppressive potential of DF-MSCs and increased TGF- $\beta$  production, but abrogated the immunosuppressive activity of DP-MSCs by inhibiting TGF- $\beta$  production and the expression of indolamine-2,3-dioxygenase-1. Some of these effects correlated with the higher expression of TLR3 and TLR4 by DP-MSCs compared with DF-MSCs. When transplanted in immunocompetent xenogenic host, both cell types induced formation of granulomatous tissue. In conclusion, our results suggest that dental MSCs are functionally different and each of these functions should be further explored in vivo before their specific biomedical applications.

## Introduction

ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) primarily isolated from bone marrow (BM) have become a potent tool in regenerative medicine over the past 2 decades [1]. Besides their capacity for differentiation in cell lineages of mesenchymal origin (adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes), a body of evidence suggests their potential to differentiate into nonmesenchymal cell-lineages as well, such as neuron-like cells, hepatocytes, and pancreatic-like cells [2–5]. Due to certain shortcomings of obtaining the BM-MSCs, including pain, morbidity, and low cell number on harvest, alternate sources of MSCs have been sought. Dental tissue is a potent reservoir of postnatal stem/progenitor cells that were isolated from dental pulp [6], exfoliated deciduous teeth [7], periodontal ligament [8], apical papilla [9], and dental follicle [10]. These postnatal populations possess mesenchymal-stem-cell-like qualities, including the capacity for self-renewal and multi-

lineage differentiation potential [11]. However, the precise relationship among these cell populations remains unclear. Dental MSCs might be more committed, that is, restricted in their differentiation potency in comparison to BM-MSCs due to the interaction of dental mesenchyme with dental epithelium during tooth germ development and the absence of continuous dental tissue remodeling [11].

The characteristics that qualify MSCs as a favorable tool for cellular therapies of autoimmune and chronic diseases manifested both as inflammation and tissue injury is their ability to suppress alloreactive T, B, and NK cell responses [12]. In addition, cotransplantation of BM-MSCs with hematopoietic stem cells may improve the function of these cells and reduce the severity of graft-versus-host disease [13]. The mechanisms by which BM-MSCs suppress immune cells are still controversial and include secretion of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [14], hepatocyte growth factor [15], nitric oxide [16], prostaglandin E2 [17], expression of

<sup>1</sup>Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia.

<sup>2</sup>Institute for Medical Research, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

<sup>3</sup>Faculty of Dentistry, Pancevo, University of Business Economy, Novi Sad, Serbia.

immunosuppressive minor H antigen [human leukocyte antigen-G (HLA-G)] [18], and interferon (IFN)- $\gamma$ -induced degradation of tryptophan [14,19].

Toll-like receptors (TLRs) are pattern recognition receptors, broadly distributed on cells throughout the immune system, and are key molecules bridging innate and adaptive immune responses [20]. Beside recognition of microbial molecule patterns, TLRs recognize some host molecules, also involved in the pathogenesis of autoimmune and chronic inflammatory diseases [21,22]. Recent reports suggest that MSCs express TLR1–8 [23] and that TLRs ligation modulates the proliferation and the differentiation of both human and mouse MSCs, indicating that TLRs are functional in MSC biology [23,24]. In addition, TLRs activation influences the immunological and migratory behavior of MSCs [25].

Although some functions of TLRs in MSCs biology are documented for BM-MSCs, similar analyses for dental MSCs are lacking. This aspect of dental MSCs biology is particularly important, because, during the potential transplantation into damaged or inflamed tissue, there is a high probability for transplanted cells to encounter different TLR activating signals [26–28]. Whether this ligation of TLRs will support or suppress immunosuppressive ability of MSCs is of crucial importance for the positive outcome in cell therapy. Further, the possibility to modulate immunosuppressive properties and other properties of these cells *in vitro* by TLR ligation before their implantation could enhance the safety of their application. Recent studies showed controversial effects of TLR ligation on the immunosuppressive phenotype of BM-MSCs. Some studies showed that TLR ligation inhibits immunosuppressive properties of BM-MSCs [29], whereas others reported the opposite effects of the same TLR agonists [30]. Finally, one publication recently reported that different TLR agonists can promote either proinflammatory or immunosuppressive phenotype of hMSCs [31].

In this work, we comparatively studied the morphology, phenotype, proliferation rates, and differentiation potential of 2 human dental MSCs subtypes isolated from dental follicle (DF-MSCs) and dental pulp (DP-MSCs). Further, we sought to investigate whether DP-MSCs and DF-MSCs are immunomodulatory and whether these immune functions could be further modulated with TLR agonists. Also, we wondered what mechanisms were responsible for the immunomodulatory properties of these dental MSCs. To exclude the possibility that phenotypic and functional differences between DP-MSCs and DF-MSCs could be masked by individual variations, we compared phenotypic and functional characteristics of these 2 MSC subtypes isolated from the same donor/tooth. We found that DF-MSCs and DP-MSCs are different in terms of morphology, phenotype, differentiation potential, immunomodulatory properties, and response to TLR ligation. Further, some mechanisms by which these dental MSCs respond to TLR ligation seem to be quite different from those published for BM-MSCs.

## Materials and Methods

### *Tissue samples and cell cultures*

A wisdom tooth was extracted for orthodontic reasons from a young adult at the Department for Oral Surgery, Military Medical Academy, after the patient had signed the

informed consent. DF-MSCs were isolated from dental follicles as previously described [32]. In brief, a human third molar was surgically removed before its eruption; the dental follicle was separated under sterile conditions from the mineralized tooth and minced with a scalpel. Subsequently, DP-MSCs were isolated from the dental pulp of the same tooth/donor as described elsewhere [6]. The pulp tissue and the dental follicle were digested in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, Munich, Germany) solution of type I collagenase (1 mg/mL; Sigma) and DNAase (25  $\mu$ g/mL; Sigma) for 1 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The obtained cell suspensions were then rinsed in DMEM and plated at the density of 6,000 cells per 1 cm<sup>2</sup> in culture flasks (25 cm<sup>2</sup>). Nonadherent cells were removed by changing the cultivation medium. BM was obtained from volunteer donors who had provided informed consent, and BM-MSCs were generated as described elsewhere [33]. For mixed leukocyte reactions (MLRs), allogenic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors who had signed informed consent by using a density gradient, as described elsewhere. DF-MSCs, DP-MSCs and BM-MSCs were cultured in the standard medium, composed of DMEM-low glucose (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma), and antibiotics [penicillin/streptomycin (Galenika)/gentamicin (Panfarma)], 1% each, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. On reaching 70% confluence, passaging was performed by incubating the cells with 0.2% trypsin (Sigma) dissolved in 0.02% NaEDTA in phosphate-buffered saline (PBS) (1 mL/25 cm<sup>2</sup>). The cells were then harvested, rinsed in the standard medium, and plated at the density of 5,000–6,000 per 1 cm<sup>2</sup> in flasks. On multiplication, some of the cells were frozen in liquid nitrogen in 10% dimethyl sulphoxide (Sigma) in FCS and later used in the experiments. Passages from 4 to 9 were used in all the experiments.

### *Morphometric measurements*

Morphometric measurements of adherent cells are often hampered by various irregular shapes and shape plasticity. Therefore, DP-MSCs and DF-MSCs were collected; cytopins were made using Shandon Cytospin Centrifuge (Thermo Scientific) and stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG) method. For diameter measurements, a total of 150 cells per dental MSC type were measured. Each cell was measured 4 times across different axes (which crossed each other at 45°). The mean diameter was calculated for each cell. The cells whose diameter varied more than 15% were excluded from further analysis. Measurements were performed by using the NIS-element D 2.30 software.

### *Colony forming units-fibroblasts assay*

The colony forming units-fibroblasts assay was performed as previously described [34]. DP-MSCs and DF-MSCs were harvested; and 25, 50, 100, or 200 cells were seeded in each well of a 6-well plate in 2 mL of standard medium. The cells were cultivated for 14 days while feeding the cells with the fresh medium twice a week. After the cultivation period, colonies were washed with PBS, air-dried, stained with MGG, and counted under the microscope. A colony forming units-fibroblast was defined as a group of at least 50 cells. The frequency of clonogenic cells was calculated as a number of colonies/number of seeded cells  $\times$ 100.

### Population doubling time

DF-MSCs and DP-MSCs from passages 5 and 8 were seeded at  $1 \times 10^3$  cells per well of a 6-well plate in standard medium for several intervals (0, 3, 6, 9, and 12 days) in duplicates. The cells were then trypsinized, as just described, and counted in Tripan blue solution. Population doubling time was calculated between each interval using the formula:  $T_{1/2} = (t_i - t_{i-1}) \times \lg 2 / \lg (N_i / N_{i-1})$ .  $T_{1/2}$  represents population doubling time,  $N_i$  and  $N_{i-1}$  represents number of cells harvested at the interval "i" and the previous interval "i-1" at the time  $t_i$  and  $t_{i-1}$ , respectively.  $N_i$  and  $N_{i-1}$  were averaged from the duplicates.

### In vitro differentiation assays

**Adipogenesis.** DP-MSCs and DF-MSCs were seeded at the concentration of  $2.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  on presterilized cover slips in 24-well plates containing 1 mL of a commercial mesenchymal stem cell growth medium (MSCG) medium (Lonza, Basel, Switzerland) in an incubator ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) until they reached 100% confluence (2-3 days). After that, the MSCG medium was replaced with an adipogenic induction medium (Lonza), followed by 3-4 days of incubation. The induction medium was then replaced with an adipogenic maintenance medium (Lonza) for the next 1-3 days of incubation. Differentiation into adipocytes lasted 17-25 days repeating the induction/maintenance cycle. The control cells were cultivated in an adipogenic maintenance medium only, replacing the medium every 3-4 days. The adipogenic differentiation was evaluated by staining the cells with Oil Red O (Sigma). Cover slips were washed in PBS, immediately dried with a vacuum pump, and placed in 60% isopropyl alcohol for 1 min. The cells were then stained with Oil Red O for 15 min and analyzed.

**Chondrogenesis.** DP-MSCs and DF-MSCs were cultured as pellets in sterile polypropylene cryotubes. The cells were collected, washed twice in an incomplete chondrogenic medium (Lonza) by centrifugation of the suspension at 150 g for 5 min and careful removal of the supernatants followed by vortexing. The cells were then resuspended in 0.5 mL of complete chondrogenic media (consisting of the incomplete medium supplemented with 10 ng/mL TGF- $\beta$ 3; R&D Systems, Minneapolis, MN), centrifuged at 150 g for 5 min, and cultured as pellets for the next 14-28 days, with medium replacement twice a week. The control cells were cultivated likewise in the MSCG medium. After the chondrogenic differentiation, the pellets were embedded in cryostat embedding medium (Bio-Optica) and frozen in liquid nitrogen until the analysis. Cryocuts, 7  $\mu\text{m}$  thick, were made by using a cryomicrotome (Leica Cryocut 1850) and stained with Alcian blue for the light microscopy analysis.

**Osteogenesis.** DP-MSCs and DF-MSCs (both at  $3 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ) were placed in 24-well plates containing 1 mL of the MSCG medium. After the next 24-h incubation, the medium was replaced with an osteogenic commercial medium (Lonza), whereas the control cells continued to reside in the MSCG medium. The cultivation into osteoblasts lasted 3-4 weeks, with medium replacement twice a week. For mineralized nodule assay, the cultured cells were stained with 1% alizarin red (Sigma) in distilled water. The size of calcified nodules and the percentage of alizarin red-positive area over total area were assessed by analyzing at least 10 fields of view under the mi-

croscope. The data were processed using NIS-element D 2.30 software. Besides, the cells were trypsinized, and cytopines were prepared. The osteogenic differentiation was evaluated after the alkaline phosphatase (ALP) staining. In brief, an incubation buffer, containing Fast Red (1 mg/mL, Sigma) dissolved in a mixture of (V/V ratio 1/50) naphthol-dimethyl formamide (10 mg/mL, Sigma) and *tris*(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS, pH 8.3; Sigma), was added onto each slide, followed by incubation at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  for 1 h. Additionally, the cells were fixed and stained with anti-osteopontin antibody, as described in section Immunocytochemistry. All stained cells were analyzed using a light microscope (Olympus IX51) equipped with a camera (Nikon DXM1200C Microscope Camera).

### Xenogenic transplantation

The experiment was performed with the approval of the Military Medical Academy Ethical Committee, which strictly follows European Community Guidelines (EEC Directive 1986; 86/609 EEC). One-day-old BALB/c mice were subcutaneously injected behind the ear with  $5 \times 10^5$  of DP-MSCs and DF-MSCs as described elsewhere [35]. The implants were harvested after 18 days after euthanasia with ether. The samples were fixed in 3% glutaraldehyde for 3 h and demineralized for 7 days in 13% EDTA (pH 7.2) supplemented with 1% glutaraldehyde and then paraffin embedded. Paraffin cuts, 8  $\mu\text{m}$  thick, were stained using the standard hematoxylin eosine and masson trichrom staining and analyzed by light microscopy.

### Flow cytometry

The flow cytometry analysis was performed using the following monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD14-fluorescein isocyanate (FITC), anti-CD45-FITC, anti-CD29-FITC, anti-CD105-FITC, anti-CD44-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD34-phycoerythrine (PE) (all from Immunotools), anti-CD146-FITC, anti-CD90-FITC, anti-CD106-FITC, anti-CD56-FITC, mouse IgG1a negative control-FITC, anti-HLA-DR-PE, and mouse IgG1a negative control-PE (all from Serotec). Additionally, the indirect immunofluorescence was performed using primary, anti-CD73 (SantaCruz Biotechnology), and anti-STRO-1 (Millipore/Chemicon) mAbs followed by secondary anti-mouse IgG1-FITC mAb (Serotec). BM-MSCs, DP-MSCs, and DF-MSCs were collected and washed once in PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide. The cells were then incubated with primary mAbs, using the concentrations prepared in PBS/sodium azide as recommended by the manufacturer, for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . The incubation with the secondary mAb, for the indirect immunofluorescence, lasted 15-30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The cells were then washed in PBS/sodium azide and subsequently analyzed by using a flow cytometer (Coulter XL). The cells were gated according to the cell-specific forward scatter/side scatter parameters, and the isotype control was done for each cell type.

### Immunocytochemistry

The immunocytochemistry was performed using the following mAbs: anti-CD14, anti-CD45, anti-CD29, anti-CD105, anti CD34 (all from Dako); anti-CD44, anti-CD19, anti CD56 (all from Novocastra), anti-CD90, and anti-CD106 (all from

Serotec); anti-CD146, anti-STRO-1 (all from Millipore/Chemicon), and anti-CD73 (SantaCruz Biotechnology). Additionally, anti-osteopontin antibody (Dako) was used for staining the cells obtained during osteogenic differentiation. The cells were harvested, and cytopines were prepared from each cell type ( $0.1\text{--}1\times 10^4$  of cells per cytopine). The prepared samples were fixed in 2% pararosaniline [36] for 2 min at the room temperature, washed with PBS for 10 min, and the endogenous peroxidase was blocked with 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 10 min. After each subsequent incubation step, the slides were washed with Tris-buffered saline/0.5% bovine serum albumin (Sigma)/0.05% Tween-20 (Sigma) for 5 min. The samples were then incubated with goat serum (Dako) (diluted in PBS 1:2) for 20 min and washed. Subsequently, the samples were incubated with the primary mAbs for 60 min in a water bath. Primary antibodies were detected using a sensitive EnVision + kit (Dako), as recommended by the manufacturer. Finally, DAB + kit (Dako) was used as a chromogen. Appropriate controls included the omission of primary antibodies or the use of irrelevant Abs. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin, mounted in Keiser gel, and analyzed by light microscopy.

#### *Mixed leukocyte reactions*

The modulatory capacity of DP-MSC and DF-MSCs on the proliferation of PBMCs was evaluated in co-culture. Dental MSCs ( $1\times 10^4$ /well) were seeded in a flat-bottom 96-well plate in RPMI (Sigma)/10% FCS to adhere for 6 h. After that, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] or 200  $\text{ng}/\text{mL}$  lipopolysaccharide (LPS) (both from Sigma) were added to the appropriate wells for the next 24 h. The control MSCs were left untreated. All cells were then washed twice in PBS with 2% FCS, treated with mitomycin C (Bristol Caribbean) at the final concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 30 min, and then washed 4 times with PBS/FCS. Freshly isolated PBMCs ( $1\times 10^5$ /well) were stimulated with 250  $\text{ng}/\text{mL}$  phytohemagglutinin (PHA; Serva) and immediately added to the wells containing dental MSCs. The effect of MSCs on the proliferation of PBMC was compared with the control cultures containing PHA-stimulated PBMCs without the presence of dental MSCs. The effect of TLR agonists was evaluated by comparing the immunosuppressive effect of MSCs pretreated with TLR agonists with that of untreated MSCs. In some experiments, an anti-TGF- $\beta$  neutralizing antibody (R&D Systems) was added to MSC/PBMC co-culture in order to evaluate the role of TGF- $\beta$  in immunosuppression. This was evaluated by comparing the proliferation in MSC/PBMC co-cultures treated with anti-TGF- $\beta$  and the proliferation of control PHA-stimulated PBMCs treated the same way. PHA-stimulated PBMCs treated with TGF- $\beta$  (1  $\text{ng}/\text{mL}$ ; R&D Systems) were used as a specific control for the neutralizing activity of the anti-TGF- $\beta$  antibody. Three-day MLRs were performed, and the cultures were pulsed with 1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  [3H] thymidine (6.7  $\text{Ci}/\text{mmol}$ ; Amersham Biosciences) for the last 18 h. The cells were then harvested, and the radionuclide uptake was measured by scintillation counting (Beckman; LS5000TB scintillation counter). The counts of nonstimulated PBMCs and mitomycin-treated dental MSCs, cultured separately, were subtracted from the counts of PBMC/MSC co-cultures. All cultures were done in quadruplicate.

#### *Detection of indolamine-2,3-dioxygenase-1 expression*

DP-MSCs and DF-MSCs were cultivated with TLR agonists as in MLR. The cells were then collected, washed in 10% FCS/RPMI, and counted in 1% Trypan Blue in physiological solution. The samples were fixed with Fix/Perm medium A (Caltag Laboratories) and washed in PBS once, according to the manufacturer's protocol. After that, the cells were incubated with 5% inactivated donkey serum for 3 min followed by 20 min incubation with a goat anti-human indolamine-2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted in Fix/Perm medium B (Caltag Laboratories). For the control, an isotype antibody was used instead of the goat anti-human IDO-1 Ab. The cells were then washed in PBS/sodium azide once and incubated with a donkey anti-goat IgG:biotin (Serotec) in medium B for 15 min. After the final wash, the cells were incubated with streptavidin:PE (Serotec) in medium B for 15 min and analyzed by flow cytometry. Permeabilized cells were gated according to the predetermined position of permeabilized CD105-FITC positive cells and additionally confirmed by CD105/IDO-1 double staining.

#### *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

To determine the levels of TLR3 and TLR4 mRNA expression, DP-MSCs and DF-MSCs were harvested, washed in PBS, and the pellets were resuspended in an RNA-free solution. The samples were then frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until the RNA isolation. Total RNA isolation was performed using the RNeasy kit (Qiagen), followed by DNase treatment (Fermentas) according to the manufacturer's protocols. Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR reaction of 1  $\mu\text{g}$  cDNA was conducted with AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) using specific primers: TLR3 forward primer 5'-AGC ATA GCA GCC TCT GCT TC-3' and reverse primer 5'-CCT TCC CCT TCT CTC TTC TTC C-3'; TLR4 forward primer 5'-CCT AAG GAA ACC TGA TTA ACA-3' and reverse primer 5'-GAT ATT AGC TTA TAG GCA AGA-3';  $\beta$ -actin forward primer 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCC ATC TAC GA-3' and reverse primer 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'; all bought from MWG-Biotech AG, Ebersburg Germany. The amplification was carried out at  $94^\circ\text{C}$  for 30 s/ $55^\circ\text{C}$  for 30 s/ $72^\circ\text{C}$  for 45 s for 40 cycles using Eppendorf PCR System. The PCR products, DNA Marker 50 bp Ladder (Sigma) and nontemplate controls, were separated on a 2% agarose and stained with ethidium bromide. Images were taken by ChemImager 4400 (Alpha Innotech) and analyzed with ImageQuant TL software (Molecular Dynamics). The levels of TLR3 and TLR4 mRNA were expressed as relative values of  $\beta$ -actin expression.

#### *Cytokine detection*

Dental MSCs were cultivated with TLR agonists as in MLR. After that, the supernatants were collected and frozen at  $-40^\circ\text{C}$  for the analysis by spectrophotometry (Behring ELISA Processor II). To determine whether the levels of cytokines secreted by MSCs were changed after the removal of TLR stimuli and the mitomycin treatment, dental MSCs were treated as in MLR, but instead of PBMCs, fresh medium was

added to each well. After 24 h of incubation, supernatants were collected and analyzed. Concentrations of TGF- $\beta$  and interleukin-6 (IL-6) were determined from supernatants using the commercial ELISA kits (R&D Systems) and by calculating the unknown concentrations from the standard curves.

#### Statistical analysis

All values are given as mean  $\pm$  standard deviation. The number of samples was 3–6, if not indicated otherwise. The 2-tailed unpaired *t* test and analysis of variance tests were used for evaluating the differences between the experimental and corresponding control samples. The values  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Graphical presentation of the results was prepared in the GraphPad Prism 5.0 software. Flow cytometry data were analyzed using FlowJo 5.7. The images were processed using the NIS-element D 2.30 software and later edited in Photoshop 6.0.

### Results

#### Morphological properties, proliferation, and differentiation potential of DP-MSCs and DF-MSCs

**F1** Both DP-MSCs and DF-MSCs showed typical various-shaped fibroblast-like morphology (Fig. 1A), common to adult MSCs isolated from other tissues [37]. Morphometric

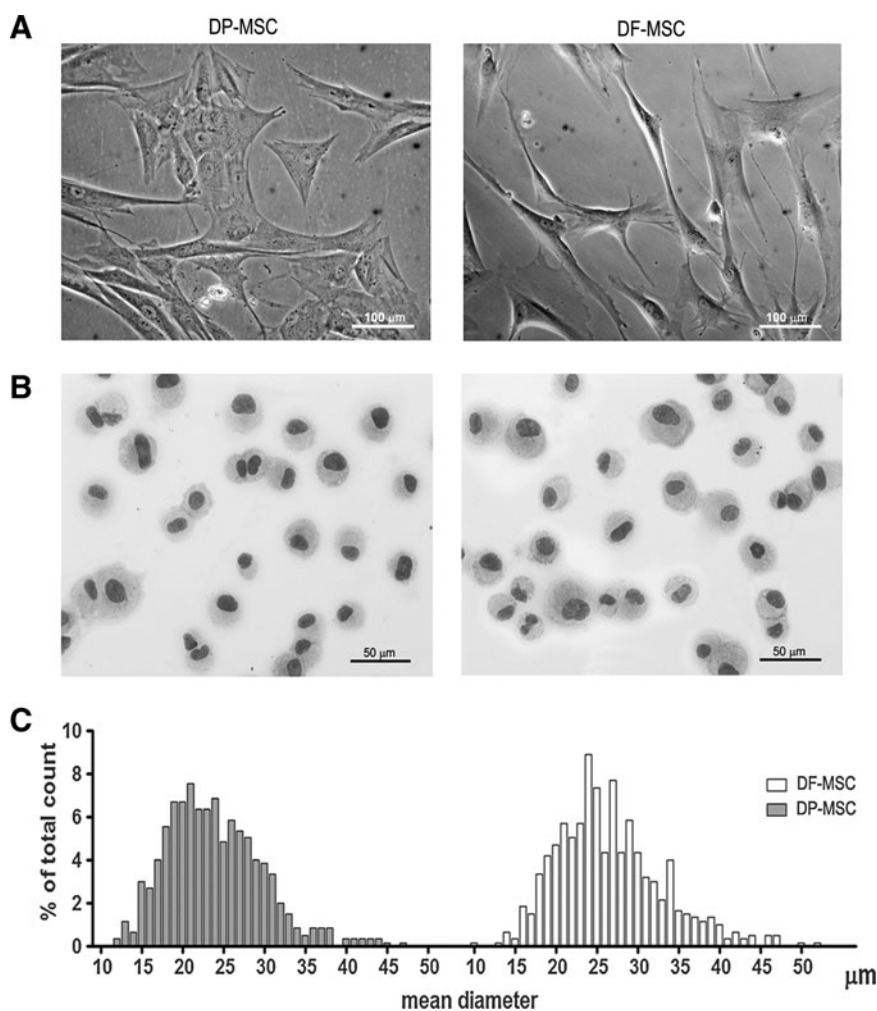
measurements of adherent cells are often hampered by various irregular shapes and shape plasticity. Therefore, cytopins were made and stained with MGG (Fig. 1B), which enabled easy diameter measurement of MSCs types (Fig. 1C), as described in Materials and Methods. MSCs significantly differed in size, DP-MSCs being  $23.95 \pm 5.6 \mu\text{m}$  in diameter (mean  $\pm$  standard deviation) ( $N = 150$ ), whereas the diameter of DF-MSCs was  $26.58 \pm 6.16 \mu\text{m}$  ( $N = 150$ ) ( $P < 0.005$ ).

When cultured at a low cell density, DF-MSCs and DP-MSCs both formed adherent clonogenic cell clusters (see **AU1** **SF1** Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertonline.com/scd](http://www.liebertonline.com/scd)), similar to those observed for various MSC populations. The frequency of colony-forming cells within DF-MSCs and DP-MSCs population was similar ( $36.5 \pm 15.8$  and  $34.0 \pm 6.8$ , respectively).

