

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Petar D. Milosavljević

**ULOGA GALEKTINA-3 U RAZVOJU
PERIAPEKSNIH INFLAMATORNIH
LEZIJA KOD MIŠA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Petar D. Milosavljević

**THE ROLE OF GALECTIN-3 ON THE
DEVELOPMENT OF PERIAPICAL
INFLAMMATORY LESIONS IN MICE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Podaci o mentoru i članovima komisije:

Mentor:

dr sc. vet. med., Milijan Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za patološku morfologiju.

Članovi komisije:

akademik Miodrag Čolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

dr sc. Aleksandra Lukić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet, Katedra za bolesti zuba.

Datum odbrane:

Izjave zahvalnosti:

Zahvaljujem se mom mentoru, prof dr Milijanu Jovanoviću, na nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se akademiku prof dr Miodragu Čoliću, dekanu Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu, za ideje koje su podigle nivo ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof dr Aleksandri Lukić, sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu, što je prihvatila da bude član komisije i time uveličala ovaj trenutak.

Zahvaljujem se prof dr Miodragu Lukiću, iz Centra za molekularnu medicinu Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu, čijom ljubaznošću su nam ustupljeni galektin-3 nokaut miševi.

Zahvaljujem se dr sc. molekularne biologije Dragani Janković, University Hospital Zürich, Department of Dermatology, za ključnu pomoć pri Real-time PCR analizi.

Zahvaljujem se veterinarskom tehničaru Svetlani Franeti-Despotović, sa Instituta za medicinska istraživanja VMA, za veliku pomoć tokom izvođenja eksperimenata na životinjama, tehnički najzahtevnijoj fazi ovog istraživanja.

Zahvaljujem se laboratorijskom tehničaru Snežani Stevanović, iz patohistološke laboratorije Katedre za patologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, bez koje ne bi bilo tako dobrih histoloških preparata.

Zahvaljujem se dr Draganu Gazivodi, sa Klinike za stomatologiju VMA, koji me je uveo u prve stomatološke korake.

Zahvaljujem se stomatološkom tehničaru Bratislavu Aceviću, sa Klinike za stomatologiju VMA, koji mi je, uz dozvolu svojih pretpostavljenih, ustupio na korišćenje portabl stomatološku burgiju sa ostalim materijalom i čiju sam pomoć imao uvek kada je to bilo potrebno.

Zahvaljujem se dr Vladi Stefanoviću i stomatološkom tehničaru Gordani Jungić, sa Klinike za stomatologiju VMA.

Zahvaljujem se kolegi, dr sc. Draganu Đurđeviću, sa Instituta za medicinska istraživanja VMA, koji mi je stavio na raspolaganje resurse eksperimentalne hirurgije.

Zahvaljujem se mojim prijateljima dr sc molekularne biologije Ani Dragičević-Thorne, njenom suprugu Redžu Thorne i dr Ivanu Rajkoviću na velikoj pomoći i druženju.

Zahvaljujem se prof dr Zvonku Magiću, načelniku Instituta za medicinska istraživanja VMA, i mr sc. molekularne biologije Nataši Strelčić, koji su me uveli u metodu real-time PCR i zahvaljujući kojima sam došao do nekih ideja.

Zahvaljujem se dipl. biohemičaru Ivani Majstorović, sa Instituta za medicinska istraživanja VMA, koja mi je pomagala u pravljenju neophodnih rastvora.

Posebno se zahvaljujem:

prof dr Milijani Knežević, mom mentoru tokom specijalističkih i magistarskih studija, koja me je uvela u osnove patologije i dr Aleksandru Dujiću, čiju nesebičnu podršku sam uvek imao;

profesorima Nebojši Kneževiću i Nedeljku Rosiću

i mojim roditeljima, bratu, baki..

ULOGA GALEKTINA-3 U RAZVOJU PERIAPEKSNIH INFLAMATORNIH LEZIJA KOD MIŠA

REZIME

Galektini su evolutivno veoma stari plejotropni proteini sa različitim funkcijama u urođenom i stečenom imunitetu. Do danas je kod sisara u mnogim tkivima, intra i ekstraćelijski, otkriveno ukupno 15 galektina sa nizom uloga u prepoznavanju patogena i finoj regulaciji imunološkog odgovora. Galektini se ponašaju kao receptori (PRR) za prepoznavanje zajedničkih molekularnih obrazaca mikroorganizama (PAMP) koji aktiviraju urođeni imunološki odgovor. Galektin-3 je himerični član porodice galektina koji ispoljava proinflamatorno ali i imunoregulatorno delovanje. Snažan je aktivator leukocita i delujući kao adhezivni molekul važan je za njihovu direktnu adheziju za endotelne ćelije i proces ekstrasvazacije.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje uticaja galektina-3 na razvoj eksperimentalno izazvanih periapeksnih inflamatornih lezija kod galektin-3 nokaut miševa mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja oboljenja. Periapeksne inflamatorne lezije izazvane su otvaranjem komunikacije između usne duplje i zubne pulpe stomatološkom burgijom. Prodor patogenih anaeroba dentalnog plaka *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans* i drugih u zubnu pulpu vodi do razvoja snažnog periodontitisa.

Lipopolisaharid (LPS) *P.gingivalis*, ligand TLR2 i TLR4, stimuliše lučenje različitih proinflamatornih i antiinflamatornih citokina od strane antigen prezentujućih ćelija (APĆ), pre svega makrofaga i dendritskih ćelija (DĆ). Galektin-3 je negativni regulator funkcije LPS pa je sekrecija citokina od strane makrofaga galektin-3 nokaut miševa povećana u odnosu na miševa divljeg tipa. Značajno smanjen broj neutrofilnih granulocita u periapeksnim inflamatornim infiltratima ovih životinja u odnosu na divlji tip, uz približno jednak broj makrofaga i limfocita, ukazuje da nedostatak ovog molekula smanjuje intenzitet inflamatornih procesa u periodoncijumu. Neutrofilni granulociti su najbrojnije ćelije u periapeksnim inflamatornim lezijama miševa divljeg tipa a makrofagi kod galektin-3 negativnih nokaut miševa. Real-time PCR detekcijom ekspresije gena za proinflamatorne i antiinflamatorne citokine na nivou informacione RNK (iRNK), mesec dana od izazivanja oboljenja utvrđeno je značajno povećanje ekspresije gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, IL-4 i IL-18

kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na miševe divljeg tipa i značajno smanjenje ekspresije gena za $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IFN\gamma$, $IL-21$, $IL-10$, i $TGF\beta$. Detektovano je i povećanje ekspresije gena za $TLR2$, $TLR4$ i hemokin $IL-8$ u odnosu na periapeksne lezije kod miševa divljeg tipa. U zdravom tkivu nije detektovana ekspresija gena za $IL-21$ dok je ekspresija gena za proinflamatorni citokin $IL-12$, promoter T_h1 tipa inflamatornog odgovora smanjena u inflamiranom tkivu.

Dobijeni rezultati ukazuju da u periapexnim lezijama ispitivanih miševa dominira T_h17 tip stečenog imunološkog inflamatornog odgovora i da su $IL-17$ i $IL-8$ direktno odgovorni za pristizanje neutrofilnih granulocita u inflamirano područje i egzacerbaciju hroničnog periodontitisa kod galektin-3 nokaut i miševa divljeg tipa. Broj neutrofilnih granulocita u tkivu periapexnih inflamatornih lezija galektin-3 nokaut miševa značajno je manji iako je ekspresija gena za proinflamatorne citokine $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-17$ i $IL-8$ značajno povećana u odnosu na tkivo periapexnih lezija miševa divljeg tipa, što ukazuje na uticaj i drugih mehanizama, ne samo sekrecije citokina, u proces infiltracije neutrofilnih granulocita.