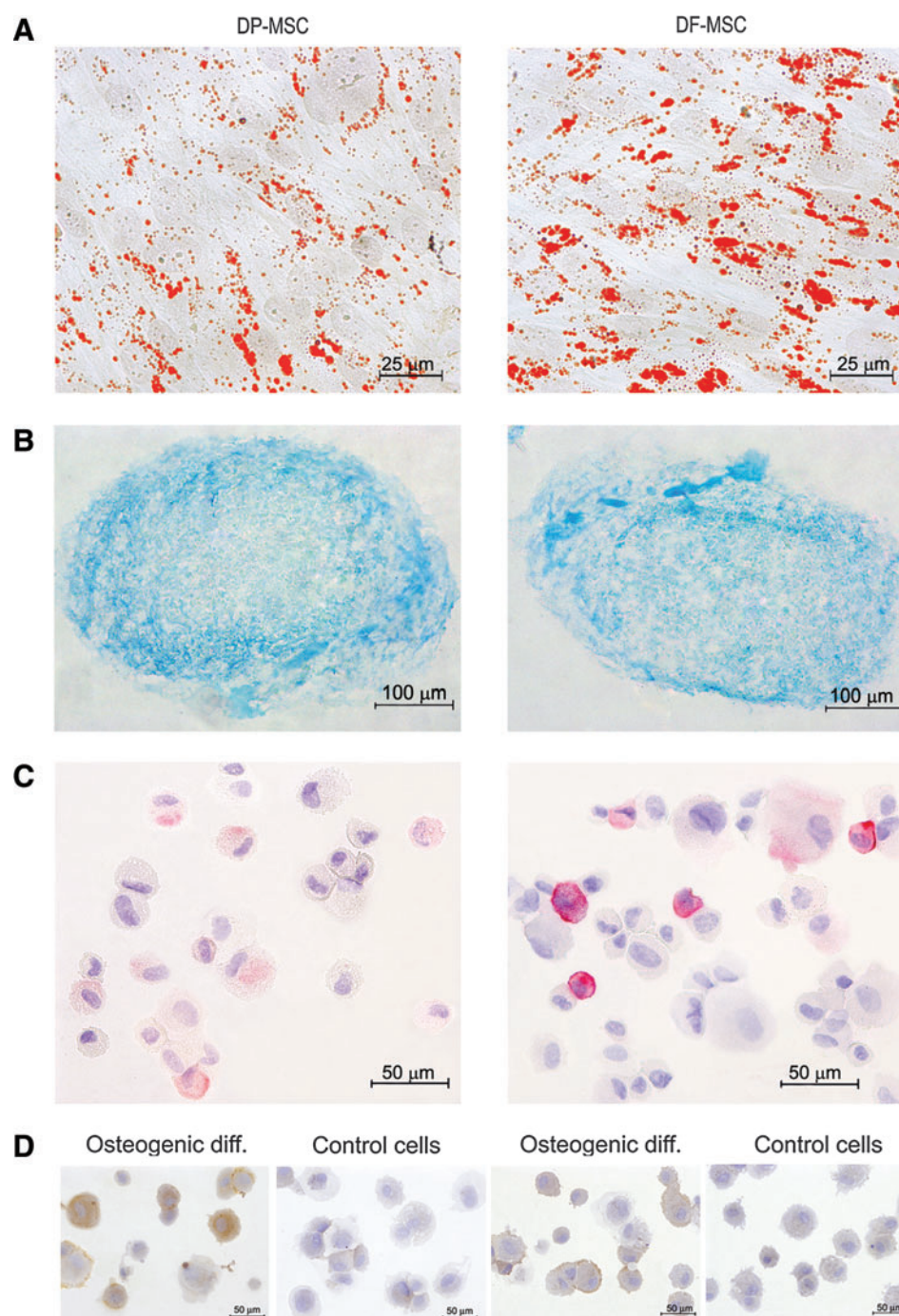
Population doubling time of DF-MSCs was shorter than the one of DP-MSC at both passages 5 (data not shown) and 8 (see Supplementary Fig. S2), suggesting a higher proliferation rate of DF-MSCs. **SF2**

To determine differentiation potential of DP-MSCs and DF-MSCs, we performed differentiation assays using commercially available mediums. Both cell types were able to differentiate into mesodermal cell lineages that is, osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes (Fig. 2). **F2**

Differentiation into adipocytes was estimated after 3 weeks of cultivation in an adipogenic medium by Oil Red O



**FIG. 1.** Morphology of DP-MSCs and DF-MSCs. **(A)** Fibroblast-like shapes of dental MSCs. **(B)** May-Grunwald-Giemsa staining of dental MSC cytopins. **(C)** Frequency distribution of dental MSCs' diameter expressed as the percentage of total count (150 cells per dental MSC type). DP-MSCs, dental pulp-mesenchymal stem cells; DF-MSCs, dental follicle-mesenchymal stem cells.



**FIG. 2.** Differentiation potential of DP-MSCs and DF-MSCs. **(A)** Adipogenic differentiation. Oil Red O staining of dental MSCs cultivated on cover-slips under the adipogenic differentiation conditions. **(B)** Chondrogenic differentiation. Alcian blue staining of cryocuts of dental MSC pellets cultivated under the chondrogenic differentiation conditions. **(C)** and **(D)** Osteogenic differentiation. Osteogenesis was evaluated by detecting the activity of alkaline phosphatase **(C)** and by immunocytochemistry, using an anti-osteopontin antibody **(D)**. Representative images from 2 independent experiments were shown. Color images available online at [www.liebertonline.com/scd](http://www.liebertonline.com/scd).

staining. DF-MSCs had a larger capacity to differentiate into adipocytes, as assessed by the higher number of accumulated lipid droplets and their larger diameter, compared with the ones accumulated in DP-MSCs (Fig. 2A).

Chondrogenesis was estimated after staining the pellet culture kept in chondrogenic media for 3 weeks, with Alcian blue, which stains proteoglycan-rich extracellular matrix. As

shown in Fig. 2B, both DF-MSCs and DP-MSCs were able to differentiate into chondrocytes. DP-MSCs were more efficient in that process, as judged by stronger Alcian blue staining.

The potential of dental MSCs to form osteoblasts was estimated by evaluating the endogenous ALP activity and the expression of osteopontin, a prominent component of the mineralized extracellular matrices of bones and teeth. Twenty to

forty percent of both dental MSCs subtypes showed endogenous ALP activity after a 3-week cultivation period in osteogenic medium. A higher percentage of DP-MSCs possessed ALP activity in comparison to DF-MSCs after the differentiation, although DF-MSCs contained individual cells that showed strong positivity for ALP (Fig. 2C). Similar results were obtained by analyzing the expression of osteopontin. Nearly all DP-MSCs and 85% of DF-MSCs showed strong/moderate membranous and intracellular staining with an anti-osteopontin mAb after osteogenesis induction (Fig. 2D). In contrast, control cells showed weak expression of osteopontin, predominantly localized perinuclearly (Fig. 2D). Alizarin Red-positive nodule formation in DP-MSCs and DF-MSCs was analyzed after the osteogenesis differentiation, which confirmed calcium accumulation in vitro (see Supplementary Fig. S3). Alizarin-positive area in DP-MSCs cultures was significantly larger compared with the area observed in DF-MSCs cultures ( $P < 0.05$ ).

SF3 ▶

Cumulatively, we concluded that DP-MSCs were more potent to form osteoblast- and chondrocyte-like cells after the differentiation in appropriate media, whereas DF-MSCs had a stronger potential to form adipocyte-like cells.

Next, we wanted to evaluate the differentiation potential of DP-MSCs and DF-MSCs in vivo by implanting these cells subcutaneously behind the ear of 1-day old BALB/c mice. After 18 days, the implants were shown to induce granulomatous tissue formation characteristic for xenotransplant rejection. At the center of the implants that was predominantly composed of death cells, no sign of differentiated structure was observed. At the periphery, cellular infiltrate predominantly composed of macrophages, giant cells, and various inflammatory cells (see Supplementary Fig. S4) could be seen. The implants were largely enclosed in a fibrous capsule of connective tissue rich in collagen, as detected by Masson trichrome staining (data not shown).

SF4 ▶

#### *Phenotypic characteristics of DP-MSCs and DF-MSCs*

To assess whether the phenotypes of DP-MSCs and DF-MSCs correspond to the phenotype of other MSCs, we analyzed the expression of molecules crucial for the identification of MSCs by immunocytochemistry and flow cytometry (Fig. 3). Neither cell type expressed CD34, CD45, HLA-DR, CD14, and CD19 (data not shown). Similar expression of CD44, CD29, and CD46 was observed between DP-MSCs and DF-MSCs; and the percentage of positive cells for these molecules was 75%–100%. The expression of CD106 could be seen on less than 0.3% of cells in both cell types. DF-MSCs were more prominently positive for CD73, CD90, and CD105 in comparison to DP-MSCs. In contrast to those markers, a higher percentage of DP-MSCs was positive for CD146 and CD56 compared with DF-MSCs. The expression of STRO-1 and CD271 was detected only by immunocytochemistry; and DF-MSCs contained a higher percentage of positive cells compared with DP-MSCs. BM-MSCs were used as a positive control for all tested markers (see Supplementary Fig. S5).

F3 ▶

SF5 ▶

#### *Immunosuppressive properties of DP-MSCs and DF-MSCs in vitro*

The immunosuppressive potential of DP-MSCs and DF-MSCs was studied in a co-culture with allogenic PHA-

stimulated PBMCs. As shown in Fig. 4, DP-MSCs slightly suppressed the proliferation of PBMCs at 1/10 (MSC/PBMC) ratio ( $P < 0.05$ ), whereas under the same conditions, DF-MSCs were nonmodulatory.

◀ F4

To determine whether TLR activation changes the MSCs' immunomodulatory phenotype, dental MSCs were pretreated with poly(I:C), a TLR3 agonist, or LPS, a TLR4 agonist, for 24 h; thoroughly washed; and then co-cultivated with PBMCs. Additionally, we confirmed that these dental MSCs expressed mRNA for both TLR-3 and TLR-4. Compared with DF-MSCs, DP-MSCs expressed 1.3 and 2.6 times more mRNA for TLR3 and TLR4, respectively (see Supplementary Fig. S6). The pretreatment of MSCs with 25  $\mu$ g/mL poly(I:C) for 24 h augmented the suppressive effect of DP-MSCs on the proliferation of PBMCs and made DF-MSCs immunosuppressive. DF-MSCs, pretreated with LPS, also suppressed the proliferation of PBMCs, whereas, surprisingly, LPS pretreatment abrogated the suppressive effect of DP-MSCs (Fig. 4). Cumulatively, the pretreatment of MSCs with either poly(I:C) or LPS significantly influenced the modulatory properties of MSCs on the proliferation of PBMCs.

◀ SF6

#### *Mechanisms of immunosuppressive properties of DP-MSCs and DF-MSCs in vitro*

To determine the mechanisms responsible for the observed induction of the immunomodulatory phenotype of dental MSCs after TLR activation, the effect of poly(I:C) and LPS on the secretion of TGF- $\beta$ , an immunosuppressive cytokine, by DP-MSCs and DF-MSCs, was studied. In the absence of TLR agonists, DF-MSCs did not secrete detectable amounts of TGF- $\beta$  in contrast to DP-MSCs, which produced  $325 \pm 46$  pg/mL per  $5 \times 10^4$  cells of this cytokine (Fig. 5A). Both poly(I:C) and LPS stimulated the secretion of TGF- $\beta$  by DF-MSCs. Poly(I:C) almost doubled TGF- $\beta$  secretion by DP-MSCs, but the production of this cytokine was reduced after the LPS treatment, in comparison to the untreated DP-MSCs. These dental MSCs were able to secrete comparable levels of TGF- $\beta$  even after the stimulus withdrawal and the mitomycin treatment for 24 h (data not shown).

◀ F5

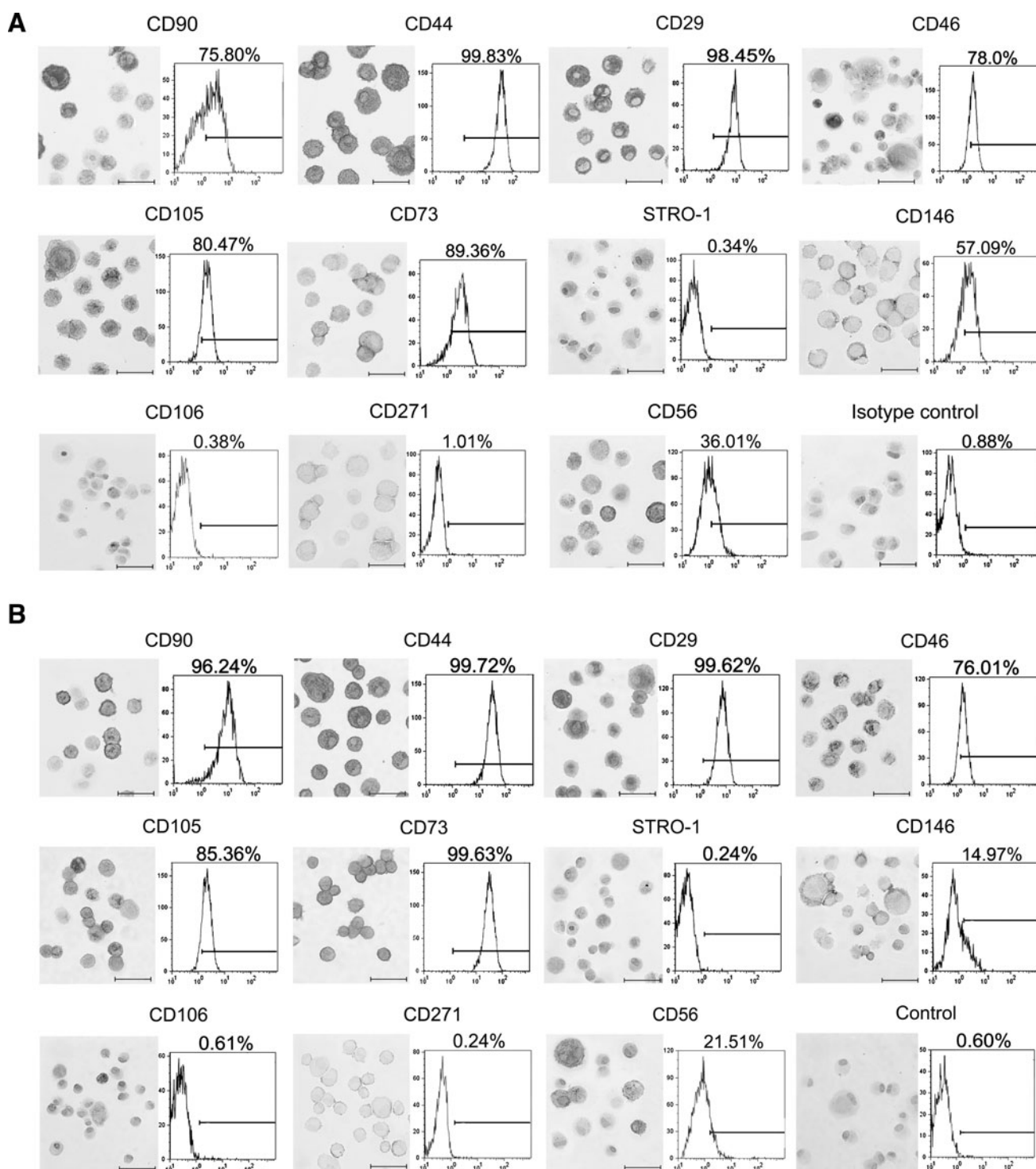
To examine the relationship between the production of TGF- $\beta$  and cellular proliferation, a neutralizing anti-TGF- $\beta$  antibody was added to PBMC cultures. The antibody completely restored the proliferation of PBMC suppressed by DP-MSCs as well as TGF- $\beta$ -induced inhibition of cellular proliferation, used as a positive control. However, the inhibition caused by poly(I:C)-treated DP-MSCs and DF-MSCs was not completely normalized (Table 1).

◀ T1

These results suggest that TGF- $\beta$  could not be the only factor responsible for the immunosuppressive activity of dental MSCs. Therefore, we studied the expression of IDO-1 in the dental MSCs types. In the absence of TLR activation, a higher percentage of DP-MSCs expressed IDO-1 in comparison to DF-MSCs (Fig. 6). Poly(I:C) did not alter the expression of IDO-1 by these cells. In contrast, LPS decreased the percentage of IDO-1 expressing DF-MSCs and DP-MSCs, 1.4 and 3.2 times, respectively.

◀ F6

Some articles suggest that the TLR treatment of BM-MSCs can inhibit the immunosuppressive phenotype of these cells and trigger the proinflammatory phenotype [38]. Therefore, beside the levels of TGF- $\beta$ , we determined the



**FIG. 3.** Phenotypic properties of (A) DP-MSCs and (B) DF-MSCs. Immunocytochemistry and flow cytometry data of dental MSCs labeled with primary or immunoglobulin isotype control antibodies were shown. The indicated percentage of positive cells corresponds to the data obtained by flow cytometry. The percentage of positive cells obtained by light microscopy analysis is given in the text unless it was different from the data obtained by flow cytometry. Scale bars represent 50  $\mu$ m. Representative images were shown from 2 independent experiments.

level of IL-6 (Fig. 5B). Nonstimulated and LPS-stimulated DP-MSCs and DF-MSCs secreted hardly detectable levels of IL-6. In contrast, poly(I:C) induced a sudden burst of IL-6 secretion by both dental MSCs in spite of the inhibited cellular proliferation.

**Discussion**

To date, most cell-based therapies were conducted using BM-MSCs [2] and, more recently, using adipose-derived stem cells [39]. A growing body of evidence suggests that



DENTAL MESENCHYMAL STEM CELL SUBSETS

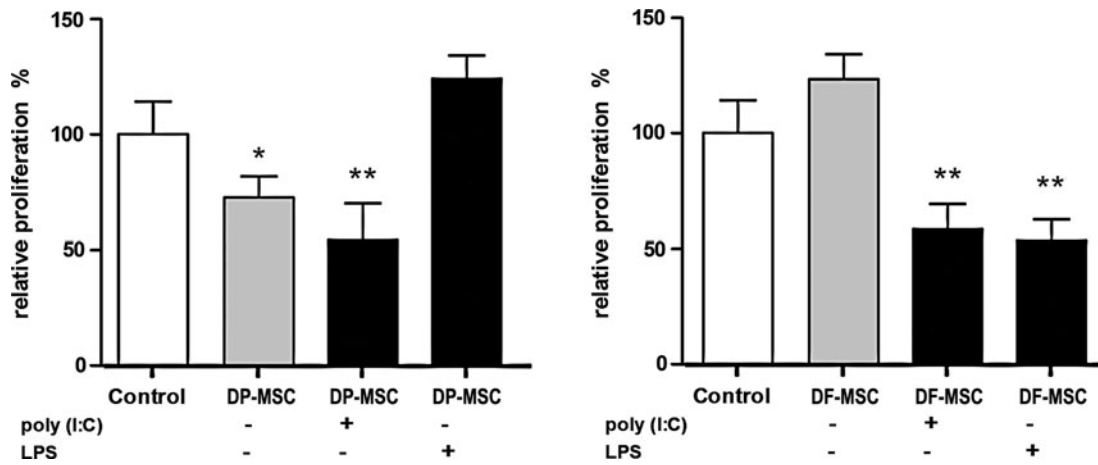


FIG. 4. Immunomodulatory properties of DP-MSCs and DF-MSCs. Dental MSCs ( $1 \times 10^4$  per well) either pretreated with TLR agonists [25  $\mu$ g/mL poly(I:C) or 200 ng/mL LPS] for 24 h (black bars) or untreated (gray bars) were cultivated for 3 days with PBMCs ( $1 \times 10^5$ /well) stimulated with 250 ng/mL phytohemagglutinin, as described in Materials and Methods. Controls were the cultures of phytohemagglutinin-stimulated PBMCs cultivated without MSCs (white bars). All cultures were done in quadruplicates calculating the mean  $\pm$  SD. The representative results, out of 4 experiments with similar results, were shown. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared with corresponding controls. SD, standard deviation. TLR, toll-like receptor; poly(I:C), polyinosinic:polycytidylic acid; LPS, lipopolysaccharide; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

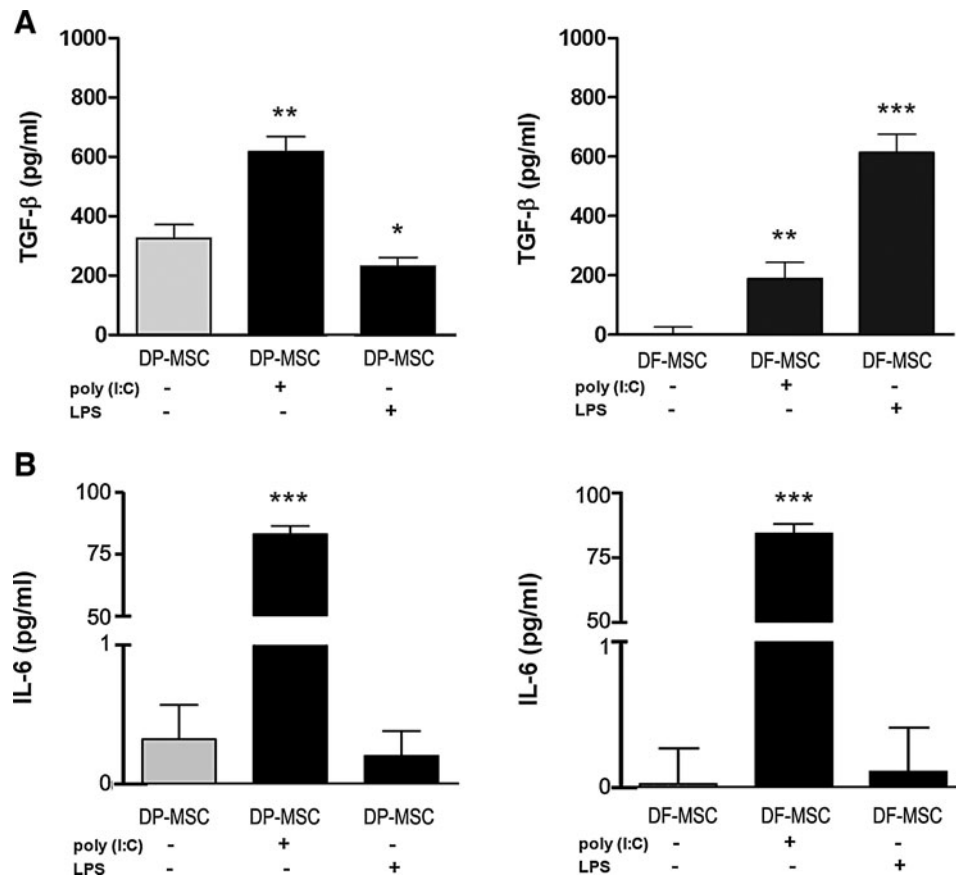


FIG. 5. The effect of TLR agonists on the production of (A) TGF- $\beta$  and (B) IL-6 by DP-MSCs and DF-MSCs. The levels of TGF- $\beta$  and IL-6 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay from culture supernatants of dental MSCs ( $1 \times 10^4$ /well) that were either treated with TLR agonists [25  $\mu$ g/mL poly(I:C) or 200 ng/mL LPS] for 24 h (black bars) or left untreated (gray bars). All cultures and measurements were done in quadruplicates calculating the mean  $\pm$  SD. The representative results, out of 4 experiments with similar results, were shown. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared with corresponding controls. TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; IL-6, interleukin-6.

TABLE 1. EFFECT OF ANTI-TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  NEUTRALIZING ANTIBODY ON THE PROLIFERATION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PRESENCE OF DENTAL PULP-MESENCHYMAL STEM CELLS AND DENTAL FOLLICLE-MESENCHYMAL STEM CELLS

	Control	+ anti-TGF- $\beta$ mAb
PBMCs	100.0% $\pm$ 14.1%	106.1% $\pm$ 9.2%
PBMCs + TGF- $\beta$ (1 ng/mL)	42.1% $\pm$ 6.2% <sup>a</sup>	89.1% $\pm$ 4.9%
PBMC/DP-MSCs	72.5% $\pm$ 9.3% <sup>b</sup>	103.4% $\pm$ 11.3%
PBMC/DP-MSCs poly(I:C)	54.2% $\pm$ 16.2% <sup>c</sup>	76.4% $\pm$ 8.5% <sup>b</sup>
PBMCs/DF-MSCs	123.2% $\pm$ 10.24%	116.4% $\pm$ 18.2%
PBMCs/DF-MSCs poly(I:C)	58.33% $\pm$ 10.5% <sup>c</sup>	80.4% $\pm$ 12.2% <sup>b</sup>

Dental MSCs ( $1 \times 10^4$ /well) either pretreated with poly(I:C) (25  $\mu$ g/mL) for 24 h or left untreated were cultivated for 3 days with phytohemagglutinin-stimulated PBMCs ( $1 \times 10^5$ /well) in presence of anti-TGF- $\beta$  antibody (10 ng/mL), as described in Materials and Methods. Phytohemagglutinin-stimulated PBMCs treated with TGF- $\beta$  (1 ng/mL) were used as a specific control for the neutralizing activity. The cultures were done in quadruplicates calculating the mean  $\pm$  standard deviation. The representative results, out of 2 experiments with similar results, are shown.

<sup>a</sup> $P < 0.005$ ; <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> $P < 0.01$  compared with corresponding controls.

TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; mAb, monoclonal antibodies; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; DP-MSCs, dental pulp-mesenchymal stem cells; poly(I:C), polyinosinic:polycytidylic acid; DF-MSCs, dental follicle-mesenchymal stem cells.

dental tissue is another potent source of alternate, postnatal MSCs. The present study comparatively evaluates 2 human dental MSCs subtypes, DF-MSCs and DP-MSCs, in terms of morphology, clonogenic capacity, proliferation rates, differentiation potential, phenotype, and immunomodulatory properties, to encourage their potential application in cell-based therapies. To exclude the possibility that differences between DP-MSCs and DF-MSCs are due to individual variations, we compared these 2 subtypes isolated from the same donor/tooth.