Ključne reči: Galektin-3, periapexne inflamatorne lezije, nokaut miševi, patohistologija, real-time PCR, ekspresija gena za citokine

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Veterinarska patologija, imunologija

UDK: 619:616/618

THE ROLE OF GALECTIN-3 ON THE DEVELOPMENT OF PERIAPICAL INFLAMMATORY LESIONS IN MICE

SUMMARY

Galectins are evolutionarily very old glycan-binding proteins with pleiotropic roles in innate and adaptive immunity. Until now 15 galectins have been identified in mammals with wide tissue distribution, intra and extracellular, with many roles in diverse immune cell processes of pathogen recognition, and fine tuning of immune responses. They act as pathogen recognition receptors (PRRs), recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on microorganisms and activate innate immune response. Galectin-3 (Gal-3) is a chimeric molecule, and a member of the galectin family, with proinflammatory and immunoregulatory functions. Gal-3 is a potent leukocyte activator, and is very important in leukocyte adhesion and extravasation, acting directly as an adhesive molecule.

The aim of this study was to investigate how Gal-3 influences inflammatory process in experimentally induced periapical inflammatory lesions in Gal-3 knockout C57BL/6 mice one month, six weeks, and four months after disease induction. Periapical inflammatory lesions were experimentally induced using stomatological round bur. Initial dental pulp exposure to dental plaque anaerobic pathogens like *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans* and others leads to severe periapical periodontitis.

P.gingivalis lipopolysaccharide (LPS), TLR2 and TLR4 ligand, stimulate antigen presenting cells (APC), like macrophages and dendritic cells, to produce various pro and antiinflammatory cytokines. Gal-3 is considered to be a negative regulator of LPS functions, which is why the level of cytokine production in Gal-3 negative macrophages is much higher. A significantly decreased number of neutrophils in periapical inflammatory infiltrates, with an equal number of macrophages and lymphocytes in wild and knockout mice, suggests that absence of this molecule decreases inflammatory processes in periodontium. Neutrophil granulocytes are the most numerous infiltrating cells in periapical lesions of wild type mice and macrophages in Gal-3 knockout mice. Real-time PCR detection of cytokine gene expression on mRNA level, a month after disease induction, showed a significant

increase of proinflammatory cytokine IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, IL-4 and IL-18 mRNA levels in Gal-3 knockout mice, compared to wild type and significant decrease of TNF α , IFN γ , IL-1 α , IL-21, IL-10, and TGF β mRNA levels. Also significant increase of TLR2, TLR4 and IL-8 chemokine mRNA levels were detected compared to wild type. IL-21 gene expression was not detected in healthy tissue, and levels of IL-12 mRNA were higher in healthy periapical tissue, compared to periapical inflammatory lesions.

These results indicated that a T_h17 type of adaptive immune inflammatory response is ongoing in periapical lesions, and that IL-17 and IL-8 are responsible for neutrophil recruitment and exacerbation of chronic periodontitis in wild type and Gal-3 knockout mice. The fact that the number of neutrophils in Gal-3 knockout mice periapical lesions is significantly lower, although the gene expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17 and IL-8 is much higher than in wild type C57BL/6 mice, suggests that other mechanisms, not only cytokine expression, are involved in neutrophil infiltration.

Keywords: Galectin-3, periapical inflammatory lesions, knockout mice, pathohistology, real-time PCR, cytokine gene expression.

Scientific field: Veterinary medicine

Narrower scientific field: Animal pathology, Immunology

UDK: 619:616/618

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1 PERIODONCIJUM	4
2.2. PERIAPEKSNI PERIODONTITIS	4
2.3. EKSPERIMENTALNI PERIAPEKSNI PERIODONTITIS	5
2.4. OŠTEĆENJE TKIVA	6
2.4.1 Interakcija bakterijskih vrsta	7
2.4.2 Izbegavanje imunološkog sistema domaćina	7
2.4.3 LPS i drugi bakterijski modulini	8
2.4.4 Enzimi	8
2.5. ODGOVOR ORGANIZMA NA OŠTEĆENJE TKIVA	8
2.6. CITOKINI I NJIHOVA FUNKCIJA	10
2.6.1. Citokini u periodontalnim lezijama	13
2.6.2. Citokini i subpopulacije T-limfocita	18
2.6.3. Bakterije zubnog plaka i citokini	21
2.6.3.1 LPS	23
2.6.3.2 Fimbrije	24
2.6.3.3. Proteaze	25
2.6.3.4. Ostali faktori virulencije	25
2.6.4. Destruktivna i protektivna uloga citokina	25
2.6.4.1 Urođeni imunitet i destrukcija periodontalnog tkiva	26
2.6.4.2 Stečeni imunitet i destrukcija periodontalnog tkiva	27
2.6.4.3 Antiinflamatorni citokini i destrukcija periodontalnog tkiva	30
2.7. LEKTINI	32
2.7.1. GALEKTIN-3	33
2.7.1.1 NT domen	34
2.7.1.2 CRD	34
2.7.1.3 Specifičnost vezivanja šećera i multivalentnost galektina-3	35
2.7.1.4 Tkivna distribucija galektina-3	36
2.7.1.5 Imunološki potencijal galektina-3	37
2.7.1.6 Galektini u kontroli inflamatornog odgovora	38
2.7.1.7 Antiinflamatorni i proinflamatorni galektini:	39
2.7.1.8 Delovanje egzogenog Galektina-3	40
2.7.1.9 Galektin-3 deficijentni miševi i imunološki odgovor <i>in vivo</i>	42
2.7.1.10 Ciljni receptori za galektine	43
2.7.1.11 Delovanje intraćelijskog galektina-3	44
2.7.1.12 Galektin-3 u citoplazmi	44
2.7.1.13 Galektin-3 u nukleusu	45
2.8. NOKAUT MIŠEVI	46
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	47
3.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	47

3.2. ZADACI ISTRAŽIVANJA	48
4. MATERIJAL I METODE	49
4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	49
4.2. IZAZIVANJE PERIAPEKSNIH LEZIJA	50
4.3. ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I UZIMANJE UZORAKA TKIVA	50
4.4. KORIŠĆENI LABORATORIJSKI PROTOKOLI	50
4.5. KVANTITATIVNA I SEMI-KVANTITATIVNA ANALIZA HISTOLOŠKIH PROMENA	53
4.6. EKSPRESIJA GENA ZA CITOKINE – REAL-TIME PCR ANALIZA	55
5. REZULTATI	58
5.1. PATOLOŠKO-HISTOLOŠKI NALAZ	58
5.1.1 mesec dana od otvaranja zubne pulpe	58
5.1.2 šest nedelja od otvaranja zubne pulpe	65
5.1.3 četiri meseca od otvaranja zubne pulpe	71
5.2. IMUNOFLUORESCENTNA ANALIZA	75
5.3. SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA	77
5.3.1. DEBLJINA PERIODONTALNOG LIGAMENTA	77
5.3.2. EKSTENZIVNOST INFLAMACIJE	78
5.3.3. RESORPCIJA ALVEOLARNE KOSTI	79
5.3.4. RESORPCIJA ZUBNOG CEMENTA	80
5.4. REAL-TIME PCR ANALIZA	81
6. DISKUSIJA	85
7. ZAKLJUČCI	94
POPIS LITERATURE:	97

1. UVOD

Imunološki sistem čoveka i životinja veoma je složen i ima tri nivoa. Prvi nivo čine anatomske i fiziološke barijere, drugi nivo je urođeni imunitet koji se zasniva na ograničenom broju receptora za molekularne obrasce mikroorganizama PAMP (pathogen-associated molecular patterns) čije informacije očitavaju receptori za prepoznavanje patogena PRR (pathogen/pattern recognition receptors) među kojima su najznačajniji toll-nalik receptori TLR (toll-like receptors), NOD-nalik receptori (NOD-like receptors) i sistem inflamazoma. U PRR spadaju i lektini, evolutivno veoma stara grupa proteina, čija je osnovna funkcija prevođenje različitih bioloških informacija čuvanih u specifičnim oligosaharidnim strukturama glikokonjugata. Lektini su klasifikovani u familije među kojima galektini spadaju u najstarije i najinteresantnije. Galektini se karakterišu specifičnim vezivanjem za β -galaktozide preko veoma starog i očuvanog domena koji prepoznaje ugljene hidrate CRD (carbohydrate recognition domain). Osnovna funkcija galektina kao PRR je aktivacija nespecifičnog urođenog imunološkog odgovora koji je veoma brz i već u toku nekoliko minuta od ulaska patogena u organizam počinje da generiše zaštitni inflamatorni odgovor. Ovaj odgovor se karakteriše mobilizacijom i dolaskom neutrofilnih granulocita, a zatim i monocita na mesto inflamacije i aktivacijom tkivnih makrofaga i dendritskih ćelija (DĆ), kao antigen prezentujućih ćelija (APĆ), što dovodi do aktivacije trećeg nivoa odbrane antigen-specifičnog stečenog imuniteta.