We showed that both of these dental MSCs subtypes possessed fibroblast-like morphology typical for MSCs [37], colony-forming ability, and were able to differentiate into osteoblast-, adipocyte- and chondrocyte-like cells. These results were confirmed by others as well (reviewed in [11]). Although chondrogenic potential of DF-MSCs is still in doubt [32,40], our study clearly shows that DF-MSCs also have the multilineage differentiation capacity in vitro. When comparing the 2 subtypes, DP-MSCs exhibited a higher potential to form chondrocyte-like cells, whereas DF-MSCs exhibited a higher potential to form adipocyte-like cells. Both DP-MSCs and DF-MSCs are comprised of heterogeneous cell subpopulations shown to have different proliferation rates, morphology, or differentiation potential [11,41]. Recently, Battula et al. showed that a CD271<sup>bright</sup> BM-MSC subpopulation can be sorted, according to the specific CD56 epitop, in 2 subpopulations having different potential to form adipocytes (CD56<sup>-</sup> cells) or chondrocytes (CD56<sup>+</sup> cells). In addition, a higher percentage of the CD56<sup>+</sup> subpopulation was positive for ALP after induction of osteogenesis [42]. These results are in line with our results regarding dental MSCs, showing that DP-MSCs contained more CD56<sup>+</sup> cells com-

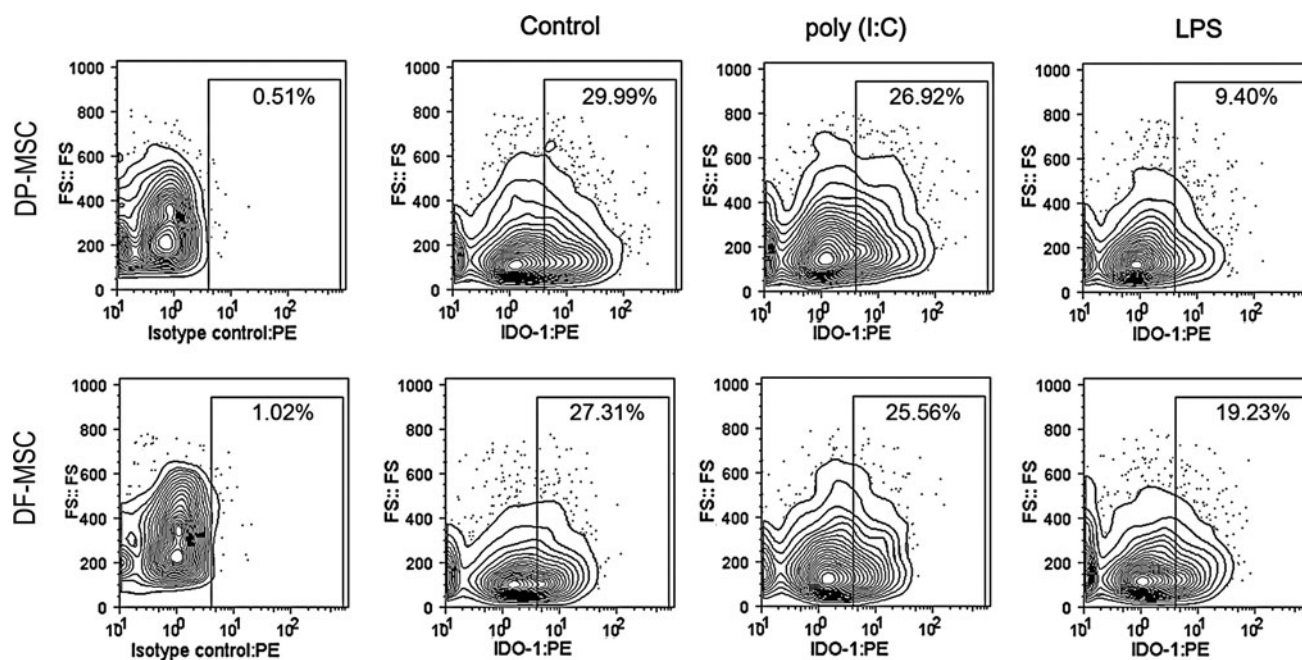


FIG. 6. The effect of TLR agonists on the expression of IDO-1 by DP-MSCs and DF-MSCs. Dental MSCs ( $1 \times 10^4$ /well) that were either treated with TLR agonists [25  $\mu$ g/mL poly(I:C) or 200 ng/mL LPS] for 24 h or left untreated were labeled with anti-IDO-1 antibody or immunoglobulin isotype control and analyzed by flow cytometry, as described in Material and Methods. The representative results, out of 4 experiments with similar results, were shown. IDO-1, indolamine-2,3-dioxygenase-1; PE, phycoerythrin.

pared with DF-MSCs. To prove this hypothesis, a separation into CD56<sup>+</sup> and CD56<sup>-</sup> subpopulations of both dental MSC types and the subsequent evaluation of their differentiation potential is necessary in further studies. Although DP-MSCs and DF-MSCs were able to differentiate *in vitro*, no signs of differentiated structure could be seen *in vivo* after the xenogenic transplantation of these cells. Xenogenic transplant reaction, characterized by cellular infiltrates and encapsulation of the implanted tissue, could be a reason for this lack of differentiation *in vivo*. Several studies also reported that human BM-MSCs or ADPCs transplanted into immunocompetent rodents induce similar immunologic reaction as observed in our study [43,44]. Therefore, differentiation potential of DP-MSCs and DF-MSCs should be explored in immunodeficient animal model in future studies.

DF-MSCs and DP-MSCs were identified as CD29, CD44, CD46, CD90, CD105, CD73, and STRO-1 positive cells that do not express CD34, CD45, HLA-DR, CD19, and CD14. Thus, together with the multilineage differentiation potential of these cells, the minimal criteria for defining multipotent MSCs are fulfilled [45]. This is also in accordance with the previously described phenotype of dental MSCs [11]. Additionally, we showed some specificity regarding the expression of CD146 and CD271. Namely, 57% of DP-MSCs and 15% of DF-MSCs were positive for the CD146 molecule, although its expression was previously attributed only to DP-MSCs [11]. Also, the immunocytochemistry analysis showed that 56% of DP-MSCs and 63% of DF-MSCs expressed CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor, p75 neurotrophin receptor). To our knowledge, this is the first time to describe the CD271 positive subpopulation within DF-MSCs. Quirici et al. showed that CD271 sorted cells are a highly homogeneous subpopulation of cells within BM-MSCs with a high proliferative capacity and the potential for multilineage differentiation [46]. The role of CD271-positive cells in DP-MSCs and DF-MSCs is still unclear and needs further investigation. Isolation of CD271-positive subpopulations from these dental MSCs could be compromised by its low membranous expression (around 1%). Low membranous expression of CD271 is in agreement with that of Soncini et al., who showed that the membranous expression of CD271 on BM-MSCs, chorionic membrane-, and amnion membrane-derived MSCs is down-regulated during culture passaging [47]. To determine whether CD271-positive sorting could enrich dental MSCs from the starting cell population, *ex vivo* isolated cells or the cells at early passages should be used. The finding that DF-MSCs proliferated faster and expressed higher levels of CD90, CD105, CD73, CD271, and STRO-1 compared with DP-MSCs suggests that DF-MSCs contain more undifferentiated cells. This is in line with the knowledge that Notch-1, which affects self-renewal and lineage-specific differentiation [48] of both stem cells and precursor cells, is expressed by DF-MSCs [10]. Further, a finding that the constitutive active Notch-1 in mesenchymal cells suppressed osteoblastic differentiation *in vitro* [49] could further explain the lower potential of DF-MSCs for differentiation into osteoblasts, compared with DP-MSCs.

A growing body of evidence has demonstrated that BM-MSCs have profound immunomodulatory and anti-inflammatory effects both *in vitro* and *in vivo* via inhibiting the proliferation and function of several major types of innate and adaptive immune cells. Recent reports suggest

that dental MSCs, such as those isolated from human gingival tissue [50], periodontal ligament [51] and dental pulp [52] can suppress mitogen- or allogenic-stimulated proliferation of PBMCs or T cells *in vitro* at a MSCs/PBMC ratio higher than 1/10. A lower MSCs number in culture was nonsuppressive. Further, it has been shown that hMSCs could even be allostimulatory in an allogenic MLR and induce IL-2 and IFN- $\gamma$  production by PBMCs at a 1/10 cell ratio [53]. We used a lower MSC/PBMC ratio (1/10), which could be more relevant *in vivo* [54], and showed that DP-MSCs are immunosuppressive, whereas DF-MSCs did not significantly change cellular proliferation.

The effect of TLR ligation on immunosuppressive properties has been previously studied using BM-MSCs [23,25,29,30]; but to our knowledge, this is the first time it is studied on dental MSCs. For the first time we showed and comparatively evaluated the expression of mRNA encoding for TLR3 and TLR4 in DP-MSCs and DF-MSCs. During potential transplantation of MSCs into damaged or inflamed tissue, there is a high probability for transplanted cells to encounter additional signals, such as endogenous/host and infection agents that can activate TLR pathways [26–28]. Therefore, the role of these receptors in immunomodulatory properties of MSCs is particularly important to evaluate before their application in cell therapies. Recent studies showed controversial effects of TLR ligation on the immunosuppressive phenotype of BM-MSCs. Some of the studies demonstrated that TLR3 and TLR4 signaling inhibits the immunosuppressive effect of BM-MSCs on the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells [29], whereas others showed that activation of the same TLRs enhanced the immunosuppressive phenotype of BM-MSCs [30]. In accordance with the latter study, we showed that both poly(I:C)- and LPS-pretreated DF-MSCs suppressed the proliferation of PBMCs at the cell ratios that were not suppressive under basal conditions. The suppressive potential of DP-MSCs was significantly augmented after the pretreatment with poly(I:C), whereas LPS treatment had no such effect. The difference between DP-MSCs and DF-MSCs in response to LPS pretreatment could be a consequence of different TLR4 expression obtained in this study. The response to LPS depends on the dosage of LPS [55] and on the level of TLR4 expression [56]. In addition, TLR4 is the only TLR that signals through both MyD88 and TRIF signaling pathway and these signaling pathways are tightly regulated by a number of regulatory proteins [57]. Consequently, different signaling outcomes, on the treatment with the same concentration of LPS, could be expected between DF-MSCs and DP-MSCs.

The finding that DP-MSCs, unlike DF-MSCs, suppressed proliferation of PBMCs in the absence of TLR ligation correlates with the ability of DP-MSCs to secrete TGF- $\beta$ . This suggests that TGF- $\beta$  could be an important mediator of immunosuppression by dental MSCs. Further, the proliferation of PBMCs in the presence of unstimulated DP-MSCs was completely restored by using a neutralizing anti-TGF- $\beta$  antibody, suggesting the dominant role of this cytokine in the immunosuppressive properties of DP-MSCs. The study of Di Nicola et al. (2002), which identified TGF- $\beta$ 1 and HGF as potential mediators of MSC immunosuppressive properties, further supports this observation [15]. The augmented suppressive potential after the treatment with poly(I:C) was followed by a significantly higher production of TGF- $\beta$  by

both dental MSCs subtypes. This effect was even more obvious after the treatment of DF-MSCs with LPS. Our results contradict those of Opitz et al. [30], who showed that TLR activation did not modulate TGF- $\beta$  production by BM-MSCs. In contrast, DP-MSCs responded differently to LPS and lowered the TGF- $\beta$  production compared with control, which correlated with lower suppression of these cells on PBMC proliferation. The observation that DP-MSCs and DF-MSCs were able to secrete comparable levels of TGF- $\beta$  even after removal of TLR agonists suggests that the effects caused by TLR activation remained when these cells were placed in the culture with PBMCs. Since anti-TGF- $\beta$  antibody could not completely restore the suppression of PBMCs proliferation triggered by activated dental MSCs, we presumed that, under such conditions, TGF- $\beta$  is not the sole mediator responsible for the observed effect.

IDO-1-mediated tryptophan degradation is reported to be an important T-cell inhibitory mechanism of BM-MSCs, which is regulated via IFN- $\gamma$  receptors and TLRs [14,30]. Additionally, IDO-1 is involved in synthesis of kynurenine, a cytotoxic mediator responsible for immunosuppression mediated by BM-MSCs, which can be blocked with 1-methyl-L-tryptophan [30]. Our results, showing that untreated DP-MSCs had a higher expression of IDO-1 compared with DF-MSCs, are in line with the previous observation. Further, LPS decreased its expression in both subsets of dental MSCs, which correlated with the abrogated suppression of PBMC proliferation mediated by LPS-pretreated DP-MSCs, but not by DF-MSCs treated similarly. Therefore, decrease in the IDO-1 expression, besides the reduced secretion of TGF- $\beta$ , could additionally explain the abrogated effect of LPS on the immunosuppressive phenotype of DP-MSCs. In contrast, a small decrease in IDO-1 expression by LPS-treated DF-MSCs was probably compensated by the enormous increase in the production of TGF- $\beta$  after LPS treatment. In addition, lower decrease in IDO-1 expression in DF-MSCs on LPS treatment, compared with DP-MSCs, could be due to lower TLR4 expression by these cells and, thus, lower responsiveness to LPS and/or activation of different signaling pathways. This could also mean that LPS could act predominantly to reduce immunosuppressive capacity of dental MSCs by reducing IDO-1 expression, thus enabling the surrounding lymphocytes more available tryptophan and increased survival rate. This hypothesis is supported by a recent study suggesting that TLR4-primed human MSCs exhibit proinflammatory behavior, whereas those primed with TLR3 agonist exhibit immunosuppressive behavior [31]. Our results contradict those of Opitz et al., who showed that the enhanced immunosuppressive activity of BM-MSCs on TLR3 and TLR4 activation correlated with induction of IDO-1 via IFN- $\beta$  and protein kinase R signaling [30]. We showed that poly(I:C) did not induce IDO-1 and that LPS down-regulated IDO-1 in DF-MSCs and DP-MSCs. Therefore, these findings suggest that the regulation of IDO-1 expression, on TLR3 and TLR4 activation, in dental MSCs might be different from that in BM-MSCs. Romieu-Mourez et al. showed that TLR3 or TLR4 activation in BM-MSCs resulted in formation of an inflammatory site, attracting inflammatory cells due to increased IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and CCL-5 production [38]. This finding correlates with the effect of TLR3 activation on increased IL-6 production by dental MSCs showed in our study and may contradict the observed suppression of PBMCs proliferation

in co-culture with poly(I:C)-pretreated dental MSCs. However, increased IL-6 production was followed by increased production of TGF- $\beta$  by these cells. McGeachy et al. found that TGF- $\beta$  and IL-6 treatment of myelin-reactive Th17-cells completely abrogated the production of proinflammatory cytokines by these cells and their pathogenic function in EAE model. Further, such treatment increased the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, by these cells [58]. Therefore, although poly(I:C) did not increase IDO-1 expression by dental MSCs, it could be possible that in our study, IL-6 and TGF- $\beta$  in combination contributed to the observed suppressive effect of poly(I:C) treated dental MSCs on PBMC proliferation. Since DF-MSCs and DP-MSCs pretreated with poly(I:C) exhibited an immunosuppressive behavior in vitro, it should be further explored whether such pretreatment of dental MSCs could reduce or even omit the granulomatous tissue formation that was observed when the untreated cells were implanted into immunocompetent mice.

In summary, we showed that DF-MSCs and DP-MSCs, isolated from the same tooth/donor, differed in morphology, proliferation, levels of MSC marker expression, and functions. The functional differences are related to their differentiation potential, immunomodulatory properties, and the response to TLR signaling. These findings may be relevant for their biomedical applications for which further explorations of their functions in vivo are necessary. In line with our results obtained in vitro, DP-MSCs, exhibiting a higher potential to form chondrocytes and osteoblasts, may be useful for the treatment of osteo-chondral diseases. On the other hand, the properties of DF-MSCs are desirable for the treatment of diseases caused by chronic inflammation accompanied by tissue injuries.

### Acknowledgments

This work was financially supported by The Ministry of Science and Technological Development of The Republic of Serbia (project: 156017) and by The Military Medical Academy, Belgrade, Serbia (project: VMA/06/10/B.2). The authors thank Prof. M. Micev for providing expertise in field of Histochemistry; Dr. B. Bozic and M. Jovic, M.Sc., for helpful assistance; and L. Rubinjoni and M. Mitic for proofreading the manuscript.

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

1. Kolf CM, E Cho and RS Tuan. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9:204–213.
2. Bianco P, M Riminucci, S Gronthos and PG Robey. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180–192.
3. Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641–650.
4. Jones EA, SE Kinsey, A English, RA Jones, L Straszynski, DM Meredith, AF Markham, A Jack, P Emery and D McGonagle. (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46:3349–3360.

5. Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
6. Gronthos S, M Mankani, J Brahim, PG Robey and S Shi. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13625–13630.
7. Miura M, S Gronthos, M Zhao, B Lu, LW Fisher, PG Robey and S Shi. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5807–5812.
8. Seo BM, M Miura, S Gronthos, PM Bartold, S Batouli, J Brahim, M Young, PG Robey, CY Wang and S Shi. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155.
9. Sonoyama W, Y Liu, T Yamaza, RS Tuan, S Wang, S Shi and GT Huang. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34:166–171.
10. Morscbeck C, W Gotz, J Schierholz, F Zeilhofer, U Kuhn, C Mohl, C Sippel and KH Hoffmann. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24:155–165.
11. Huang GT, S Gronthos and S Shi. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88:792–806.
12. Uccelli A, L Moretta and V Pistoia. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36:2566–2573.
13. Le Blanc K, F Frassoni, L Ball, F Locatelli, H Roelofs, I Lewis, E Lanino, B Sundberg, ME Bernardo, M Remberger, G Dini, RM Egeler, A Bacigalupo, W Fibbe and O Ringden. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579–1586.
14. Ryan JM, F Barry, JM Murphy and BP Mahon. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149:353–363.
15. Di Nicola M, C Carlo-Stella, M Magni, M Milanesi, PD Longoni, P Matteucci, S Grisanti and AM Gianni. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838–3843.
16. Sato K, K Ozaki, I Oh, A Meguro, K Hatanaka, T Nagai, K Muroi and K Ozawa. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109:228–234.
17. Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.
18. Selmani Z, A Naji, E Gaiffe, L Obert, P Tiberghien, N Rouas-Freiss, ED Carosella and F Deschaseaux. (2009). HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation* 87:562–566.
19. Meisel R, A Zibert, M Laryea, U Gobel, W Daubener and D Dilloo. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619–4621.
20. Iwasaki A and R Medzhitov. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987–995.
21. Marshak-Rothstein A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6:823–835.
22. Becker CE and LA O'Neill. (2007). Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol* 29:239–248.
23. Pevsner-Fischer M, V Morad, M Cohen-Sfady, L Rouso-Noori, A Zanin-Zhorov, S Cohen, IR Cohen and D Zipori. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 109:1422–1432.
24. Hwa Cho H, YC Bae and JS Jung. (2006). Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 24:2744–2752.
25. Tomchuck SL, KJ Zwezdaryk, SB Coffelt, RS Waterman, ES Danka and AB Scandurro. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26:99–107.
26. Ohashi K, V Burkart, S Flohe and H Kolb. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558–561.
27. Cohen-Sfady M, G Nussbaum, M Pevsner-Fischer, F Mor, P Carmi, A Zanin-Zhorov, O Lider and IR Cohen. (2005). Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol* 175:3594–3602.
28. Okamura Y, M Watari, ES Jerud, DW Young, ST Ishizaka, J Rose, JC Chow and JF Strauss, III. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:10229–10233.
29. Liotta F, R Angeli, L Cosmi, L Fili, C Manuelli, F Frosali, B Mazzinghi, L Maggi, A Pasini, V Lisi, V Santarlasci, L Consoloni, ML Angelotti, P Romagnani, P Parronchi, M Krampera, E Maggi, S Romagnani and F Annunziato. (2008). Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26:279–289.
30. Opitz CA, UM Litzenburger, C Lutz, TV Lanz, I Tritschler, A Koppel, E Tolosa, M Hoberg, J Anderl, WK Aicher, M Weller, W Wick and M Platten. (2009). Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells* 27:909–919.
31. Waterman RS, SL Tomchuck, SL Henkle and AM Betancourt. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5:e10088.
32. Haddouti E-M, M Skroch, N Zippel, C Muller, B Birova, A Pansky, C Kleinfeld, M Winter and E Tobiasch. (2009). Human dental follicle precursor cells of wisdom teeth: isolation and differentiation towards osteoblasts for implants with and without scaffolds. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 40:732–737.
33. Horwitz EM, PL Gordon, WK Koo, JC Marx, MD Neel, RY McNall, L Muul and T Hofmann. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8932–8937.
34. Pochampally R. (2008). Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol Biol* 449:83–91.
35. Stevens A, T Zuliani, C Olejnik, H LeRoy, H Obriot, J Kerr-Conte, P Formstecher, Y Bailliez and RR Polakowska. (2008). Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* 17:1175–1184.

36. Schrijver IA, M-J Melief, Mv Meurs, AR Companjen and JD Laman. (2000). Pararosaniline fixation for detection of co-stimulatory molecules, cytokines, and specific antibody. *J Histochem Cytochem* 48:95–103.
37. Nauta AJ and WE Fibbe. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110:3499–3506.
38. Romieu-Mourez R, M Francois, MN Boivin, M Bouchentouf, DE Spaner and J Galipeau. (2009). Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol* 182:7963–7973.
39. Gonzalez-Rey E, P Anderson, MA Gonzalez, L Rico, D Buscher and M Delgado. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58:929–939.
40. Lindroos B, K Maenpaa, T Ylikomi, H Oja, R Suuronen and S Miettinen. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 368:329–335.
41. Luan X, Y Ito, S Dangaria and TG Diekwisch. (2006). Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev* 15:595–608.
42. Battula VL, S Trembl, PM Bareiss, F Gieseke, H Roelofs, P de Zwart, I Muller, B Schewe, T Skutella, WE Fibbe, L Kanz and HJ Buhring. (2009). Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* 94:173–184.
43. Grinnemo KH, A Mansson, G Dellgren, D Klingberg, E Wardell, V Drvota, C Tammik, J Holgersson, O Ringden, C Sylven and K Le Blanc. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127:1293–1300.
44. Niemeyer P, J Vohrer, H Schmal, P Kasten, J Fellenberg, NP Suedkamp and AT Mehlhorn. (2008). Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy* 10:784–795.
45. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, D Prockop and E Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
46. Quirici N, D Soligo, P Bossolasco, F Servida, C Lumini and GL Delilieri. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30:783–791.
47. Soncini M, E Vertua, L Gibelli, F Zorzi, M Denegri, A Albertini, GS Wengler and O Parolini. (2007). Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 1:296–305.
48. Dontu G, KW Jackson, E McNicholas, MJ Kawamura, WM Abdallah and MS Wicha. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 6:R605–R615.
49. Shindo K, N Kawashima, K Sakamoto, A Yamaguchi, A Umezawa, M Takagi, K Katsube and H Suda. (2003). Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res* 290:370–380.
50. Zhang Q, S Shi, Y Liu, J Uyanne, Y Shi, S Shi and AD Le. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 183:7787–7798.
51. Wada N, D Menicanin, S Shi, PM Bartold and S Gronthos. (2009). Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol* 219:667–676.
52. Pierdomenico L, L Bonsi, M Calvitti, D Rondelli, M Arpinati, G Chirumbolo, E Becchetti, C Marchionni, F Alviano, V Fossati, N Staffolani, M Franchina, A Grossi and GP Bag-nara. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 80:836–842.
53. Fang L, C Lange, M Engel, AR Zander and B Fehse. (2006). Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation* 82:1370–1373.
54. Bocelli-Tyndall C, L Bracci, S Schaeren, C Feder-Mengus, A Barbero, A Tyndall and GC Spagnoli. (2009). Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the *in vitro* proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann Rheum Dis* 68:1352–1359.
55. Eisenbarth SC, DA Piggott, JW Huleatt, I Visintin, CA Herrick and K Bottomly. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196:1645–1651.
56. Togbe D, S Schnyder-Candrian, B Schnyder, I Couillin, I Maillot, F Bihl, D Malo, B Ryffel and VF Quesniaux. (2006). TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. *J Leukoc Biol* 80:451–457.
57. Akira S, S Uematsu and O Takeuchi. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801.
58. McGeachy MJ, KS Bak-Jensen, Y Chen, CM Tato, W Blumenschein, T McClanahan and DJ Cua. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390–1397.

Address correspondence to:  
 Prof. Miodrag Colic  
 Institute for Medical Research  
 Military Medical Academy  
 Crnotravska 17  
 Belgrade 11000  
 Serbia

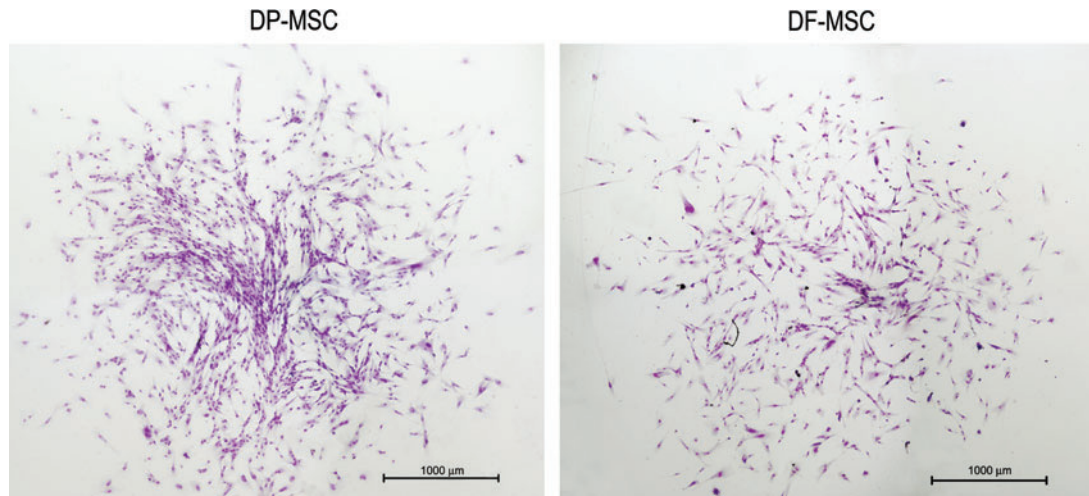
E-mail: vmaimi@eunet.rs

Received for publication April 13, 2010

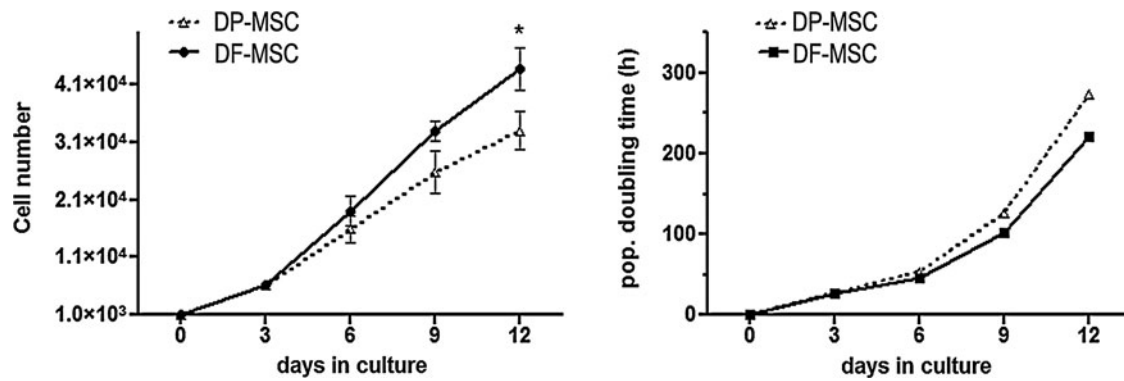
Accepted after revision August 20, 2010

Prepublished on Liebert Instant Online Month 00, 2010

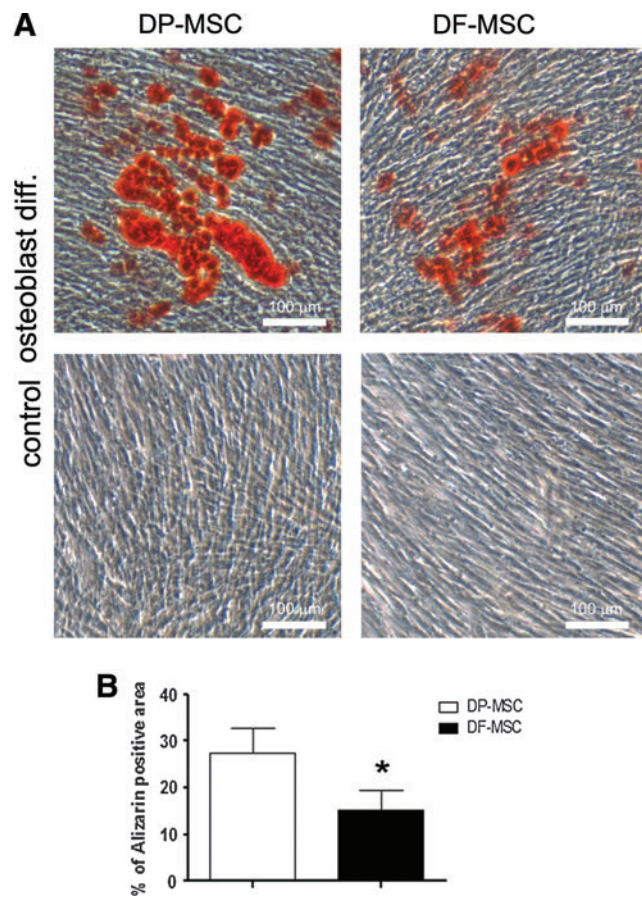
### Supplementary Data



**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** Colony-forming ability of DP-MSCs and DF-MSCs. Dental MSCs were cultivated at low cell density for 14 days, after which they were stained with May-Grunwald-Giemsa and analyzed. Images of a representative colony for each cell type are shown. DP-MSCs, dental pulp-mesenchymal stem cells; DF-MSCs, dental follicle-mesenchymal stem cells.



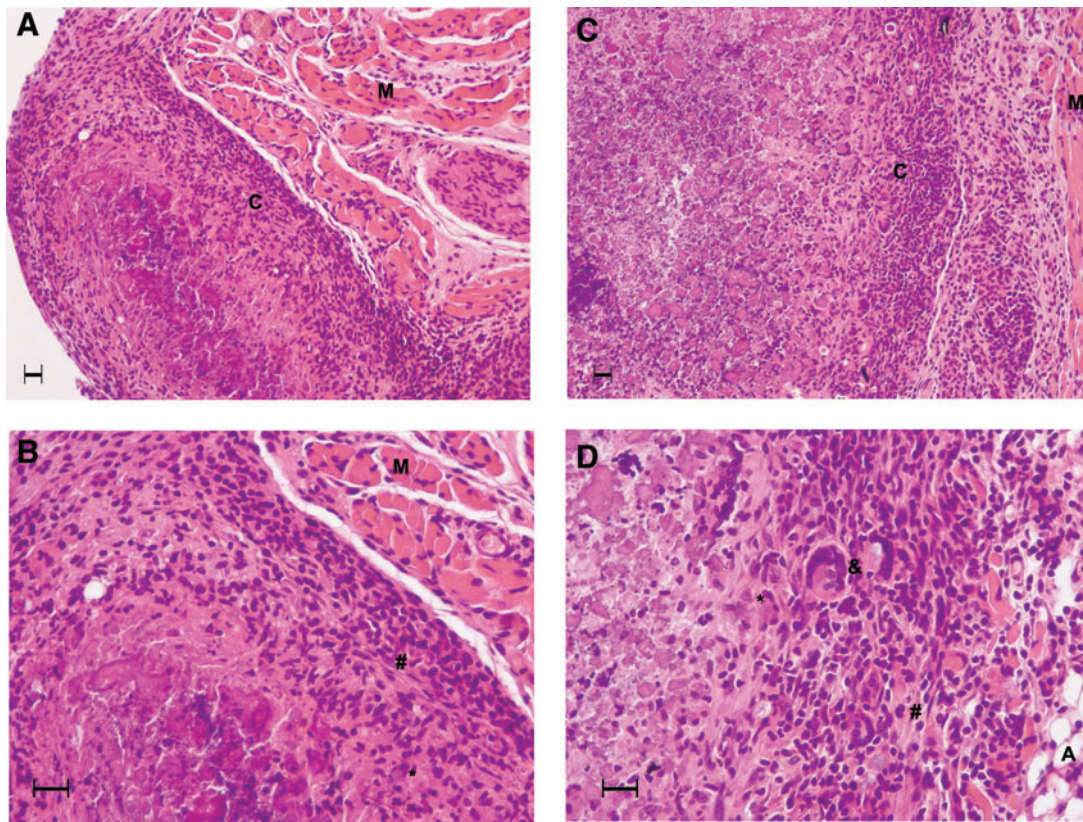
**SUPPLEMENTARY FIG. S2.** Proliferation rates of DP-MSCs and DF-MSCs. The cells from the passage 8 were seeded at  $1 \times 10^3$  per well and grown under the standard conditions for 3, 6, 9, or 12 days and then counted. *Left graph* represents averaged cell numbers  $\pm$  standard deviation ( $N=2$ ) obtained for each time point. *Right graph* represents population doubling times (hours) calculated from the average cells numbers.



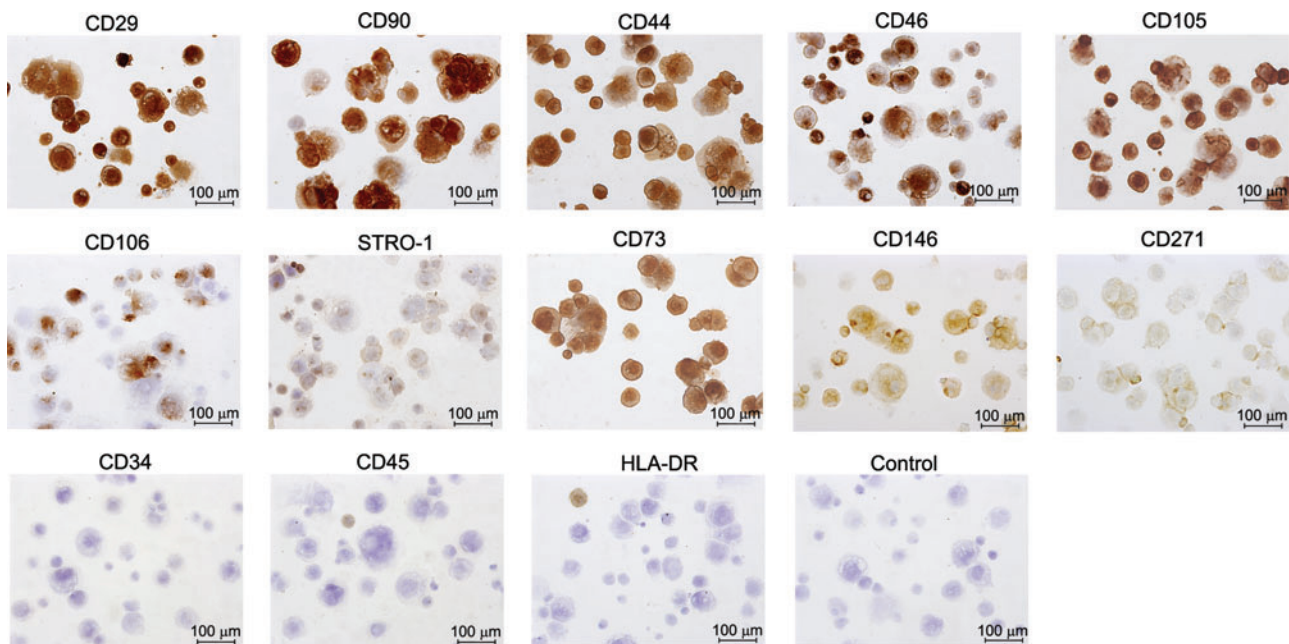
**SUPPLEMENTARY FIG. S3.** Calcified nodules formation in cultures of osteogenically differentiated DP-MSCs and DF-MSCs. **(A)** The cells cultured under the osteogenic conditions (*upper row*) or under the basal conditions (*lower row*) were stained with Alizarin red. Representative images are shown. Scale bar indicates 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** The percentage  $\pm$  standard deviation of Alizarin red area over total area is shown. Mean values and standard deviations were calculated by analyzing at least 10 fields of view under the microscope.

AU3 ▶

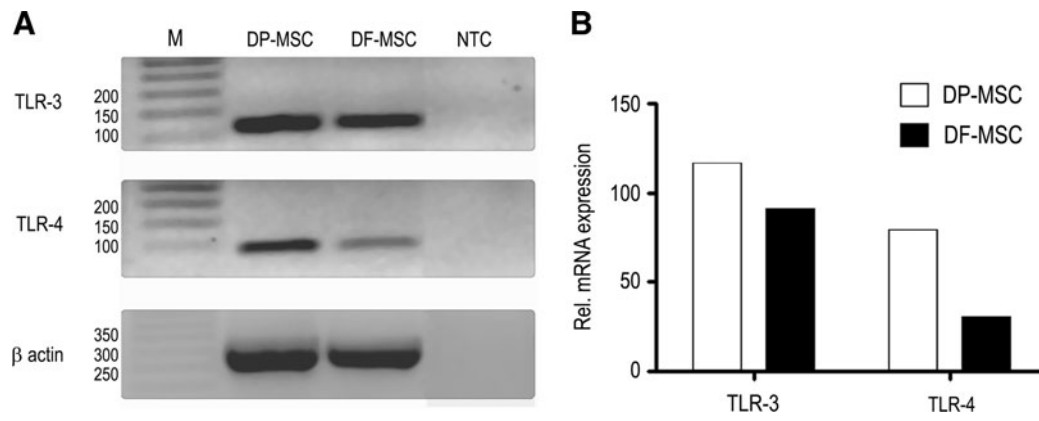




**SUPPLEMENTARY FIG. S4.** Xenogenic transplantation of DP-MSCs and DF-MSCs. One-day-old BALB/c mice were subcutaneously injected behind the ear with  $5 \times 10^5$  of DP-MSCs and DF-MSCs. The images of hematoxiline eosin staining of the samples explanted after 18 days are shown. (A) and (B) DP-MSCs implants under different magnification. (C) and (D) DF-MSCs implants under different magnification. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ . M, muscle; C, fibrous capsule; A, adipose tissue; #, fibroblast; \*, macrophage; &, giant cell.



**SUPPLEMENTARY FIG. S5.** Phenotypic properties of bone marrow-MSCs. Immunocytochemistry data of bone marrow-MSCs labeled with the indicated panel of antibodies is shown. Representative images were shown from 2 experiments.



**SUPPLEMENTARY FIG. S6.** Expression of TLR3 and TLR4 mRNA in DP-MSCs and DF-MSCs. **(A)** Reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis of TLR3, TLR4, and  $\beta$ -actin mRNA expression in dental MSCs. M, marker; NTC, non-template control. **(B)** The levels of TLR3 and TLR4 mRNA were quantified by measuring volume area of polymerase chain reaction blots, and the results are expressed as the values relative to  $\beta$ -actin expression. TLR, toll-like receptors.

# Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions

Jelena Đokić<sup>1</sup>, Sergej Tomić<sup>1</sup>, Snežana Cerović<sup>1</sup>, Vera Todorović<sup>2</sup>, Rebeka Rudolf<sup>3</sup> and Miodrag Čolić<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia; <sup>2</sup>Faculty of Dentistry Pančevo, University of Business Economy, Novi Sad, Serbia; <sup>3</sup>Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor, Slovenia; <sup>4</sup>Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia

Đokić J, Tomić S, Cerović S, Todorović V, Rudolf R, Čolić M. Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 807–816. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01917.x.

## Abstract

**Aim:** Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from healthy dental tissues are being investigated as an alternative source of MSCs for the treatment of damaged tissues and inflammatory diseases. Here we investigated whether MSCs from periapical lesions (PL-MSCs) also possess multi-lineage differentiation capacity and immunomodulatory properties.

**Material & Methods:** PL-MSCs, isolated by collagenase/DNAse digestion from surgically extracted PLs, were compared with MSCs from non-inflamed dental pulp (DP-MSCs) and dental follicle (DF-MSCs) for their phenotype and multipotent differentiation potential. The anti-inflammatory and immunomodulatory effects of PL-MSCs were studied in co-culture with peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) and PL-inflammatory cells (PL-ICs).

**Results:** PL-MSCs were characterized by typical MSCs phenotype, lower clonogenicity and self-renewal rate, compared to DF-MSCs and DP-MSCs. These cells possess the potential to differentiate into adipocyte-, osteoblast- and chondrocyte-like cells in vitro, which differs from that of DP-MSCs and DF-MSCs. PL-MSCs inhibited phytohemagglutinine-induced proliferation of PB-MNCs and production of IL-2, IFN $\gamma$  and IL-5 in the co-culture, probably via TGF- $\beta$ -dependent mechanisms. These cells also suppressed the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  by PL-ICs via soluble mediators, whereas the suppression of IL-8 production required a direct cell-to-cell contact.

**Conclusion:** The differentiation potential of PL-MSCs and their immunosuppressive/anti-inflammatory properties could be beneficial for the treatment of chronic periodontal diseases.

Key words: bone proresorptive cytokines; differentiation; granuloma; immunosuppression; inflammation; mesenchymal stem cells; periapical lesions

Accepted for publication 23 May 2012

## Conflict of interest and source of funding statement

This study was supported by EUREKA Projects E! 3971 and E! 4953, local grants from the Military Medical Academy (Project No: VMA/06-10/B.2) and Ministry of Science and Education, Republic of Serbia (Project No: 175102). The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

The exposure of dental pulp to microorganisms and their products, as a consequence of dental caries, fractures, or operative procedures, triggers a local inflammatory response. The progression of such infection and inflammation results in necrosis of the pulp and consequent

involvement of periapical tissues, generating a periapical lesion (PL) (Nair 1997, 2004). Symptomatic PL are characterized by an increased expression of adhesion molecules, chemotactic factors (Silva et al. 2005), and release of T helper (Th)1 and Th17 cytokines, including the bone proresorptive interleukin (IL)-1, IL-6, and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Stashenko et al. 1992, Colic et al. 2006, Gazivoda et al. 2009). In contrast, the Th2 immune response is related to the asymptomatic responses and further development of chronic lesions (Fukada et al. 2009). It seems that IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  are important for healing processes and down-regulation of inflammation within the PL (Danin et al. 2000, Colic et al. 2009b), but the factors contributing their secretion are poorly defined.

Recent data suggest that mesenchymal stem cells (MSCs) are an excellent tool for the therapy of chronic inflammation, due to their great capacity for tissue regeneration and substantial immunosuppressive properties (Parekkadan & Milwid 2010). MSCs possess high self-renewal capacity and multi-lineage differentiation potential (Bianco et al. 2001). Dental tissue is a new potent reservoir of postnatal MSCs that were, up to now, isolated from dental pulp (DP-MSCs) (Gronthos et al. 2000), exfoliated deciduous teeth (SHED) (Miura et al. 2003), periodontal ligament (PDL) (Seo et al. 2004), apical papilla (SCAP) (Sonoyama et al. 2008), dental follicle (DF-MSCs) (Morsczeck et al. 2005) and gingiva (Zhang et al. 2009). Some of the dental MSCs are present only in young individuals, whereas others are available only after extraction of non-erupted wisdom teeth, such as DF-MSCs. Recently, a few papers described the presence of MSCs in an inflamed PDL or DP tissues (Alongi et al. 2010, Park et al. 2011). They found that MSCs from the pathological dental tissues possess many similarities with MSCs from healthy tissues. However, it remained unknown whether MSCs from chronic inflammation, such as those in periapical granuloma, possess some of the immunomodulatory properties and what their role could be in the pathogenesis of PL. Therefore, our

primary aim was to isolate and characterize MSCs from PL (PL-MSCs), as well as to evaluate their immunomodulatory and anti-inflammatory properties.

## Material and Methods

### Isolation and cultivation of cells

PL (total  $n = 8$ ), used for the isolation of PL-MSCs ( $n = 3$ ) and PL-inflammatory cells (PL-ICs) ( $n = 5$ ), were collected from patients who signed Consent Forms at the Clinic for Maxillofacial and Oral Surgery, Military Medical Academy (MMA), Belgrade. The donors (range, 22–54 years) were without systemic diseases and had radiographic evidence of PLs. PLs were extracted at the time of apical surgery by apicoectomy, or after teeth extraction. In the latter, the lesions were excised by the curettage of periodontal apical tissue or by cutting the firmly attached PLs from dental radices with a scalpel (Colic et al. 2009a). As a positive control, we used DP-MSCs and DF-MSCs, isolated from a non-erupted wisdom tooth of a healthy individual, as described previously (Tomic et al. 2011). Peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) were isolated from healthy volunteers who gave informed consent. All studies have been approved by the Ethics Committee of the MMA.

For the isolation of MSCs, the tissues were digested in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, Munich, Germany) solution with type I collagenase (1 mg/mL; Sigma) and DNAase (25 mg/mL; Sigma) for 1 h in an incubator. The cells were cultured in the standard medium composed of DMEM-low glucose (Sigma), 10% foetal calf serum (FCS; Sigma) and antibiotics [penicillin/streptomycin/gentamicin (Galenika, Belgrade, Serbia)], 1% each). Passaging was performed using 0.2% trypsin (Sigma)/0.02% NaEDTA phosphate-buffered saline (PBS) solution. Passages from 3 to 7 were used in all experiments. Colony forming units-fibroblasts (CFU-F) assays and population doubling time (PDT) were performed as described (Pochampally 2008, Tomic et al. 2011).

PL-ICs were isolated from the PL tissues by the collagenase/DNAase digestion (Colic et al. 2006). PL-ICs and PB-MNC ( $n = 4$ ) were isolated by

Lymphoprep gradient (Nycomed, Oslo, Norway), as described (Colic et al. 2009a), counted and used subsequently in cell co-cultures experiments.

### Flow cytometry and immunocytochemistry

The flow cytometry and immunocytochemistry analyses were performed as described (Tomic et al. 2011), using the following monoclonal antibodies (mAbs) conjugated with fluorescein isocyanate (FITC): anti-CD14, anti-CD45, anti-CD29, anti-CD105, anti-CD44, anti-CD19 (Immunotools, Friesoythe, Germany), anti-CD146, anti-CD46, anti-CD166, anti-CD90, anti-CD106, mouse IgG1a negative control (Serotec, Oxford, UK). Anti-human leukocyte antigen (HLA)-DR- phycoerythrin (PE), and mouse IgG1a negative control-PE were also from Serotec. The indirect labelling was performed using anti-STRO-1 (Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA) mAb followed by secondary anti-mouse IgG1-FITC mAb. After staining, the cells were analysed with a flow cytometer. The isotype control was carried out for each experiment.

The immunocytochemistry analysis was performed with the same panel of antibodies, using a sensitive EnVision + kit (Dako, Copenhagen, Denmark) and diaminobenzidine (DAB) (Dako) to label the samples. Appropriate controls included the use of irrelevant Abs. The slides were counterstained with hematoxylin and analysed by light microscopy.

### In vitro differentiation assays

PL-MSCs, DP-MSCs and DF-MSCs were induced to differentiate by cultivating them in commercial adipogenic, osteogenic or chondrogenic media (Lonza, Basel, Switzerland), as we described previously (Tomic et al. 2011), and according to the manufacturer's protocol. The adipogenic differentiation was evaluated by Oil Red O (Sigma) staining. In the chondrogenesis assay, MSCs were cultured as pellets in polypropylene tubes in chondrogenic media (Lonza). The pellets were embedded, frozen in liquid nitrogen, and the 7  $\mu$ m thick cryocuts were stained with Alcian Blue/Nuclei Red. For the osteogenic differentiation assay, the cultured cells were stained with 1% alizarin

red (Sigma) in distilled water. The experiments on differentiation were performed for each of the three PL-MSCs cell lines, as well as DP-MSCs and DF-MSCs, in duplicates.

#### Xenogenic transplantation

One-day-old BALB/c mice were subcutaneously injected behind the ear with  $1 \times 10^6$  PL-MSCs or sham treated, as described elsewhere (Stevens et al. 2008). The implants were harvested after 18 days after euthanasia with ether. The samples were fixed in 3% glutaraldehyde for 3 h and demineralised for 7 days in 13% EDTA (pH 7.2) supplemented with 1% glutaraldehyde and then paraffin embedded. Paraffin cuts, 8  $\mu$ m thick, were stained using haematoxylin/eosin and Masson trichrom staining and analyzed by light microscopy.

#### Mixed leukocyte reactions

The modulatory capacity of PL-MSCs on the proliferation of PB-MNCs and cytokines' production was evaluated in co-culture, as described previously (Tomic et al. 2011). PL-MSCs ( $1 \times 10^4$ /well) were seeded in a flat-bottom 96-well plate in RPMI/10% FCS to adhere for 6 h, treated with mitomycin C (Bristol Caribbean Inc., Mayaguez, PR, USA) (25  $\mu$ g/ml) for 30 min, and then washed 4 times with 2% FCS/PBS. PB-MNCs ( $1 \times 10^5$ /well), either unstimulated, or stimulated with 250 ng/ml phytohemagglutinin (PHA; Serva, Heidelberg, Germany), were added in the co-culture. Control cultures were PHA-stimulated PB-MNCs. The cells were cultivated for 3 days and pulsed with 1  $\mu$ Ci/well [ $^3$ H] thymidine (6.7 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Amersham, Bucks, UK) for the last 18 h, followed by scintillation counting (Beckman; LS5000TB scintillation counter). The experiments were repeated four times, each carried out in sixplicates, using different PL-MSCs/PB-MNCs pairs. Supernatants were collected from parallel 3-day co-cultures. The experiments were repeated three times, each carried out in duplicates.

The effect of PL-MSCs on the production of cytokines by allogenic PL-ICs was evaluated in the co-culture and Transwell system experiments. In

the co-culture experiments, PL-ICs ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultivated with PL-MSCs ( $1 \times 10^4$  cells/well) in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) (20 ng/ml) (Sigma) and  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore (A23187, 1  $\mu$ M) (Sigma) for 24 h. Separate cultures of PL-ICs and PL-MSCs treated the same way served as controls. The levels of cytokines produced in the PL-MSCs/PL-ICs co-cultures were compared with the sum of cytokines produced in separate PL-ICs and PL-MSCs cultures. The experiments, each carried out in duplicate, were repeated 5 times using different PL-ICs/PL-MSCs pairs.

In the Transwell system experiments, PL-MSCs ( $5 \times 10^4$  cells/insert) were seeded onto the upper chamber of a transwell insert (0.4  $\mu$ m pore size) (BD Falcon, Heidelberg, Germany) in 24 well plates, whereas PL-ICs ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were in the lower chamber. Control PL-ICs were cultivated in 24-well plates without inserts. After 24 h of co-culture, the inserts with PL-MSCs were removed. PL-ICs from all cultures were washed and stimulated with PMA/ $\text{Ca}^{+2}$  ionophore for an additional 24 h, followed by collection and analysis of the supernatants. The experiments, each carried out in duplicate, were repeated 5 times.

#### Cytokines' detection

Concentrations of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  from the culture supernatants were determined using the commercial ELISA kits (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) by calculating the unknown concentrations of the cytokines from the standard curves.

#### Statistical analysis

Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were used to evaluate the differences between the experimental and corresponding control samples. Values at  $p < 0.05$  or less were considered to be significant statistically.

## Results

#### Morphological properties and proliferation of PL-MSCs

Following the minimal criteria for defining MSCs (Dominici et al.

2006), we isolated MSCs from the PLs of three donors by plastic adherence and cultured them in DMEM-low glucose conditions. As a positive control, we used DP-MSCs and DF-MSCs isolated from healthy pre-erupted wisdom tooth, since the MSCs characteristics of these cells are well described (Huang et al. 2009, Tomic et al. 2011). PL-MSCs showed various-shaped, fibroblast-like morphology in culture, common to adult MSCs isolated from other tissues (Nauta & Fibbe 2007). Furthermore, a high migratory activity of these cells was observed, as judged by the presence of highly mobile lamellipodias (Fig. 1a). The proliferation curve of the PL-MSCs of each donor had a typical sigmoid shape, suggesting that the proliferation rate of PL-MSCs was lower immediately upon plating in the culture (lag phase) and upon reaching the confluence (stationary phase) (Fig. 1b). The population doubling time, calculated for the 10 day period, was  $1.9 \pm 0.4$  days. When compared to DP-MSCs and DF-MSCs, PL-MSCs exhibited a lower proliferation rate, characterized by 1.2 and 1.3 times longer population doubling, respectively (Fig. 1b). When cultured at a low cell density, PL-MSCs formed adherent clonogenic cell clusters (Fig. 1c). The frequency of CFU-F cells within PL-MSCs at passage four was  $14.7 \pm 1.6$ . This was approximately 2.3 times lower than the number of clonogenic cells within DF-MSCs and DP-MSCs populations.

#### Phenotypic properties of PL-MSCs

To compare the phenotype of PL-MSCs with that of DP-MSCs and DF-MSCs, the expression of crucial MSCs markers was analysed. Flow cytometry data showed that more than 90% of PL-MSCs from each of the tested donors expressed CD105, CD166, CD44, CD29, and CD90 (Fig. 2). About half of the cells expressed CD146 ( $51.1 \pm 4.4\%$ ) and CD46 ( $53.6 \pm 7.2\%$ ) on their surface. We also found a relatively low percentage of cells expressing the STRO-1 molecule on their surface ( $7.2 \pm 3.1\%$ ). The expression of HLA-DR, CD45, CD19, and CD14 could not be detected (data not shown). PL-MSCs expressed higher levels of CD90, CD44, CD105, and

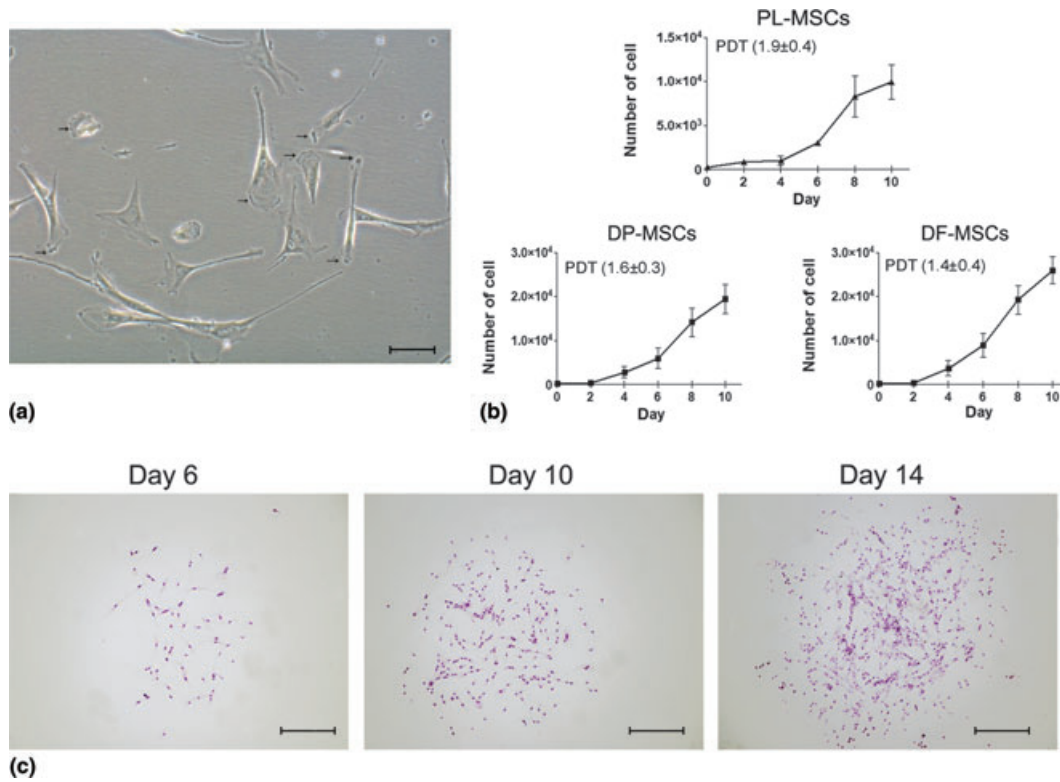


Fig. 1. Properties of periapical lesion (PL) - mesenchymal stem cells (MSCs). (a) Phase-contrast microscopy of live PL-MSCs mesenchymal stem cells (MSCs) in culture. The highly active parts of lamellipodia are marked by arrows. The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$  (b) Proliferation dynamics of PL-MSCs, dental pulp (DP-MSCs) and dental follicle (DF-MSCs) in passage (p) 4. 250 cell/well of 24-well plate were cultivated for 2–10 days, harvested and counted in Tripan blue solution. Population doubling time (PDT) was determined using the formula:  $\text{PDT} = 10 \times \lg 2 / \lg(N_{10}/N_0)$ ;  $N_{10}$  and  $N_0$  - number of cells harvested at day 10 and the starting number of cells, respectively. The values are given as mean  $\pm$  SD of triplicates. (c) Colony forming units - fibroblasts (CFU-F). PL-MSCs from passage 3 (25, 50, 100, or 200 cells) of were cultivated in a 6-well plate for 6–14 days. The frequency of CFU-F, defined as a group of at least 50 cells, was determined after staining the cultures with MGG, as the number of colonies/number of seeded cells  $\times$  100. The scale bar represents 500  $\mu\text{m}$ . Representative results from one experiment are shown, out of three with different donors.

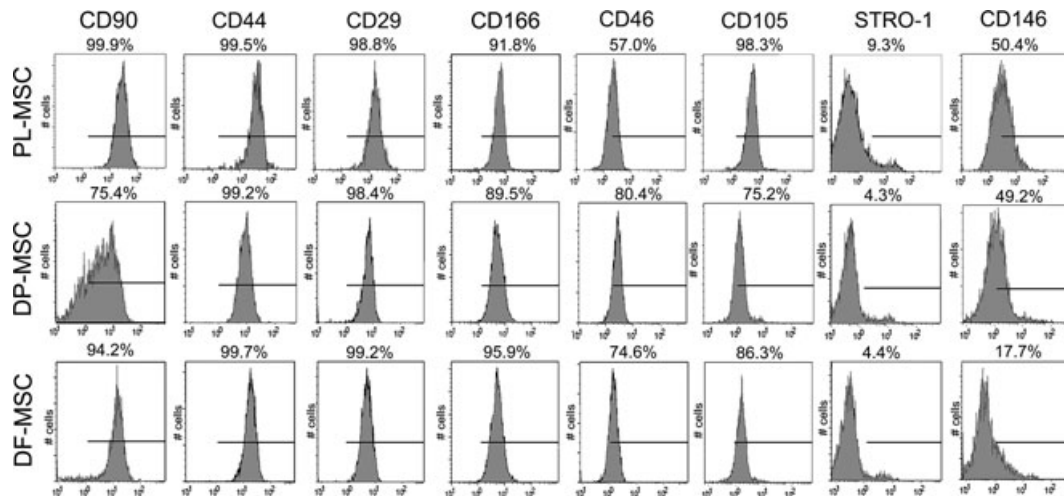


Fig. 2. Phenotypic properties of periapical lesion (PL)- mesenchymal stem cells (MSCs), dental pulp (DP-MSCs) and DF-MSCs - flow cytometry. MSCs from passage 3 were harvested and prepared for the flow cytometry analysis, as described. The cells were gated according to the cell-specific forward scatter/side scatter parameters and the percentage of positive cells (covered with the marker) for the indicated molecules was determined based on the isotype control. A representative experiment is shown.

lower levels of CD46 compared to DP-MSCs and DF-MSCs (Fig. 2).

Additionally, the phenotype of PL-MSCs was assessed by immunocytochemistry. As shown in Fig. 3, the percentages of positive PL-MSCs for CD105, CD166, CD44, CD29, and CD90 were in accordance with the flow cytometry data. However, the analysis showed that more than 60% of PL-MSCs were positive for the STRO-1 molecule ( $67.5 \pm 6.3\%$ ), although the expression was weak and localised predominantly intracellularly. Similar intracellular expression, and the frequency of STRO-1<sup>+</sup> cells, was detected within DP-MSCs and DF-MSCs (data not shown). We found that more than 90% of the PL-MSCs were positive for the CD46 molecule and half of them expressed the marker exclusively intracellularly. In contrast, approximately 85% of PL-MSCs had CD146 expressed either weakly or strongly on the surface of the PL-MSCs. Again, HLA-DR, CD45, CD19, and CD14 were

not detected in any of the dental MSCs populations, which confirmed that PL-MSCs possess a typical MSC phenotype. The expression of these markers by PL-MSCs did not differ significantly between passages 3 and 7, regardless of the method applied (data not shown).

#### Differentiation potential of PL-MSCs

We showed that after 3 weeks of cultivation in the inductive adipogenic conditions, PL-MSCs are able to accumulate Oil-red positive lipid droplets inside the cells. DF-MSCs exhibited the strongest, and PL-MSCs the weakest adipogenic potential (Fig. 4a–c).

The osteogenic culture of PL-MSCs accumulated strongly the Alizarin red-positive nodules, which confirmed the calcium accumulation (Fig. 4d–f). The percentage of nodules' occupied area in PL-MSCs cultures amounted to  $18.9 \pm 4.6$  ( $n = 10$  fields of view), which was much

higher than that in DP-MSCs and DF-MSCs cultures.

The chondrogenic differentiation potential of PL-MSCs was demonstrated after cultivation of the cells in the inductive chondrogenic cultures. Alcian blue staining of the pellet cryosections revealed that the strong positivity was located at the edges of the pellets, whereas weak positivity was observed inside the pellet cultures. DP-MSCs exhibited the strongest, and PL-MSCs the weakest chondrogenic potential (Fig. 4g–i). All control cultures were negative (data not shown).

Next, we evaluated the differentiation potential of PL-MSCs *in vivo*, following approach described by Stevens et al. (2008). After 18 days following implantation in 1-day-old BALB/c mice, implanted PL-MSCs were shown to induce granulomatous tissue formation characteristic for xenotransplant rejection reaction. The implants were enclosed in a fibrous capsule of collagen-rich connective tissue, as detected by Masson trichrome staining (Figure S1a). The cellular infiltrate was predominantly composed of macrophages, giant cells, and other inflammatory cells (Figure S1b–c). In the centre, which was predominantly composed of death cells, no sign of differentiated structure was observed.

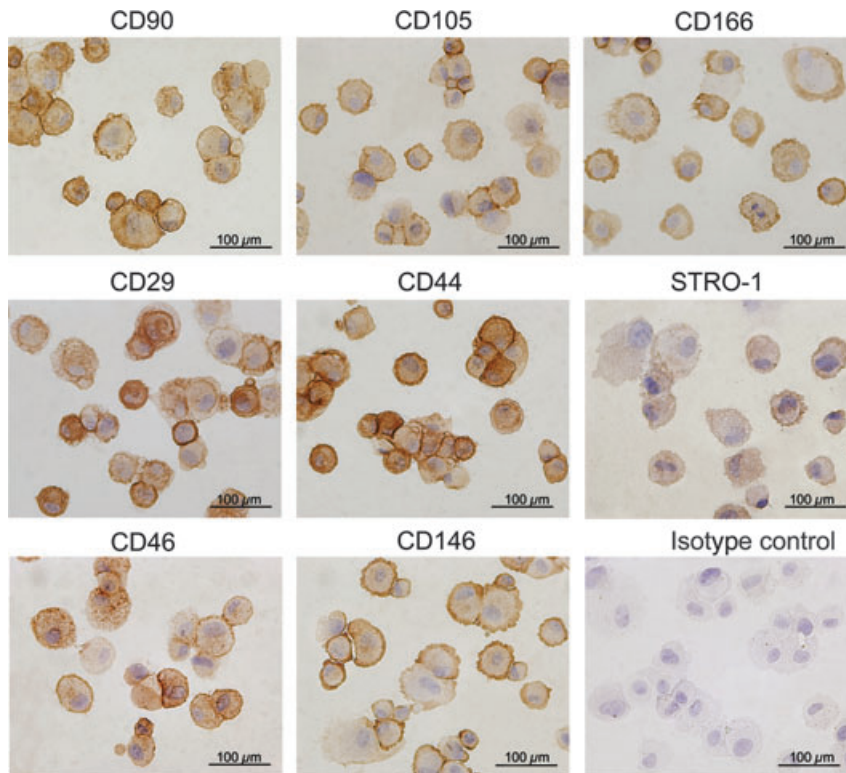
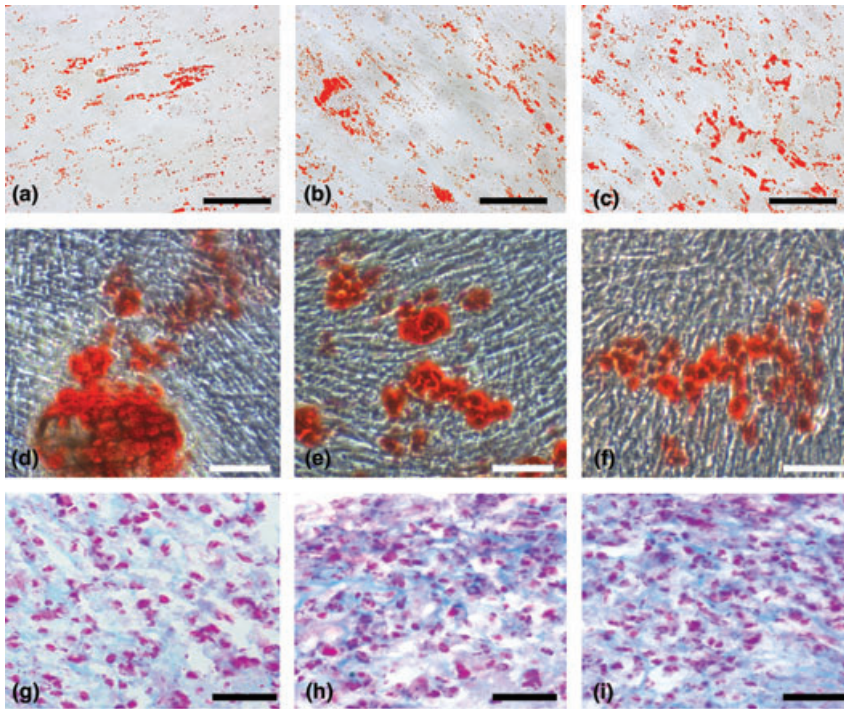


Fig. 3. Phenotypic properties of periapical lesion (PL)-mesenchymal stem cells (MSCs) - immunocytochemistry. PL-MSCs harvested in passage 3 were prepared as cytopins ( $1 \times 10^4$  cells/sample), fixed in 2% paraformaldehyde, washed in PBS, and the endogenous peroxidase activity was blocked with 0.5%  $H_2O_2$ . The primary mAbs were detected, as described in Material and Methods. The percentage of positive cells for the indicated molecules was determined by analysing at least 300 cells in different fields of view. A representative experiment is shown, out of three with similar results.

#### Effect of PL-MSCs on proliferation and cytokines' production by PB-MNCs

One of the important properties of MSCs is their ability to suppress the proliferation of lymphocytes induced by a mitogen (Klyushnenkova et al. 2005). Previously, we evaluated the immunomodulatory properties of DP-MSCs and DF-MSCs (Tomic et al. 2011). Here we investigated the effect of PL-MSCs on the proliferation and cytokines' production by PB-MNCs, either unstimulated or stimulated with PHA ( $30 \mu\text{g/ml}$ ). The proliferation of PL-MSCs in the cultures was inhibited by the pre-treatment with mitomycin C (Fig. 5a). We found that PL-MSCs had no significant effect on the proliferation of unstimulated PB-MNCs. On the other hand, we found that the PL-MSCs from each donor suppressed the proliferation of PB-MNCs induced by PHA up to 40% ( $31.2 \pm 7.3\%$ ).



**Fig. 4.** Multi-potent differentiation potential of periapical lesion (PL)-mesenchymal stem cells (MSCs), dental pulp (DP-MSCs) and DF-MSCs. The cells from passage 5 were cultivated in control or inductive differentiation conditions, as described. Oil red staining of (a) PL-MSCs, (b) DP-MSCs and (c) DF-MSCs after the adipogenic differentiation is shown. The scale bar represents 25  $\mu\text{m}$ . Alizarin Red staining of (d) PL-MSCs, (e) DP-MSCs and (f) DF-MSCs after the osteogenic differentiation is shown. The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$ . Alcian blue/nuclei red staining of (g) PL-MSCs, (h) DP-MSCs and (i) DF-MSCs is shown. The scale bar represents 25  $\mu\text{m}$ .

The lower proliferation of PB-MNCs in presence of PL-MSCs correlated with the lower production of IL-2 in these co-cultures (Fig. 5b). To evaluate the effect of PL-MSCs on the Th development, we analysed the hallmark cytokines produced in these co-cultures. We found that both IFN- $\gamma$  and IL-5 production were inhibited in the presence of PL-MSCs, whereas the production of IL-17 and IL-10 was not changed significantly. Additionally, we found that the production TGF- $\beta$  increased significantly compared to control PB-MNCs.

#### **Effect of PL-MSCs on cytokines production by PL-ICs**

Considering previous results, we investigated the effects of PL-MSCs on the production of pro-inflammatory cytokines by PL-ICs. In the co-culture experiments, PL-ICs and PL-MSCs were cultivated either alone or together for 24 h in presence of PMA/ $\text{Ca}^{2+}$  ionophore, an additional stimulus for the cytokine production.

The Table 1a shows that PL-ICs produced IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ , whereas PL-MSCs produced IL-6, IL-8, and low amounts of IL-1 $\beta$ . The levels of all tested cytokines in PL-ICs/PL-MSCs co-cultures were significantly lower, compared to the sum of cytokines from individual PL-ICs and PL-MSCs cultures (Table 1a).

To evaluate whether a direct cell-to-cell contact was necessary for the observed effect, we performed the Transwell system experiments (Table 1b). The results showed that PL-ICs pre-cultivated with PL-MSCs without direct contact produced a significantly lower quantity of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to the control PL-ICs. However, the production of IL-8 was not modulated significantly.

#### **Discussion**

Here we showed that PL-MSCs, isolated by plastic adherence, possess typical fibroblasts' morphology, clonogenic ability and a fast proliferation rate. The proliferation rate of

PL-MSCs, although somewhat lower than that of dental MSCs isolated from healthy tooth, is still higher than that described for bone marrow-derived MSCs (Kim et al. 2009, Tomic et al. 2011). This is probably the most significant advantage of dental MSCs over BM-MSCs when potential stem cell therapy is considered. The phenotype of PL-MSCs was also in accordance with other findings (Park et al. 2011), and some phenotypical specificities, such as higher expression of CD44 by PL-MSCs, could be due to the inflammatory origin of these cells (Kollar et al. 2009). We found that STRO-1, today's best-known marker for MSCs (Lin et al. 2011), and CD46 molecule were localised predominantly intracellularly. Additionally, we showed that PL-MSCs expressed brightly the CD146 molecule, which is considered as a good marker for a high self-renewal, high-differentiation capacity cell population in bone marrow (Sacchetti et al. 2007). These results suggest that several methods should be used to assess the phenotype of MSCs. Similar to the other findings on MSCs isolated from inflamed PDL (Chen et al. 2006, Park et al. 2011) and DP tissue (Alongi et al. 2010), PL-MSCs were shown to possess both the osteogenic and adipogenic differentiation potential in vitro. Additionally, we showed that the PL-MSCs could differentiate into chondrocyte-like, collagen-producing cells as well, and this property has not been described previously. Compared to dental MSCs from healthy tooth, PL-MSCs were shown to possess the strongest osteogenic potential. In line with our previous findings (Tomic et al. 2011), DF-MSCs exhibited the strongest adipogenic differentiation, whereas DP-MSCs showed the strongest chondrogenic potential. These results could be important in selecting the most suitable MSCs source for a specific cell-based therapy of damaged tissues.

Although PL-MSCs were able to differentiate in vitro, no signs of differentiated structure could be seen in vivo, probably due to xenogenic transplant reaction. Studies on human BM-MSCs (Grinnemo et al. 2004) and ADPCs (Niemeyer et al. 2008) showed that these cells can induce similar immunologic reactions when transplanted into immunocom-



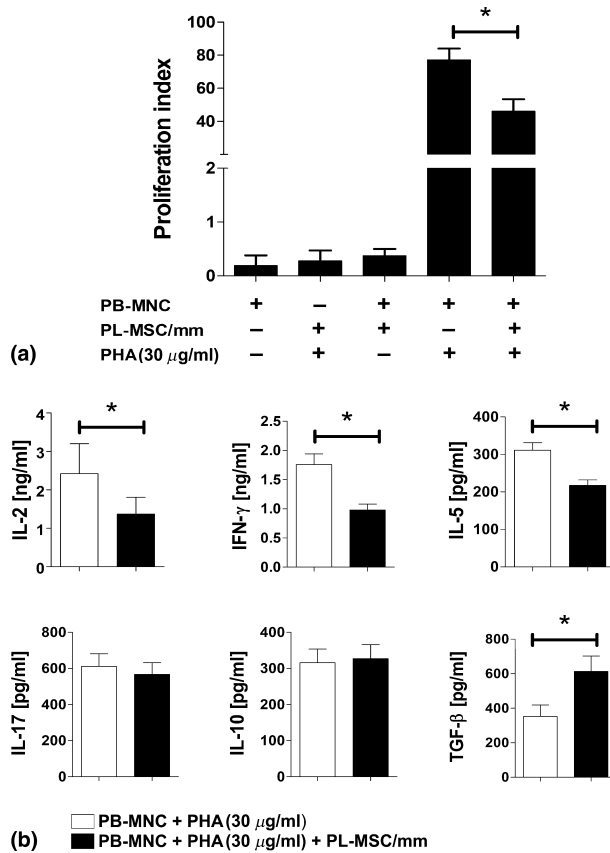


Fig. 5. Effect of periapical lesion (PL)-mesenchymal stem cells (MSCs) on proliferation and production of cytokines by Peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs). PL-MSCs, pre-treated with mitomycin (mm), were cultivated for 3 days with PB-MNCs, which were either untreated or treated with PHA (30 µg/ml). Control PB-MNCs were cultivated without PL-MSCs. The results on (a) proliferation of PB-MNCs (expressed as mean  $\pm$  SD of 4 experiments; each done in sixplices) and (b) production of cytokines (expressed as mean  $\pm$  SD of 3 experiments; each done in duplicates) are presented. \* $p < 0.05$  compared control (Kruskal-Wallis's test).

petent rodents. This is in line with our previous findings on DP-MSCs and DF-MSCs (Tomic et al. 2011). Therefore, differentiation potential of PL-MSCs should be explored further in immunodeficient animal model studies.

The usage of MSCs as cell based therapeutics is strengthened by the fact that MSCs appear to escape immune surveillance due to their low expression of MHC class II molecules (Chamberlain et al. 2007). In line with this, MSCs have been reported to exhibit low immunogenicity when cultured with allogenic PB-MNCs (Potian et al. 2003, Klyushnenkova et al. 2005). However, up to now, it was not known whether MSCs from inflamed tissues increase their immunogenicity or not, bearing in mind that pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ,

which are present in PL, can lead to the up-regulation of MHC class II expression by MSCs and, consequently, to increase the proliferation of PB-MNCs in culture (Prasanna et al. 2010). Here, we showed that PL-MSCs do not express MHC class II, at least from the third passage onwards. Additionally, these cells did not induce the proliferation of PB-MNCs in the co-culture, suggesting that PL-MSCs maintain their low immunogenicity even upon contact with PB-MNCs. These findings are very important if PL-MSCs are to be considered for potential cell-based therapies.

Except for their substantial differentiation capacity and low immunogenicity, it was demonstrated that different MSCs have profound anti-proliferative and anti-inflammatory effects (Nauta & Fibbe 2007). Recent

reports suggested that human dental MSCs (Wada et al. 2009, Zhang et al. 2009, Tomic et al. 2011) can suppress mitogen- or allogenic-stimulated proliferation of PB-MNCs or T cells in vitro. Here we showed, for the first time, that PL-MSCs also exhibit suppressive effects on PHA-induced proliferation of PB-MNCs, as well as the production of IL-2, a growth promoting factor for lymphocytes (Malek 2008). However, different papers (Ryan et al. 2007, Opitz et al. 2009), including our own work on dental MSCs (Tomic et al. 2011), indicate that the anti-proliferative effect of healthy-tissue MSCs needs to be induced by appropriate priming with cytokines or TLR agonists. PL-MSCs, on the other hand, do not require such priming, since they exhibit up to 40% inhibition of proliferation without any pre-treatment, other than in vitro conditions themselves. In contrast to other findings (Prasanna et al. 2010), we showed that PL-MSCs do not require intact cellular proliferation to exhibit their anti-proliferative effect. The anti-proliferative effect is most probably a result of increased production of TGF- $\beta$  in the co-culture with PL-MSCs. In support of this, it was shown that TGF- $\beta$  inhibit T cell proliferation by suppressing IL-2 production (Brabletz et al. 1993) and cell-cycle proteins (Hannon & Beach 1994, Wolfrum et al. 2004). Additionally, TGF- $\beta$  is shown to inhibit both Th1 and Th2 differentiation, and to stimulate the expression of ROR $\gamma$ t and FoxP3, the master regulators of Th17 and Treg cells, respectively (Yoshimura et al. 2010), which is in line with our findings.

Considering that TGF- $\beta$  is important for down-regulation of inflammatory responses (Danin et al. 2000, Colic et al. 2009c), including its significance for Treg development within the PL (Colic et al. 2009b), we examined the effect of PL-MSCs on the production of bone proresorptive cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) (Pacifci et al. 1987, Thomson et al. 1987, Carty & Laliberte 1989), as well as the neutrophils recruiting chemokine (IL-8) (Wuyts et al. 1998) by PL-ICs. The use of PMA/Ca<sup>2+</sup> ionophore for the treatment of our cultures is a common approach to enhance cytokines' production in vitro (Collins 2000). Sumanasinghe

Table 1. Anti-inflammatory properties of PL-MSCs

a) Separate cultures				
Cytokines	PL-ICs (pg/ml)	PL-MSCs (pg/ml)	PL-ICs + PL-MSCs (pg/ml)	PL-ICs/PL-MSCs co-culture (pg/ml)
IL-1 $\beta$	1274 $\pm$ 312	214 $\pm$ 28	1492 $\pm$ 288	928 $\pm$ 146 <sup>▲</sup>
IL-6	2940 $\pm$ 610	1600 $\pm$ 129	4446 $\pm$ 501	3850 $\pm$ 544 <sup>▲</sup>
IL-8	4870 $\pm$ 1140	821 $\pm$ 104	5687 $\pm$ 951	3071 $\pm$ 566 <sup>▲</sup>
TNF- $\alpha$	1056 $\pm$ 214	49 $\pm$ 16	1138 $\pm$ 199	667 $\pm$ 98 <sup>▲</sup>
b) Transwell co-cultures				
Cytokines	PL-ICs – Control culture (pg/ml)		PL-ICs – Experimental culture (pg/ml)	
IL-1 $\beta$	924 $\pm$ 126		490 $\pm$ 91*	
IL-6	3864 $\pm$ 711		2208 $\pm$ 388 *	
IL-8	3772 $\pm$ 682		3516 $\pm$ 911	
TNF- $\alpha$	910 $\pm$ 94		671 $\pm$ 141*	

PL-MSCs from two different donors were co-cultivated with 5 different allogenic PL-ICs for 24 h in: (a) Direct co-culture system using 1/10 PL-MSCs/PL-ICs cell ratio, as described. The production of cytokines was stimulated with PMA (20 ng/mL) and Ca<sup>2+</sup> ionophore (1  $\mu$ M). PL-ICs and PL-MSCs cultivated separately and treated the same way served as controls. Total number of cultures was 5. The levels of cytokines produced in the PL-MSCs/PL-ICs co-cultures were compared with the sum of produced cytokines in the separate control cultures. Values are given as mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) done with different PL-MSC/PL-ICs pairs. <sup>▲</sup> $p < 0.05$  compared to the sum (PL-ICs + PL-MSCs) (Mann-Whitney's tests); (b) Transwell system experiments were performed as described in Material and Methods. After collection of supernatants and removal of PL-MSCs, PL-ICs (experimental and control cultures) were washed and treated with PMA/Ca<sup>2+</sup> ionophore for an additional 24 h to measure cytokines' production. PL-ICs cultivated in the same way, but without PL-MSCs, served as controls. The results are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) done with different PL-MSC/PL-ICs pairs. \* $p < 0.05$  compared to control PL-ICs culture (Mann-Whitney's tests).

et al. (2009) showed that human BM-MSCs do not produce high levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , in contrast to IL-6 and IL-8, which is in line with our results on PL-MSCs. By measuring the levels of the inflammatory cytokines in PL-ICs/PL-MSCs co-cultures, which are significantly lower than the sum of the cytokines produced in separate cultures, we postulated that PL-MSCs possess anti-inflammatory effects. However, using the direct co-culture system, one cannot exclude that PL-ICs also influenced the cytokine production by PL-MSCs. To confirm the hypothesis on the anti-inflammatory properties of PL-MSCs, we used a transwell system. This method confirmed that PL-MSCs inhibited the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , but not IL-8, by PL-ICs via soluble mediators. These results also suggest that direct cell-to-cell contact, but not soluble factors, mediate the down-regulation of IL-8 production by PL-MSCs. In line with this, Beech et al. (2006) showed that the stimulation of IL-8 by monocytes can be reduced significantly if the monocytes and T cells are separated

physically by a porous membrane insert. However, the significance and mechanism of this phenomenon remain to be investigated further.

In conclusion, our results show that human PL-MSCs possess typical MSCs properties, including a fast proliferation rate, clonogenic ability, multi-lineage differentiation potential in vitro and, of substantial significance, the anti-proliferative and anti-inflammatory properties. These characteristics could make PL-MSCs useful in the treatment of periodontal diseases or other chronic inflammatory processes followed by tissue destruction.

#### Acknowledgements

The authors thank S. Vasilijić, T. Džopalić, A. Dragičević, and M. Jović for their helpful assistance during the experiments, and D. Gazivoda for supplying the apical periodontal material.

#### References

Alongi, D. J., Yamaza, T., Song, Y., Fouad, A. F., Romberg, E. E., Shi, S., Tuan, R. S. & Huang,

- G. T. (2010) Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative Medicine* **5**, 617–631.
- Beech, J. T., Andreacos, E., Ciesielski, C. J., Green, P., Foxwell, B. M. & Brennan, F. M. (2006) T-cell contact-dependent regulation of CC and CXC chemokine production in monocytes through differential involvement of NF $\kappa$ B: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* **8**, R168.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. & Robey, P. G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* **19**, 180–192.
- Brabletz, T., Pfeuffer, I., Schorr, E., Siebelt, F., Wirth, T. & Serfling, E. (1993) Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 1155–1162.
- Carty, T. J. & Laliberte, R. E. (1989) Meeting report. The biochemistry and pharmacology of interleukins-1 and -6. *Agents and Actions* **26**, 391–393.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–2749.
- Chen, S. C., Marino, V., Gronthos, S. & Bartold, P. M. (2006) Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *Journal of Periodontal Research* **41**, 547–553.
- Colic, M., Gazivoda, D., Majstorovic, I., Dragičević, A., Vasilijić, S., Rudolf, R., Milosavljević, P. & Vucević, D. (2009a) Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *Journal of Dental Research* **88**, 1142–1147.
- Colic, M., Gazivoda, D., Vucević, D., Majstorovic, I., Vasilijić, S., Rudolf, R., Brkic, Z. & Milosavljević, P. (2009b) Regulatory T-cells in periapical lesions. *Journal of Dental Research* **88**, 997–1002.
- Colic, M., Gazivoda, D., Vucević, D., Vasilijić, S., Rudolf, R. & Lukic, A. (2009c) Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology* **47**, 101–113.
- Colic, M., Lukic, A., Vucević, D., Milosavljević, P., Majstorovic, I., Marjanovic, M. & Dimitrijević, J. (2006) Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Archives of Oral Biology* **51**, 1120–1130.
- Collins, D. P. (2000) Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. *Journal of Immunological Methods* **243**, 125–145.
- Danin, J., Linder, L. E., Lundqvist, G. & Andersson, L. (2000) Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **90**, 514–517.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317.
- Fukada, S. Y., Silva, T. A., Garlet, G. P., Rosa, A. L., da Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2009) Factors involved in the T helper type 1 and

- type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 25–31.
- Gazivoda, D., Dzopalic, T., Bozic, B., Tatomirotic, Z., Brkic, Z. & Colic, M. (2009) Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **38**, 605–611.
- Grinnemo, K. H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tamnik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C. & Le Blanc, K. (2004) Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **127**, 1293–1300.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 13625–13630.
- Hannon, G. J. & Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257–261.
- Huang, G. T., Gronthos, S. & Shi, S. (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research* **88**, 792–806.
- Kim, S. S., Song, C. K., Shon, S. K., Lee, K. Y., Kim, C. H., Lee, M. J. & Wang, L. (2009) Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell and Tissue Research* **336**, 59–66.
- Klyushnchenkova, E., Mosca, J. D., Zernetkina, V., Majumdar, M. K., Beggs, K. J., Simonetti, D. W., Deans, R. J. & McIntosh, K. R. (2005) T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of Biomedical Science* **12**, 47–57.
- Kollar, K., Cook, M. M., Atkinson, K. & Brooke, G. (2009) Molecular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Migration to the Site of Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Cell Biology* **2009**, 1–8.
- Lin, G., Liu, G., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Lue, T. F. & Lin, C. S. (2011) Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells and Development* **20**, 1747–1752.
- Malek, T. R. (2008) The Biology of Interleukin-2. *Ann Rev Immunol* **26**, 453–479.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. & Shi, S. (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**, 5807–5812.
- Morsczeck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C., Sippel, C. & Hoffmann, K. H. (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology* **24**, 155–165.
- Nair, P. N. R. (1997) Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* **2000** **13**, 121–148.
- Nair, P. N. R. (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **15**, 348–381.
- Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–3506.
- Niemeyer, P., Vohrer, J., Schmal, H., Kasten, P., Fellenberg, J., Suedkamp, N. P. & Mehlhorn, A. T. (2008) Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy* **10**, 784–795.
- Opitz, C. A., Litzemberger, U. M., Lutz, C., Lanz, T. V., Tritschler, I., Koppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W. K., Weller, M., Wick, W. & Platten, M. (2009) Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon- $\beta$  and protein kinase R. *Stem Cells* **27**, 909–919.
- Pacifici, R., Rifas, L., Teitelbaum, S., Slatopolsky, E., McCracken, R., Bergfeld, M., Lee, W., Avoli, L. V. & Peck, W. A. (1987) Spontaneous release of interleukin 1 from human blood monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**, 4616–4620.
- Parekkadan, B. & Milwid, J. M. (2010) Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering* **12**, 87–117.
- Park, J. C., Kim, J. M., Jung, I. H., Kim, J. C., Choi, S. H., Cho, K. S. & Kim, C. S. (2011) Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 721–731.
- Pochampally, R. (2008) Colony forming unit assays for MSCs. *Methods in Molecular Biology* **449**, 83–91.
- Potian, J. A., Aviv, H., Ponzio, N. M., Harrison, J. S. & Rameshwar, P. (2003) Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *Journal of Immunology* **171**, 3426–3434.
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R. & Vasandan, A. B. (2010) Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**, e9016.
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. & Mahon, B. P. (2007) Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology* **149**, 353–363.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M. & Bianco, P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324–336.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149–155.
- Silva, T. A., Garlet, G. P., Lara, V. S., Martins, W. Jr, Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2005) Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **20**, 310–316.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S. & Huang, G. T. (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics* **34**, 166–171.
- Stashenko, P., Yu, S. M. & Wang, C. Y. (1992) Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *Journal of Endodontics* **18**, 422–426.
- Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., Formstecher, P., Bailliez, Y. & Polakowska, R. R. (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest derived melanocytes and have label-retaining and sphereforming abilities. *Stem Cells and Development* **17**, 1175–1184.
- Sumanasinghe, R., Pfeiler, T., Monteiro-Riviere, N. & Lobo, E. (2009) Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain. *Journal Cellular Physiology* **219**, 77–83.
- Thomson, B. M., Mundy, G. R. & Chambers, T. J. (1987) Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *Journal of Immunology* **138**, 775–779.
- Tomic, S., Djokic, J., Vasilijic, S., Vucevic, D., Todorovic, V., Supic, G. & Colic, M. (2011) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells and Development* **20**, 695–708.
- Wada, N., Menicanin, D., Shi, S., Bartold, P. M. & Gronthos, S. (2009) Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal Cellular Physiology* **219**, 667–676.
- Wolfrain, L. A., Walz, T. M., James, Z., Fernandez, T. & Letterio, J. J. (2004) p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF- $\beta$ -mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *Journal of Immunology* **173**, 3093–3102.
- Wuyts, A., Proost, P., Lenaerts, J. P., Ben-Baruch, A., Van Damme, J. & Wang, J. M. (1998) Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *European Journal of Biochemistry* **255**, 67–73.
- Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. & Mori, T. (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- $\beta$ . *Journal of Biochemistry* **147**, 781–792.
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y. & Le, A. D. (2009) Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *Journal of Immunology* **183**, 7787–7798.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Xenogenic transplantation of PL-MSCs. One-day-old BALB/c mice were subcutaneously injected behind the ear with  $1 \times 10^6$  of PL-MSCs. The images of samples explanted after 18 days are shown. **a)** Masson trichrom staining; **b)** and **c)** hematoxyline/eosine staining of the implants under different magnification. i- implant, m- muscle; c- fibrous

capsule; f-fibrous tissue, \*- fibroblast, & - giant cells, macrophages.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or

functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Address:  
Miodrag Čolić  
Crnotravska 17, 11002 Belgrade  
E-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

**Clinical Relevance**

*Scientific rationale for the study:* MSCs from healthy teeth are promising for regenerative medicine, but not always available for extraction. MSCs from periapical lesions (PL-MSCs), in contrast, have never been evaluated as a potential alternative, and their anti-inflammatory and immuno-

modulatory properties have not been investigated yet.  
*Principal findings:* We showed that PL-MSCs possess typical MSCs properties, multipotent differentiation potential and no immunogenicity in vitro. Moreover, PL-MSCs inhibit mitogen-induced proliferation and production of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-5 by lymphocytes, and produc-

tion of bone-proresorptive cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) by PL-inflammatory cells.  
*Practical implications:* PL-MSCs could potentially provide an alternative source of MSCs for tissue regeneration and suppression of chronic inflammation.

# Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells

Jelena Đokić<sup>1</sup>, Sergej Tomić<sup>1,2</sup>, Milan Marković<sup>2,3</sup>, Petar Milosavljević<sup>1</sup>  
and Miodrag Čolić<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

Immunoregulatory mechanisms within periapical lesions (PLs) are as of yet unexplored. Considering the crucial role of DCs in controlling the immune response within PLs, the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells (MSCs), and the colocalization of MSCs and DCs in situ, we wondered whether MSCs from PLs modulate the development and functions of DCs. Using a model of monocyte-derived DCs, we showed that PL-MSCs inhibited differentiation of DCs via soluble factors, of which IL-6 had a minor effect, but did not impair their subsequent maturation induced by pro-inflammatory cytokines. However, upon maturation such DCs favored the production of Th2/Th17 cytokines by allogenic CD4<sup>+</sup> lymphocytes in coculture, compared with mature DCs differentiated without PL-MSCs. PL-MSC-differentiated DCs, cultivated with pro-inflammatory cytokines and PL-MSCs, although phenotypically mature, exhibited poor allostimulatory activity, induced anergy, Th2 polarization, differentiation of suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup>Treg-cell subsets via IDO-1-, ILT-3-, and ILT-4-dependent mechanisms, and increased production of TGF- $\beta$  in the coculture. In contrast, DCs cultivated with PL-MSCs only during maturation stimulated proliferation and Th1 polarization of CD4<sup>+</sup> T cells in an IL-12-independent manner. In conclusion, PL-MSCs significantly modulate the development and functions of DCs, depending on the phase of DCs development during which the interaction occurs.

**Keywords:** Dendritic cells · Mesenchymal stem cells · Periapical lesions · Th polarization



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## Introduction

Periapical lesions (PLs) are a common pathology within the human population initiated by the bacterial invasion of the root canal and develop from an acute inflammatory response to the formation of granulomas or cysts infiltrated by various inflammatory cells [1].

Furthermore, cytokines produced by Th cells have been shown to play a crucial role in PLs pathogenesis. Namely, Th1- and Th17-derived cytokines promote inflammation, bone resorption, and disease progression. Th2 cells seem to be important for the later phases of PLs development, whereas IL-10 and TGF- $\beta$  produced by Treg cells seem to be important for the healing processes within PLs [2,3]. However, it is not yet clear which mediators and cells are involved crucially in the regulation of Th-cell commitment during the development, maintenance, and resolution of the disease.

**Correspondence:** Prof. Miodrag Čolić  
e-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

DCs are the key regulatory and decision-making cells with a unique ability to activate naive T cells and polarize their development. These cells can be differentiated *in vitro* from monocytes or CD34<sup>+</sup>-progenitors with GM-CSF and IL-4, generating CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> immature DCs (iDCs) [4]. Alternatively, in the absence of IL-4, GM-CSF induces the differentiation of macrophage-like cells with various morphologies and CD1a/CD14 expression [5]. DCs possess profound tolerogenic properties in both their immature and semi-mature states, which enable the induction of peripheral tolerance. In contrast, upon encountering pathogenic microorganisms or pro-inflammatory cytokines, DCs mature by expressing higher levels of MHC, costimulatory molecules, and cytokines, including IL-12, IL-23, IL-10, and IL-27 [6, 7]. This enables DCs to prime naive T cells and direct their differentiation toward different Th- and Treg-cell subsets [6].

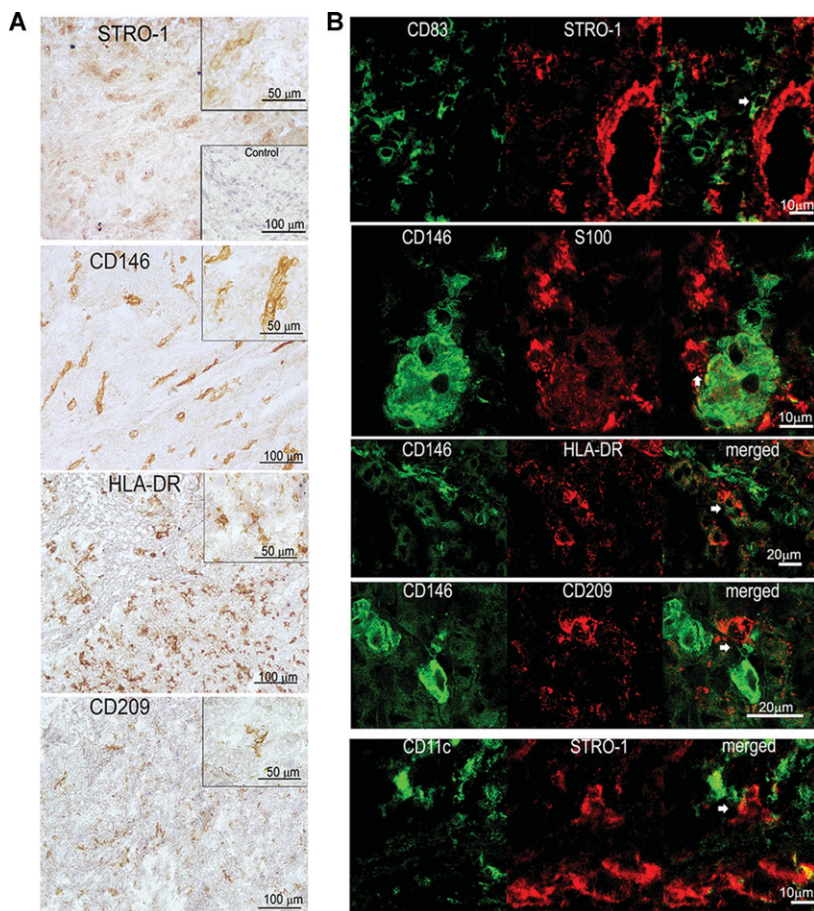
It has become clear that the mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from various tissues [8], including the dental tissues [9, 10], are able to sense and respond to events in the local environment, including the inflammation [11]. Besides their substantial capacity for differentiation, much evidence of the immunomodulatory properties of MSCs has been found, although the mechanisms remained controversial [12]. Recently, BM-MSCs have been shown to inhibit differentiation and functions of DCs [13–15].

We previously showed for the first time that MSCs isolated from a chronic granulomatous human tissue such as PLs (PL-MSCs) possess both the multilineage differentiation potential and immunosuppressive properties [16]. Additionally, we showed that the balance between the production of IL-10 by macrophages, and IL-12 by DCs, may control the inflammation in PLs [17]. Considering that during inflammation, a number of monocytes extravasate from the tissue venules, followed by their differentiation and maturation into DCs or macrophages [18], and the strategic localization of CD146<sup>+</sup>STRO-1<sup>+</sup> MSCs near the blood vessels [8, 19], we wondered whether PL-MSCs interact with DCs in PLs, and more importantly, whether and how their differentiation, maturation, and functions *in vitro* are altered by PL-MSCs.

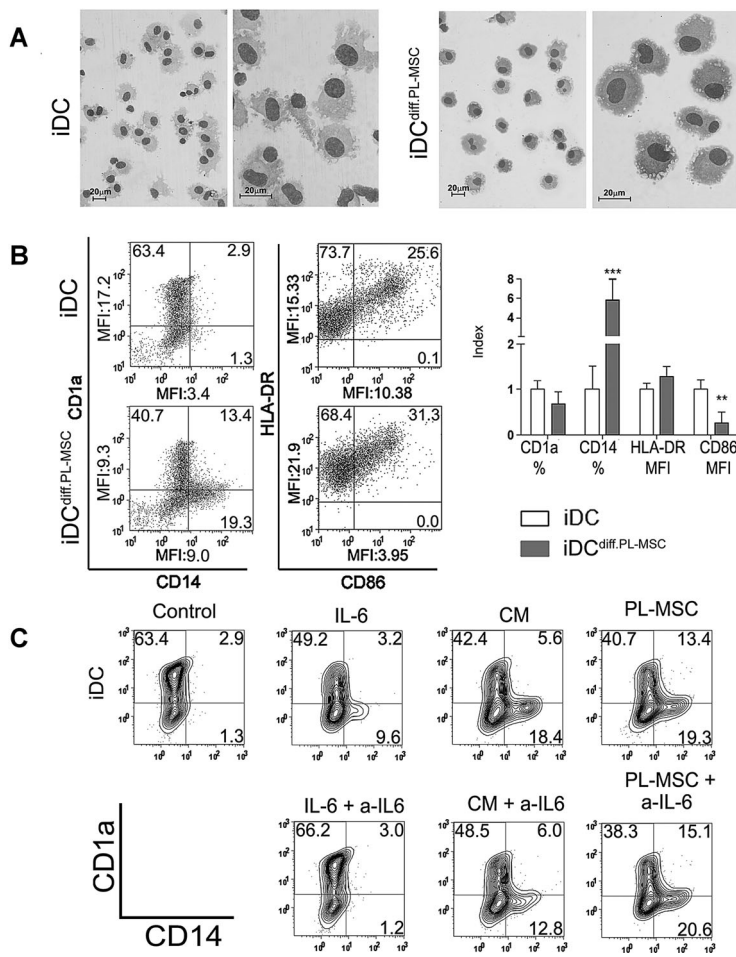
## Results

### PL-MSCs and DCs are colocalized within PLs

First, we examined whether DCs and PL-MSCs are colocalized within PLs. As markers of MSCs, we used CD146 and STRO-1, which were expressed predominantly on the endothelium of arterioles and capillaries, but also on the cells near the blood vessels (Fig. 1A). Similar distribution of CD146 and STRO-1 was observed



**Figure 1.** Tissue distribution of DCs and PL-MSCs. PL-MSCs (CD146<sup>+</sup> and STRO-1<sup>+</sup> cells) and DCs (HLA-DR<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup>, and CD11c<sup>+</sup> cells) were identified in PLs by (A) immunoperoxidase staining using the mAbs specific for the indicated molecules or isotype control Abs (inset), whereas (B) their colocalization was analyzed by confocal microscopy using the double-stained PL sections, as indicated (the white arrows indicate key interacting cells). Tissue sections shown are representative of four PL tissues analyzed.



**Figure 2.** PL-MSCs alter DCs differentiation. Monocytes were differentiated alone or with PL-MSCs into iDCs, and then (A) stained with MGG and analyzed by light microscopy, or (B) double stained on CD14/CD1a and CD86/HLA-DR and analyzed by flow cytometry (a representative PL-MSC/DCs pair is shown). Flow cytometry data from all eight PL-MSC/DCs pairs, pooled from four independent experiments, are presented as mean indices + SD calculated for each pair by dividing the experimental and control samples of the same donor. (C) The results on CD14/CD1a coexpression by iDCs differentiated with IL-6, CM, or PL-MSCs, with or without anti-IL-6 Ab, are shown. The data from one representative experiment are shown, out of two with similar results. Fluorescence Minus One (FMO) controls of the flow cytometry data are provided in Supporting Information Fig. 6A.  $p < 0.01$ ,  $***p < 0.005$  compared to control iDCs (Student's t-test).

in adipose tissue (positive control) (Supporting Information Fig. 1). PLs were characterized by a large number of HLA-DR<sup>+</sup> and CD209<sup>+</sup> cells, many of which possess dendritic morphology (Fig. 1A). We next examined whether DCs colocalize with STRO-1<sup>+</sup> and CD146<sup>+</sup> cells in situ. Confocal microscopy showed that DCs, identified by the HLA-DR, CD11c, S100, CD209, and CD83 expression, colocalize with CD146<sup>+</sup> and STRO-1<sup>+</sup> MSCs, both within the endothelium of blood vessels and their vicinity (Fig. 1B). Since such MSCs interact with both immature and mature DCs, identified as CD209<sup>+</sup> and CD83<sup>+</sup> cells in situ, respectively [20], we continued examining whether such interactions are functional, particularly regarding the effects of PL-MSCs on differentiation, maturation, and functions of DCs.

### PL-MSCs alter differentiation of monocytes toward DCs

In our previous paper, we characterized PL-MSCs in vitro, including their clonogenicity, phenotype, multilineage differentiation potential, and immunomodulatory properties [16] (Supporting Information Table 1). Here, we used two PL-MSCs lines, which differed in the expression of several MSCs markers (Supporting

Information Fig. 2), and cultivated them with MACS-sorted CD14<sup>+</sup> monocytes in the presence of GM-CSF/IL-4 (Supporting Information Figs. 3 and 4). During the coculture, some of the monocyte-derived cells adhered to the lamellipodias of much larger PL-MSCs. After the coculture, iDCs were harvested by mild repeated pipetting, and no PL-MSCs (CD146<sup>+</sup> cells) were detected upon harvesting (Supporting Information Fig. 5A and B). According to the annexin-V-FITC/PI staining, their viability was unaffected by PL-MSCs (Supporting Information Fig. 5C). Light microscopy analysis of native and May-Grünwald Giemsa (MGG)-stained iDCs showed that control iDCs acquired a bottle-like shape with many protruding processes characteristic for iDCs (Fig. 2A). In contrast, 37.1 ± 6.5% ( $n = 5$  different DC/PL-MSCs pairs, each analyzed at ten fields of view) of DCs differentiated with PL-MSCs had a macrophage-like morphology, characterized by round-shaped appearance, absence of processes, and the cytoplasm containing large vesicles.

Further, we analyzed the phenotype of iDCs (Fig. 2B), and found higher expression of CD14 and lower expression of CD86 by iDCs differentiated with PL-MSCs, compared with that of control iDCs ( $p < 0.01$ ), whereas the expression of CD1a and HLA-DR was not significantly different. Within CD14<sup>+</sup> cells, both CD1a<sup>+</sup> and CD1a<sup>-</sup> cells were identified.

To investigate whether the suppression of DCs differentiation is mediated via soluble factors produced by PL-MSCs, monocytes were differentiated in the presence of PL-MSCs-conditioning medium (CM). By analyzing the CD1a/CD14 coexpression, we found that CM suppressed the differentiation of DCs significantly, although somewhat lower than PL-MSCs in the direct coculture (Fig. 2D). Knowing that PL-MSCs produce IL-6 [16], which could potentially suppress the differentiation of DCs [21], we used a neutralizing anti-IL-6 antibody (Ab) in those cultures. The Ab completely neutralized the effect of exogenously added IL-6 at 10 ng/mL, which is higher than the level of IL-6 in CM (5.3 and 6.4 ng/mL for PL-MSC1 and PL-MSC2, respectively). However, anti-IL-6 Ab could only partially restore the differentiation of DCs cultivated in CM, and had no effect in the PL-MSC/DCs coculture. Both PL-MSCs lines had similar effects on DCs differentiation (data not shown).

### Maturation of DCs differentiated in the presence of PL-MSCs

The maturation of DCs differentiated in presence of BM-MSCs was found to be impaired [14]. To test whether this hypothesis is true for PL-MSCs, iDCs differentiated with or without PL-MSCs were treated with a pro-inflammatory cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and PGE2) for 2 days.

Expectedly, the cocktail induced a strong up-regulation of all tested markers on DCs (Fig. 3A and B). Interestingly, we found that the maturation of DCs differentiated with PL-MSCs was not impaired, but somewhat stronger compared to control mature DCs (mDCs). However, the levels of IL-10 (median (range); 43.4

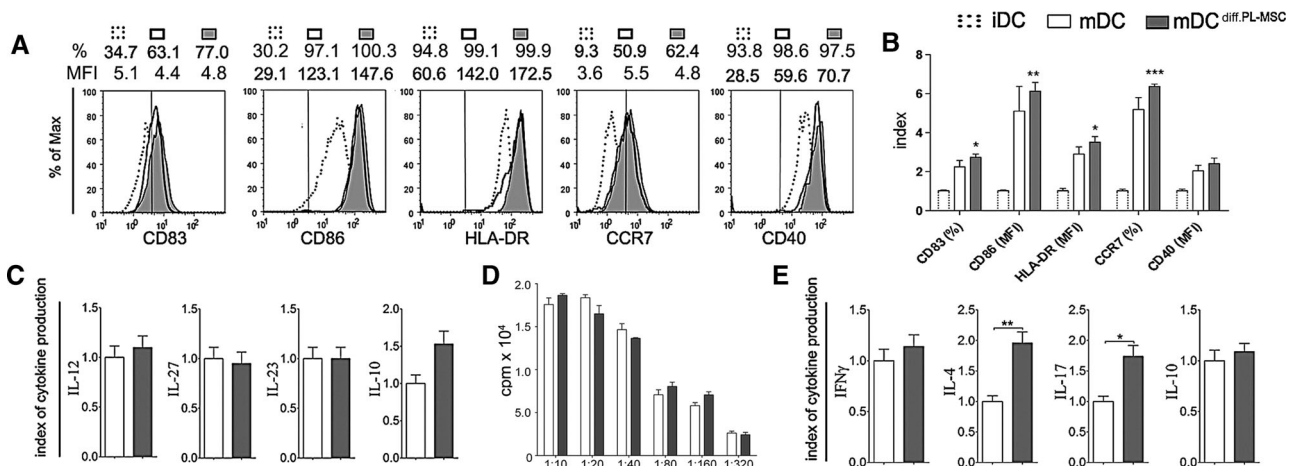
(0–442.0) pg/mL versus control 26.6 (0–276.2) pg/mL), IL-12p70 (342.9 (55.7–743.7) pg/mL versus control 295.1 (49.7–619.7) pg/mL), IL-27 (1763.5 (545.8–2224.3) pg/mL versus control 1862.9 (454.6–2003.9) pg/mL), and IL-23 (112.1 (10.9–633.2) pg/mL versus control 114.1 (32.2–455.4) pg/mL) were similar between the groups. Because of the donor-related differences, the levels of cytokines were presented as indices  $\pm$  SD ( $n = 6$  different PL-MSC/DCs pairs), compared to control (1.0) (Fig. 3C).

The allostimulatory ability of mDCs differentiated with PL-MSCs was also unimpaired, as evaluated in coculture with allogenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 3D). To observe the polarizing capacity of DCs, we measured the levels of cytokines produced in the DC/CD4<sup>+</sup> T cells cocultures with 1:10 cell-to-cell ratio, respectively. Significantly higher concentration of IL-4 (1929.2 (998.4–2530.7) pg/mL versus control 981.7 (525.6–1265.9) pg/mL) and IL-17 (663.4 (112.7–1120.4) pg/mL versus control 381.7 (59.0–727.4) pg/mL) was produced by CD4<sup>+</sup> T cells cocultivated with mDCs differentiated with PL-MSCs, compared with that of the control (Fig. 3E).

### Maturation of DCs in the presence of PL-MSCs promotes their pro-inflammatory properties

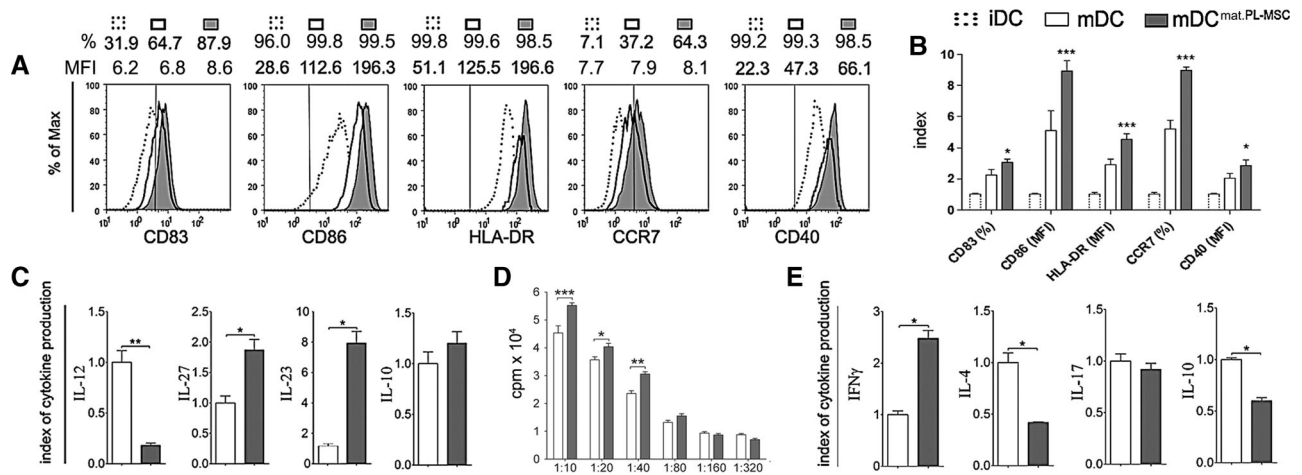
When the differentiation of DCs is completed, MSCs were shown to have a small or no effect on the maturation of DCs [13, 15]. To test whether this is true for PL-MSCs, we matured already differentiated iDCs with the cocktail, either in the presence or absence of PL-MSCs.

DCs matured in the presence of PL-MSCs expressed higher levels of CD83, CCR7, HLA-DR, CD86, and CD40 compared to



**Figure 3.** Maturation of DCs differentiated in the presence of PL-MSCs. iDCs differentiated with or without PL-MSCs were matured without PL-MSCs in the presence of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and PGE2 (mDCs<sup>diff.PL-MSCs</sup> or control mDCs, respectively), and then analyzed. (A) Flow cytometry analysis of DCs phenotype is shown from one representative PL-MSC/DCs pair and (B) data from six PL-MSC/DCs pairs are shown as mean  $\pm$  SD. Control iDCs shown here were additionally cultivated for 2 days without the pro-inflammatory cocktail. Isotype controls are provided in Supporting Information Fig. 6B. (C) Production of cytokines by mDCs<sup>diff.PL-MSCs</sup> and mDCs is presented as mean  $\pm$  SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. (D) Allostimulatory potential was assessed by cocultivating  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T cells with different numbers of DCs (from  $1 \times 10^4$  to  $0.031 \times 10^4$ /well). Data are shown as mean cpm  $\pm$  SD of six replicates and are representative of six PL-MSC/DCs pairs studied. (E) The cytokine profile was assessed from DC/CD4<sup>+</sup> T cells cocultures treated with PMA/A23187, and presented as mean  $\pm$  SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. The indices were calculated for each pair by dividing the experimental and control samples of the same donor. The data shown as mean  $\pm$  SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs are pooled from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  compared with control (Student's *t*-test).





**Figure 4.** Pro-inflammatory properties of DCs matured in the presence of PL-MSCs. Control iDCs were matured with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and PGE<sub>2</sub>, in the presence or absence of PL-MSCs (mDCs<sup>mat.PL-MSCs</sup> and mDCs, respectively), and then analyzed. (A) Flow cytometry analysis of DCs phenotype is shown from one representative PL-MSC/DCs pair and (B) data from six PL-MSC/DCs pairs are shown as mean + SD. Control iDCs shown here were additionally cultivated for 2 days without the pro-inflammatory cocktail. Isotype controls are provided in Supporting Information Fig. 6B. (C) Production of cytokines by mDCs<sup>diff.PL-MSCs</sup> and mDCs is presented as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. (D) Allostimulatory potential was assessed by cocultivating  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T cells with different numbers of DCs (from  $1 \times 10^4$  to  $0.031 \times 10^4$ /well). Data are shown as mean cpm + SD of six replicates and are representative of six PL-MSC/DCs pairs studied. (E) The cytokine profile was assessed from DC/CD4<sup>+</sup> T cells cocultures treated with PMA/A23187, and presented as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. The indices were calculated for each pair by dividing the experimental and control samples of the same donor. The data shown as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs are pooled from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  compared with control (Student's *t*-test).

control (Fig. 4A and B). Additionally, such DCs produced significantly more IL-27 (3358.8 (863.7–4853.6) pg/mL versus control 1862.9 (454.6–2003.9) pg/mL) and IL-23 (890.3 (231.8–3644.0) pg/mL versus control 114.1 (32.2–455.4) pg/mL), although the levels of IL-12 (53.7 (0–108.7) pg/mL versus control 295.1 (49.7–619.7) pg/mL) were reduced significantly (Fig. 4C).

Interestingly, we found that the pro-inflammatory cocktail stimulated the production of IL-27 by control PL-MSCs ( $296.2 \pm 41.0$  pg/mL versus control  $70.3 \pm 25.4$  pg/mL), whereas other cytokines produced by PL-MSCs were near the detection limit (Supporting Information Fig. 7).

DCs matured with PL-MSCs possessed significantly stronger allostimulatory potential in the coculture with CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 4D). In spite of reduced IL-12 production, DCs matured with PL-MSCs induced a strong Th1-cell response in the coculture, as judged by the significantly higher level of IFN- $\gamma$  (32 422.1 (9557.8–56 355.4) pg/mL versus control 13 081.7 (5030.3–26 343.5) pg/mL), and lower levels of IL-10 (328.2 (0–402.3) pg/mL versus control 543.9 (92.2–724.2) pg/mL) and IL-4 (407.8 (51.1–527.1) pg/mL versus control 981.7 (525.6–1265.9) pg/mL) produced by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 4E).

### DCs differentiated and matured with PL-MSCs possess pro-tolerogenic properties

Considering the previous results, we wondered whether DCs both differentiated and subsequently matured with PL-MSCs (PL-MSC-developed DCs) possess exaggerated pro-inflammatory properties. We found that such DCs had higher expression of all maturation

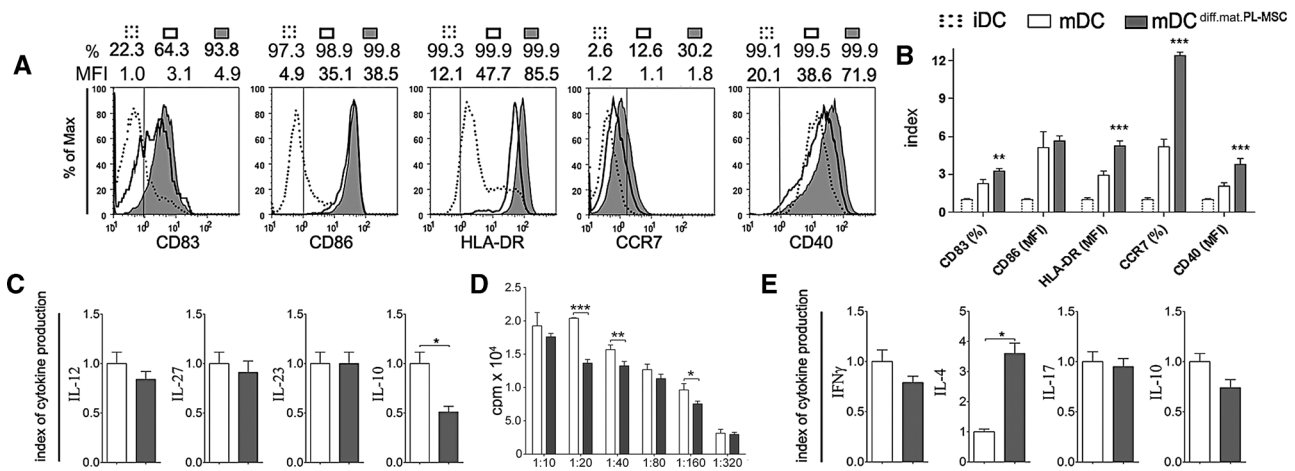
markers, except CD86 (Fig. 5A and B), produced lower amounts of IL-10, whereas no difference in the production of IL-12 family of cytokines was noticed (Fig. 5C).

In spite of these properties, PL-MSC-developed DCs were shown to be poor stimulators of allogenic CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation (Fig. 5D). Regarding the Th-cell responses, the levels of IL-4 in supernatants of experimental cocultures were significantly higher compared with those in control cocultures. Decrease in the levels of IL-10 and IFN- $\gamma$  was not statistically significant (Fig. 5E).

LPS is a common maturation agent in MSC/DC studies [15,21], so we investigated whether some of these effects apply only for the pro-inflammatory cocktail. We found that LPS had a lower ability to induce the phenotypic maturation of DCs, and it could not overcome the down-regulation of CD83, CCR7, and HLA-DR expression by PL-MSC-developed mDCs (Supporting Information Fig. 8). Similar to the cocktail, LPS could not restore the allostimulatory capacity of such DCs.

### PL-MSC-developed DCs induce anergy and functional Treg-cell subsets via IDO-1, ILT-3, and ILT-4

To evaluate why PL-MSC-developed DCs possess lower allostimulatory ability and Th2 polarization, in spite of their phenotypic maturation, we studied the expression of coinhibitory molecules (IDO-1, ILT-3, and ILT-4) characteristic for tolerogenic DCs [22,23]. The pro-inflammatory cocktail reduced the expression of IDO-1 and ILT-3, and increased the expression of ILT-4 by control mDCs (Fig. 6A). Intriguingly, we found that PL-MSC-developed DCs expressed 7.3- to 12.5-fold more IDO-1, 64.4- to



**Figure 5.** Pro-tolerogenic properties of DCs differentiated and matured with PL-MSCs. iDCs differentiated with PL-MSCs were matured with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and PGE2 in the presence of PL-MSCs (mDCs<sub>diff.mat.PL-MSCs</sub>), whereas control mDCs were cultivated without PL-MSCs, followed by their analysis. (A) Flow cytometry analysis of DCs phenotype is shown from one representative PL-MSC/DCs pair and (B) data from six PL-MSC/DCs pairs are shown as mean + SD. Control iDCs shown here were additionally cultivated for 2 days without the pro-inflammatory cocktail. Isotype controls are provided in Supporting Information Fig. 6B. (C) Production of cytokines by mDCs<sub>diff.PL-MSCs</sub> and mDCs is presented as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. (D) Allostimulatory potential was assessed by cocultivating  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T cells with different numbers of DCs (from  $1 \times 10^4$  to  $0.031 \times 10^4$ /well). Data are shown as mean cpm + SD of six replicates and are representative of six PL-MSC/DCs pairs studied. (E) The cytokine profile was assessed from DC/CD4<sup>+</sup> T cells cocultures treated with PMA/A23187, and presented as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs. The indices were calculated for each pair by dividing the experimental and control samples of the same donor. The data shown as mean + SD of  $n = 6$  PL-MSC/DCs pairs are pooled from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  compared with control (Student's *t*-test).

87.3-fold more ILT-3, and 1.3- to 1.9-fold more ILT-4 ( $n = 7$  PL-MSC/DCs pairs), compared to control mDCs (Fig. 6A).

Important function of the coinhibitory molecules expressed by tolerogenic DCs is the induction of anergy and tolerogenicity [24]. Therefore, we measured the anergy of CD4<sup>+</sup> T cells that were primed with PL-MSC-developed DCs or control mDCs, and treated with IL-2, upon restimulation with the control mDCs (secondary MLR). As shown in Figure 6B, CD4<sup>+</sup> T cells primed with PL-MSC-developed DCs were shown hyporesponsive to restimulation. Additionally, in the experimental cocultures, we observed significantly higher levels TGF- $\beta$  (801.9 (254.8–2044.7) pg/mL versus control 186.1 (0–533.9) pg/mL) and IL-4 (924.1 (115.4–1566.1) pg/mL versus control 22.8 (0–647.6) pg/mL), and no differences in the production of IL-10 (352.5 (0–1205.4) pg/mL versus control 278.1 (0–991.4) pg/mL) (Fig. 6C). The two PL-MSCs lines had similar effects on these DCs properties (Fig. 6A–C).

The induction of anergy is one of the crucial mechanisms by which Treg cells regulate immune responses [25]. Therefore, we studied whether the priming of CD4<sup>+</sup> T cells by PL-MSC-developed DCs actually induced Treg cells, based on the expression of CD4, CD25, Foxp3, and a recently identified marker, CD39 [26, 27]. The findings suggested that PL-MSC-developed DCs induced significantly higher percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> cells, compared to control mDCs (Fig. 6D). Interestingly, we found that 75% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> cells did not express Foxp3, but all of them expressed IL-10 intracellularly, pointing to their Type 1 regulatory (Tr1) like phenotype [28, 29]. Since the total number of CD4<sup>+</sup> T cells did not differ significantly between the groups (data not shown), one can conclude that the total number of Treg-cell sub-

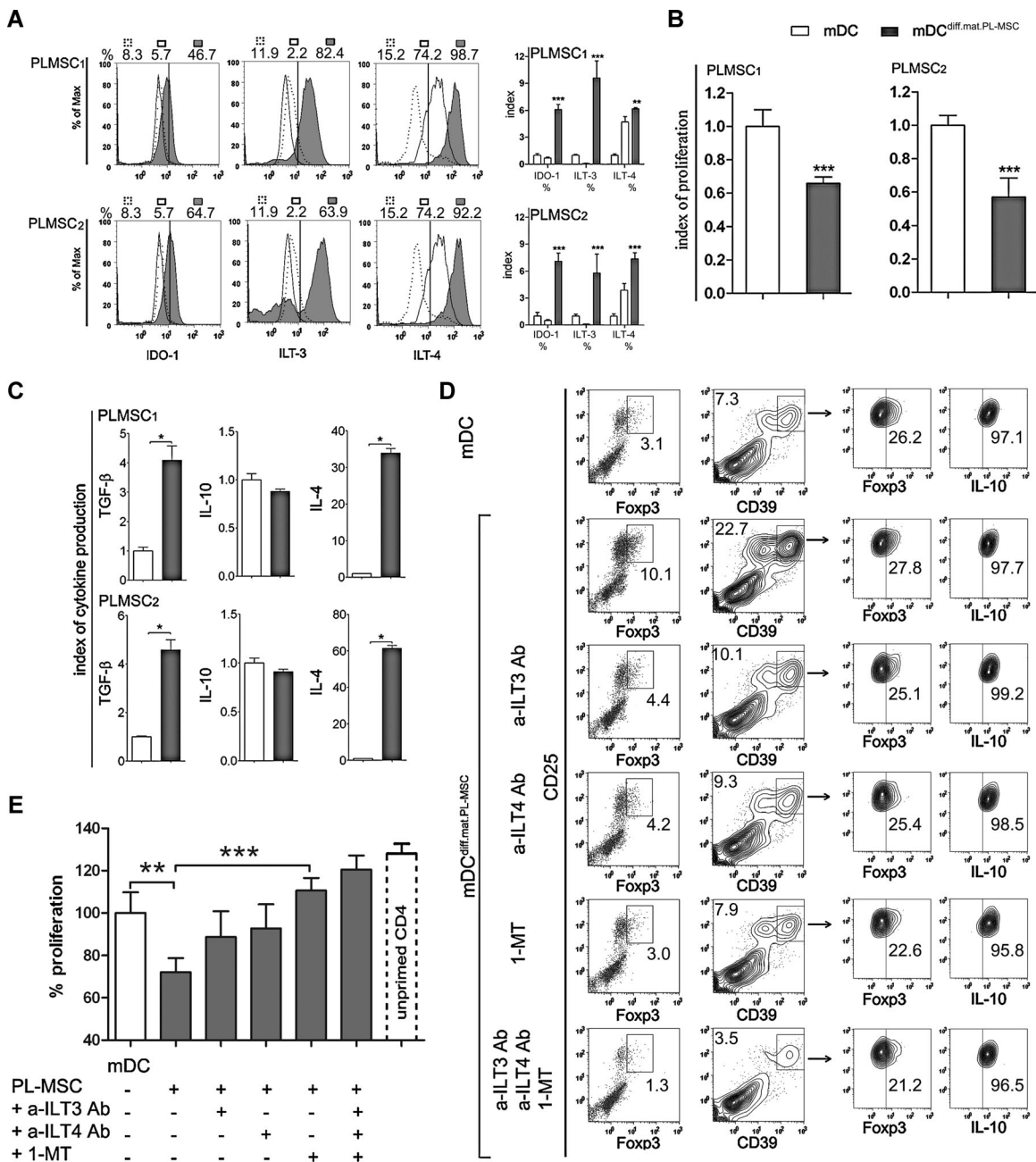
populations was also increased. Less than 2% of nonprimed CD4<sup>+</sup> T cells expressed CD25 (data not shown).

Furthermore, we showed that the phenotypic changes induced in CD4<sup>+</sup> T cells after the priming with PL-MSC-developed DCs correlated strongly with their suppressive potential in the coculture with CD3<sup>+</sup> T lymphocytes under the CD3/CD28 stimulatory conditions (Fig 6E).

Finally, to see whether the induction of Treg-cell subsets by PL-MSC-developed DCs depends on the expression of ILT-3, ILT-4, and IDO-1, the priming of CD4<sup>+</sup> T cells was carried out in the presence of blocking anti-ILT-3, anti-ILT-4 Abs, and 1-methyl-L-tryptophan, a specific inhibitor of IDO-1. Interestingly, we found that the contribution of IDO-1, to both the induction of Treg cells, and their suppressive function, is dominant compared with the effect of ILT-3 and ILT-4. The strongest effect, however, was achieved by blocking all three molecules (Fig. 6D and E). The treatment of control mDCs with the blocking Abs and 1-methyl-L-tryptophan had no significant effect on their priming capacity (data not shown).

## Discussion

Previously, we found that PL-MSCs resemble other MSCs [16, 30], and showed for the first time that PL-MSCs possess anti-inflammatory and immunomodulatory properties, which could be important for the resolution of PLs [16]. Here, we showed that PL-MSCs possess an amazing potential to modulate the functions of DCs. The significance of such inquiry, conducted for the first



**Figure 6.** DCs differentiated and matured with PL-MSCs induce anergy and Treg cells. iDCs differentiated with PL-MSCs were matured with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and PGE2 in the presence of PL-MSCs (mDCs<sup>diff.mat.PL-MSCs</sup>), whereas control mDCs were developed without PL-MSCs, followed by their analysis. (A) Phenotypic analysis of DCs from one donor cultivated with two PL-MSCs lines is shown. The results are also presented as mean + SD of  $n = 4$  PL-MSC1/DCs or PL-MSC2/DCs pairs. Isotype controls are provided in Supporting Information Fig. 6C. CD4<sup>+</sup> T cells were primed with mDCs<sup>diff.mat.PL-MSCs</sup> or mDCs, treated with IL-2, and then restimulated with control mDCs followed by analysis of their (B) proliferation and (C) cytokine production. These results are shown as mean  $\pm$  SD of  $n = 3$  PL-MSC1/DCs or PL-MSC2/DCs pairs. (D) Expression of Foxp3 and CD39 by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells, and Foxp3 and IL-10 by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> cells is shown after analysis of CD4<sup>+</sup> T cells primed in the presence or absence of anti-ILT-3, anti-ILT-4, and/or 1-methyl-L-tryptophan, and IL-2 treatment. A representative experiment is shown, out of two performed. FMO controls are provided in Supporting Information Fig. 9. (E) The suppressive activity of the DC-primed/IL-2-treated CD4<sup>+</sup> T cells in the coculture with CD3<sup>+</sup>T cells at 1:1 cell ratio, under the CD3/CD28 stimulatory conditions. The results are shown as relative proliferation calculated as cpm of CD3/CD4 cocultures/cpm of corresponding CD4<sup>+</sup> T-cell cultures. The proliferation in coculture of CD3<sup>+</sup>T and CD4<sup>+</sup> T cells primed with control mDCs was considered as 100%. Data are shown as mean + SD of three replicates from a representative experiment, out of two performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  versus mDCs, or as indicated (Student's *t*-test).

time, lies within the fact that DCs are the major regulators and decision-making cells of the immune responses [6], including the chronic inflammatory responses such as PLs [17]. Using the STRO-1 and CD146 markers, which are used commonly for the detection of MSCs in tissues [8], we showed that immature and mature DCs colocalize with PL-MSCs *in situ*. The colocalization was detected within and near the blood vessels, where PL-MSCs occupy a good strategic location for monitoring the immune cells trafficking through the inflamed tissue.

To investigate what could be the functional significance of such DC/PL-MSCs colocalization, we performed *in vitro* investigations, using monocyte-derived DCs as a model of inflammatory DCs, which are common in inflammatory diseases such as PLs [31]. We showed that PL-MSCs suppressed the differentiation of iDCs, which is in agreement with the recent publications showing that MSCs isolated from healthy tissues inhibit the differentiation of iDCs from monocytes [14] or CD34-progenitors [15]. Furthermore, the effect of PL-MSCs on differentiation of DCs was mediated largely by soluble factors, although IL-6-dependent mechanisms had small or no effects, which is also in line with the other findings [21]. Therefore, additional factors [12, 32, 33] should be targeted for investigation on PL-MSC/DCs interactions.

Next, we found that iDCs differentiated with PL-MSCs have unimpaired maturation, which is in contrast to the findings that the MSC-mediated inhibition of DCs differentiation could not be restored with LPS, CD40L, or TNF- $\alpha$  [14, 15, 21, 32]. Since phenotype, allostimulatory activity, and the abilities to overcome MSC-mediated inhibition depend on maturation stimuli [21, 34], our new finding could be a result of different agents used for the maturation. In line with this, we showed that the phenotype, although not the allostimulatory capacity, of PL-MSC-developed DCs could be restored by the pro-inflammatory cocktail, but not with LPS. Additionally, MSCs from different sources were shown to induce different responses in DCs [13]. Accordingly, PL-MSCs could also possess unique properties to interact with DCs, which they had acquired within PLs and retained *in vitro*. The most intriguing property of mDCs differentiated with PL-MSCs was their ability to induce simultaneous production of IL-4 and IL-17 in the coculture with CD4<sup>+</sup> T cells. It is unclear, how the observed levels of DCs cytokines correlate with the Th-cell responses. It could be possible that, the cytokine pattern produced by DCs is different when these cells are cocultivated in MLR, which remains to be investigated. Furthermore, whether IL-4 and IL-17 are produced by one population of CD4<sup>+</sup> T cells, such as described recently in asthmatic patients [35], or separate populations, remains to be investigated using both naive and memory T cells.

MSCs were shown to have a minor effect on the maturation of conventionally differentiated DCs [13, 15, 32]. In a harsh contrast, our results indicate that PL-MSCs stimulate strongly the expression of all maturation-related markers by DCs, their allostimulatory potential, and an IL-12-independent induction of Th1 polarization. Consequent increase of IFN- $\gamma$  most probably caused down-regulation of IL-4 and IL-10 in those cocultures, via GATA-3-dependent mechanisms [36]. Several papers described the IL-12-independent induction of Th1 cells via IL-27-dependent activation

of STAT-1 and T-bet [37]. IL-27 is also involved in the inhibition of Th17 development [38], which could explain the absence of IL-17 increase, although DCs matured with PL-MSCs produced more IL-23 [39]. In line with these results, we showed recently that IL-27 is expressed highly in symptomatic PLs, and that the exogenous IL-27 can stimulate Th1 and down-regulate Th17 cytokines' production by the PL-inflammatory cells [40]. Additionally, a high expression of IL-27 was found around the blood vessels within the PLs [40]. These results, and the new finding that PL-MSCs increase the production of IL-27 under the pro-inflammatory conditions, suggest that PL-MSCs could have an important immunoregulatory role in the progression of PLs via IL-27-dependent induction of Th1-cell response [2].

Although PL-MSC-developed DCs had an activated phenotype, these cells showed significantly different functional properties, characterized by the poor allostimulation, the strong induction of Th2-cell response, and the induction of Treg-cell subsets. MSCs from different sources were shown to induce tolerogenic DCs [12–15, 21], but this is the first time showing what mechanisms operate between MSC-induced tolerogenic DCs and Treg cells. Namely, we found that IDO-1, ILT-3, and ILT-4 expressed by PL-MSC-developed DCs are crucial for the induction of functional Foxp3<sup>+</sup> Treg cells, which is already described mechanism utilized by tolerogenic DCs [22, 23]. Besides Foxp3, CD39 was recognized recently as a key marker of functional Treg cells [27]. Here, we showed that PL-MSC-developed DCs up-regulate strongly CD39 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells. However, we observed only about 25% of Foxp3<sup>+</sup> cells within CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> population, suggesting that an additional Foxp3<sup>-</sup> population emerge after the contact with such DC. In line with this, it was shown that IDO-1- and ILT-4-expressing DCs can induce IL-10-producing Tr1 cells [41, 42]. These cells do not constitutively express Foxp3 [28], and were shown positive for CD39 [29], which is in line with our finding that all CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> T cells express IL-10. Additionally, a lower percentage of CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells compared to CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells could be explained by the fact that Foxp3 can be expressed transiently by the effectors T cells [43], confirming that CD39 is much better marker for the functional Treg-cell subsets.

Cumulatively, our results suggest that PL-MSCs could differentially modulate functions of DCs and Th-cell response in PLs. At the beginning of the disease, PL-MSCs could potentially activate the resident DCs, inducing their maturation and Th1 polarization. In contrast, the later stages of PLs, characterized by the increased extravagation of monocytes [44] through MSC-surrounded vessels, could potentiate DCs' tolerogenic differentiation and polarization of immune response toward Th2 and Treg cells, which are important for the healing stage of PLs [2, 3].

In conclusion, PL-MSCs were shown to possess astonishing immunomodulatory properties regarding the development of DCs, which differ significantly from the existing data on their healthy counterparts. Depending on the dynamics of interaction between the two cell types, PL-MSCs can either augment the inflammatory response or contribute to the resolution of the disease.

## Materials and methods

### Cells and tissues

Six PLs were extracted for orthodontic reasons, and two subcutaneous adipose tissues were obtained from a subject undergoing surgery at the Military Medical Academy (MMA), after the patients had signed consent forms. Four PLs and two adipose tissues were quench-frozen and used for immunocytochemistry, whereas two PL-MSCs lines were used in cocultivation experiments with monocyte-derived DCs. Monocytes ( $n = 8$ ), CD4<sup>+</sup> T ( $n = 4$ ), and CD3<sup>+</sup> T cells ( $n = 2$ ) were isolated by negative MACS using the Human Monocytes Isolation Kit II, CD4<sup>+</sup> T cell, and Pan-T cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) respectively, from PBMCs, and their percentage was always higher than 90% (Supporting Information Fig. 3).

PL-MSCs were isolated by digestion of PLs in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; (Sigma, Munich, Germany) solution of type I collagenase (1 mg/mL; Sigma) and DNAase (25 mg/mL; Sigma), as described [16]. The cells were plated at the density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured in DMEM-low glucose with 10% FCS (Sigma), and antibiotics (penicillin/streptomycin/gentamicin, 1% each; (ICN, Costa Mesa, CA, USA)). On reaching 70% confluence, passaging was performed by treating the cells with 0.2% trypsin (Sigma)/0.02% NaEDTA in PBS. The experiments were performed using PL-MSCs from passage 4. All experiments were approved by the MMA Ethics Committee.

### Cocultivation experiments

Monocytes ( $0.5 \times 10^6$ /mL) were cultivated alone, or with the preadhered PL-MSCs ( $0.5 \times 10^5$ /mL) in 2 mL of complete RPMI medium (10% FCS, L-glutamine, 50  $\mu$ M 2-ME (Sigma), and the antibiotics) in 6-well plates for 6 days, in the presence of 100 ng/mL GM-CSF (Leucomax, specific activity  $4.44 \times 10^6$  UI) and 20 ng/mL IL-4 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (Supporting Information Fig. 4). In some experiments, monocytes were additionally cultivated with IL-6 (10 ng/mL, R&D), 50% CM obtained from  $1 \times 10^5$  PL-MSCs/mL cultivated in complete RPMI for 72 h, or PL-MSCs in a direct contact, each in the presence or absence of a neutralizing anti-IL-6 Ab (2  $\mu$ g/mL; R&D). iDCs were then harvested by mild repeated pipetting, and  $5 \times 10^5$ /mL cells were re-plated in wells, either containing PL-MSCs ( $0.5 \times 10^5$ /mL) or not. The maturation of iDCs was induced by a pro-inflammatory cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (10 ng/mL of each; R&D), PGE2 (1  $\mu$ g/mL)), or LPS (100 ng/mL; Sigma) for 2 days [45]. Control mDCs were differentiated and matured without PL-MSCs. As additional controls, we used iDCs cultivated without the pro-inflammatory cocktail, and PL-MSCs cultivated with GM-CSF/IL-4 for 5 days and pro-inflammatory cocktail for 2 days. Each PL-MSCs line was cocultivated with at least three different monocytes/DCs isolated from unrelated donors, in duplicates.

### Mixed leukocyte reactions

The allostimulatory potential of DCs was assessed in MLR with allogenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. CD4<sup>+</sup> T cells ( $1 \times 10^5$ /well of 96-well plate) were cocultivated with different numbers of DCs ( $1 \times 10^4$ ,  $0.5 \times 10^4$ ,  $0.25 \times 10^4$ ,  $0.125 \times 10^4$ ,  $0.062 \times 10^4$ ,  $0.031 \times 10^4$ ) for 5 days (Supporting Information Fig. 4). Additionally, CD4<sup>+</sup> T cells were primed with DCs ( $1 \times 10^3$ /well) at 1/100 DC/CD4<sup>+</sup> T cell ratio for 3 days. Some of the priming cocultures were treated with anti-ILT-3, anti-ILT-4 (both at 2  $\mu$ g/mL, R&D), 1 methyl-L-tryptophan (20 mM, Sigma), or all three agents. DC-primed CD4<sup>+</sup> T cells were then MACS-purified and treated with IL-2 (2 ng/mL, R&D) for 2 days. Following their phenotypic analysis, such CD4<sup>+</sup> T cells were either restimulated with the control mDCs (secondary MLR) for 5 days, or used in the suppression assay for 6 days. The blank controls were DCs and CD4<sup>+</sup> T cells, cultivated separately. For detection of cytokines in the supernatants of primary and secondary MLR, parallel DC/CD4<sup>+</sup> T cell cocultures were treated with PMA (20 ng/mL) and A23187 (500 ng/mL) (Sigma) for the last 8 h. Intracellular IL-10 was detected in DC-primed CD4<sup>+</sup> T cells that were additionally treated with monensin (6 mM, eBioscience). In the suppression assay, each DC-primed CD4<sup>+</sup> T cell ( $0.75 \times 10^5$  cells/well) was cocultivated with CD3<sup>+</sup> T cells at 1:1 cell ratio in 96-well plates coated with anti-CD3 Ab (10  $\mu$ g/mL) and soluble CD28 Ab (2  $\mu$ g/mL, e-Bioscience). Controls included separate cultures of CD3<sup>+</sup> T cells and each DC-primed CD4<sup>+</sup> T cell (both at  $0.75 \times 10^5$ /well), as well as cocultures of CD3<sup>+</sup>/nonprimed CD4<sup>+</sup> T cell. Proliferation assays, performed with six replicates, were pulsed with <sup>3</sup>H-thymidine for the last 18 h (1  $\mu$ Ci/well, Amersham, Books, UK) and the radioactivity was measured by  $\beta$ -scintillation counting (LKB-1219 Rackbeta, Finland).

### Immunohistochemistry and flow cytometry

Cryocuts of four PLs, 7  $\mu$ m thick were used for the immunohistochemical analysis. The tissues were fixed in cold acetone and stained with primary Abs. The Abs were visualized with the EnVision+ kit (Dako) using diaminobenzidine (DAB) (Dako) as a chromogen. The slides were counterstained with hematoxylin for the light microscopy analysis, or directly observed by confocal microscopy (Zeiss LSM 510).

For the flow cytometry analysis, the cells were washed and incubated with the primary Ab, and streptavidin conjugates where needed. For the evaluation of intracellular expression of IDO-1 in DCs, and Foxp3 and IL-10 in CD4<sup>+</sup> T cells, we used permeabilization in Fix/Perm medium (Caltag Laboratories), following the analysis on flow cytometer EPICS XL-MCL (Coulter, Krefeld, Germany). Viability of DCs was assessed using Annexin-V-FITC/PI Apoptosis detection kit (R&D).

The following Abs (clones) were used for the immunohistochemistry and flow cytometry analyses: anti-HLA-DR (HL-39), anti-CD209 (MR-1), anti-CD146 (OJ79c), anti-IgG1 negative control (MCA928), anti-CD209-biotin (MR-1), IgG1a negative control-biotin (MCA928), anti-CD1a-PE (NA1/34-HLK),

anti-HLA-DR-PE (HL-39), anti-CD4-PE (RPA-T4), IgG1 negative control-PE (MCA928PE), streptavidin-PE (STAR4A), streptavidin-FITC (STAR2B), anti-CD14-PE (TÜK4), anti-CD146-FITC (OJ79c), anti-CD25-FITC (MEM-181), anti-CD86-FITC (BU63), anti-mouse IgG1-FITC (STAR117F), IgG1 negative control-FITC (MCA928F) (all from Serotec, Oxford, UK), anti-CD40-PE (5C3), anti-CD83-FITC (HB15e) (all from BD Biosciences), anti-CCR7-FITC (150503), anti-IL-6 (6708) (R&D), anti-HLA-DR-biotin (LN3), anti-CD39-FITC (eBioA1), anti-ILT-3-PE (ZM4.1), anti-ILT-4-PE (42D1), anti-IL-10-FITC (BT-10), anti-Foxp3-FITC (236A/E7), anti-CD3 (OKT3), anti-CD28 (CD28.2) (all from eBioscience), goat anti-IDO-1 (P20), donkey anti-goat IgG1-biotin (sc-2042) (all from SantaCruz Biotechnology), streptavidin-Alexa 546, goat-anti human IgG isotype control (10204), anti-STRO-1 (Stro-1) (all from Invitrogen), rabbit anti-S100 (Z0311) (Dako), donkey anti-rabbit IgG-biotin (32821) (Thermo Scientific), anti-CD11c-Alexa 488 (3.9), anti-CD83-Alexa 488 (HB15e) (all from Biolegend).

### Cytokines analysis

The levels of cytokines were measured in cell-free supernatants by sandwich ELISA Kits (R&D) or Human Th1/Th2 11plex Kit (Bender MedSystems), by calculating the unknown concentrations of the cytokines from the standard curves.

### Statistical analysis

Since the values distribution followed Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test), two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA (Dunnnett post-test) were used to evaluate the differences between the experimental and corresponding control samples. Values at  $p < 0.05$  or less were considered to be significant statistically.

**Acknowledgements:** The work was supported by grants of the Ministry of Education and Science-Serbia (project no. 175102) and MMA (no. MF-VMA/08/12-14). The authors thank D. Gazivoda (Department for Oral Surgery) and N. Stepic (Clinics for Plastic Surgery) for supplying biological material, and I. Rajkovic, A. Dragicovic, and T. Dzopalic (Institute for Medical Research) for helpful assistance during experiments.

**Conflict of interest:** The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

### References

- 1 Ford, P. J., Gamonal, J. and Seymour, G. J., Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology* 2010. **53**: 111–123.

- 2 Colic, M., Gazivoda, D., Vucevic, D., Vasilijic, S., Rudolf, R. and Lukic, A., Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol. Immunol.* 2009. **47**: 101–113.
- 3 Colic, M., Gazivoda, D., Vucevic, D., Majstorovic, I., Vasilijic, S., Rudolf, R., Brkic, Z. et al., Regulatory T-cells in periapical lesions. *J. Dent. Res.* 2009. **88**: 997–1002.
- 4 Sallusto, F. and Lanzavecchia, A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 1109–1118.
- 5 Becker, S., Warren, M. K. and Haskill, S., Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J. Immunol.* 1987. **139**: 3703–3709.
- 6 Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 767–811.
- 7 Hunter, C. A., New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5**: 521–531.
- 8 Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G. et al., A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008. **3**: 301–313.
- 9 Huang, G. T., Gronthos, S. and Shi, S., Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 2009. **88**: 792–806.
- 10 Tomic, S., Djokic, J., Vasilijic, S., Vucevic, D., Todorovic, V., Supic, G. and Colic, M., Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev.* 2011. **20**: 695–708.
- 11 Prockop, D. J. and Oh, J. Y., Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 2012. **20**: 14–20.
- 12 Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C. and Noel, D., Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res. Ther.* 2010. **1**: 2. doi:10.1186/scrt2.
- 13 van den Berk, L. C., Roelofs, H., Huijs, T., Siebers-Vermeulen, K. G., Raymakers, R. A., Kogler, G., Figdor, C. G. et al., Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells. *Immunology* 2009. **128**: 564–572.
- 14 Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D. and Mao, N., Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005. **105**: 4120–4126.
- 15 Li, Y. P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordignon, P., Mekhloufi, F., Hequet, O. et al., Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J. Immunol.* 2008. **180**: 1598–1608.
- 16 Dokic, J., Tomic, S., Cerovic, S., Todorovic, V., Rudolf, R. and Colic, M., Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J. Clin. Periodontol.* 2012. **39**: 807–816.
- 17 Colic, M., Gazivoda, D., Vasilijic, S., Vucevic, D. and Lukic, A., Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 2010. **39**: 690–696.
- 18 Gordon, S. and Taylor, P. R., Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5**: 953–964.
- 19 Shi, S. and Gronthos, S., Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 2003. **18**: 696–704.

- 20 Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J. et al., Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 2002. **71**: 445–457.
- 21 Nauta, A. J., Krusselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R. and Fibbe, W. E., Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2006. **177**: 2080–2087.
- 22 Yan, Y., Zhang, G. X., Gran, B., Fallarino, F., Yu, S., Li, H., Cullimore, M. L. et al., IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2010. **185**: 5953–5961.
- 23 Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Hacker, G., Bieber, T. et al., Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2009. **183**: 145–154.
- 24 Reis e Sousa, C., Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. **6**: 476–483.
- 25 Qiao, M., Thornton, A. M. and Shevach, E. M., CD4+ CD25+ (corrected) regulatory T cells render naive CD4+ CD25- T cells anergic and suppressive. *Immunology* 2007. **120**: 447–455.
- 26 Mandapathil, M., Lang, S., Gorelik, E. and Whiteside, T. L., Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J. Immunol. Methods* 2009. **346**: 55–63.
- 27 Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S. et al., Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007. **110**: 1225–1232.
- 28 Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T. et al., IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5986–5993.
- 29 Mandapathil, M., Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Ren, J., Jackson, E. K., Johnson, J. T., Gorelik, E. et al., Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 2010. **285**: 27571–27580.
- 30 Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R. et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006. **8**: 315–317.
- 31 Shortman, K. and Naik, S. H., Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. **7**: 19–30.
- 32 Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F. and Moretta, L., MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009. **113**: 6576–6583.
- 33 Duffy, M. M., Pindjakova, J., Hanley, S. A., McCarthy, C., Weidhofer, G. A., Sweeney, E. M., English, K. et al., Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur. J. Immunol.* 2011. **41**: 2840–2851.
- 34 Colic, M., Mojsilovic, S., Pavlovic, B., Vucicevic, D., Majstorovic, I., Bufan, B., Stojic-Vukanic, Z. et al., Comparison of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro. *Vojnosanit. Pregl.* 2004. **61**: 471–478.
- 35 Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. and Annunziato, F., Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 2011. **66**: 989–998.
- 36 Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W. and Hansbro, P. M., Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008. **123**: 326–338.
- 37 Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. and de Sauvage, F. J., IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003. **100**: 15047–15052.
- 38 Yoshimura, T., Takeda, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Kinjyo, I., Ishibashi, T., Yoshimura, A. et al., Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2006. **177**: 5377–5385.
- 39 Awasthi, A., Riol-Blanco, L., Jager, A., Korn, T., Pot, C., Galileos, G., Bettelli, E. et al., Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J. Immunol.* 2009. **182**: 5904–5908.
- 40 Colic, M., Gazivoda, D., Majstorovic, I., Dragicevic, A., Vasiljic, S., Rudolf, R., Milosavljevic, P. et al., Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *J. Dent. Res.* 2009. **88**: 1142–1147.
- 41 Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D. et al., Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2010. **11**: 846–853.
- 42 Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C. F., Hauben, E. et al., Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010. **116**: 935–944.
- 43 Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W. and Toes, R. E., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007. **37**: 129–138.
- 44 Kaneko, T., Okiji, T., Zhao, L., Esgeurra, R. and Suda, H., Heterogeneity of dendritic cells in rat apical periodontitis. *Cell. Tissue Res.* 2008. **331**: 617–623.
- 45 Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. et al., Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 3135–3142.

**Abbreviations:** CM: conditioning medium · MMA: Military Medical Academy · MSC: mesenchymal stem cell · PL: periapical lesion

**Full correspondence:** Prof. Miodrag Čolić, Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defence, Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia  
 Fax: +381-112663361  
 e-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

Received: 21/9/2012

Revised: 22/2/2013

Accepted: 18/4/2013

Accepted article online: 25/4/2013

## - Biografija -

Jelena M. Đokić je rođena 27.03.1983. u Pančevu. Nakon završetka gimnazije „Uroš Predić“ u Pančevu, upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, smer Biologija školske 2002/2003. školske godine. Po završetku studija upisala je doktorske studije na Biološkom fakultet, Univerzitet u Beogradu, modul: Imunobiologija 2008/2009. Tokom doktorskih studija, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u period od 2009. do 2010. godine bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (evidencioni broj 20124) „Razvoj i standardizacija imunodijagnostičkih testova (ELISA i WESTERN BLOT) za dijagnostiku infekcija životinja i ljudi sa hemotropnim mikoplazmama“, kojim je rukovodio profesor dr Branislav Lako. U periodu od 2010. do 2014. godine je, kao stipendista, angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (evidencioni broj 175102): „Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u terapiji tumora“, kojim rukovodi akademik Miodrag Čolić. Takođe je uključena u projekat Ministarstva odbrane Republike Srbije (evidencioni broj VMA/06-10/B.2) na Vojnomedicinskoj akademiji kojim je rukovodio akademik Miodrag Čolić. U period od 2009. do 2010. godine bila je uključena u međunarodni projekat Medicinskog fakulteta u Foči, Ministarstva Republike Srpske, BiH „Uticaj antioksidanasa (N-Acetil-L-Cistein) na Myd-88 zavisnu produkciju proinflamatornih citokina u kulturi humanih granulocita djece koja boluju od cistične fibroze“, čiji je rukovodilac doc. dr Dejan Bokonjić. Od 2014. godine je član Društva imunologa Srbije.

Jelena M. Đokić je do sada bila autor i koautor u šest naučnih publikacija u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja, kao i u devet saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Ђокић

број индекса 080904

### Изјављујем

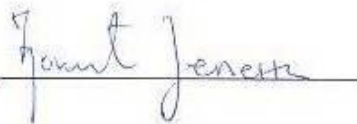
да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација и испитивање имуномодулаторних својстава мезенхимских матичних ћелија изолованих из денталног ткива човека

- 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, 19.03.2014.



Прилог 2. /

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Ђокић

Број индекса 080904

Студијски програм Физиологија животиња, Имунологија

Наслов рада Карактеризација и испитивање имуномодулаторних својстава мезенхимских матичних ћелија изолованих из денталног ткива човека

Ментор академик Миодраг Чолић, др Биљана Божић

Потписани/а Јелена Ђокић

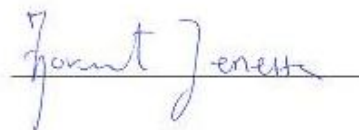
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 19.03.2014.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Карактеризација и испитивање имуномодулаторних својстава мезенхимских матичних ћелија изолованих из денталног ткива човека

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).

Потпис докторанда

У Београду, 19.03.2014.