Po strukturi jedinstven pripadnik familije lektina je himerični galektin-3 koji uz CRD sadrži N-terminalni domen zahvaljujući kome je u stanju da formira oligomere u vidu latica što mu omogućava polivalentnost i multifunkcionalnost. Lokalizovan je pre svega intraćelijski, u nukleusu i citoplazmi, ili ređe ekstraćelijski na membrani i u vanćelijskom prostoru. Preko specifičnih interakcija sa velikim brojem intra- i ekstraćelijskih proteina galektin-3 je uključen u niz različitih fizioloških i patofizioloških stanja i procesa kao što su imunološki odgovor, razvoj, neoplastične transformacije i metastaze. Galektini se sintetišu i deponuju u citoplazmi i do njihovog oslobađanja dolazi pri oštećenju tkiva tokom inflamacije, pasivno iz nekrotičnih ćelija ili aktivno nekласičnim putem (leaderless secretory pathway) iz ćelija aktivisanih tokom inflamatornog procesa. Na taj način galektini se ponašaju kao PRR ali i kao

imunomodulatori. Pošto su oslobođeni galektini prisutni uglavnom u inflamatornim lezijama izazvanim određenim patogenima oni su potencijalni molekularni obrasci nastali oštećenjem tkiva - DAMP (damage-associated molecular patterns) koji, kao i PAMP, aktiviraju urođeni imunološki odgovor. Galektin-3 je prisutan u velikom broju različitih ćelijskih tipova i nizu ćelija urođenog imuniteta, a tokom inflamacije oslobađa se u ekstraćelijski prostor gde aktivira inflamatorne ćelije (pre svih neutrofile), stimuliše njihovo zadržavanje na mestu inflamacije i ekstravazaciju ovih ćelija delujući kao adhezivni molekul. Znatno umanjeni inflamatorni infiltrati u brojnim *in vivo* inflamatornim modelima na galektin-3 deficijentnim nokaut miševima ukazuju na veliki značaj ovog molekula u distribuciji leukocita tokom inflamatornog odgovora i na njegovo proinflamatorno ali i vrlo suptilno imunoregulatorno delovanje. On je negativni regulator funkcija lipopolisaharida (LPS) pa zbog toga antigen prezentujuće ćelije (APĆ) galektin-3 negativnih nokaut miševa pod delovanjem LPS gramnegativnih bakterija sekretuju veću količinu proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6 i TNF α što opet vodi sintezi veće količine IL-17 i IL-8 i egzacerbaciji inflamatornog procesa.

Dosadašnja istraživanja na različitim eksperimentalnim inflamatornim modelima i galektin-3 deficijentnim miševima nisu obuhvatila ispitivanje ovog molekula u modelu eksperimentalno izazvanih periapeksnih inflamatornih lezija. Ovaj animalni model dobar je za proučavanje dinamike i funkcionalno-fenotipske karakterizacije lokalnog hroničnog zapaljenja.

Periapeksni periodontitis ili periapeksna inflamatorna lezija je lokalna inflamatorna reakcija na bakterijsku infekciju pulpe korena zuba životinja i ljudi. Ovaj proces javlja se u vidu fokalnog periodontitisa ali i kompleksnijih inflamatornih lezija pri čemu je nekrotični pulpitis inicijalni događaj. Eksperimentalni periapeksni periodontitis može se izazvati otvaranjem zubne pulpe stomatološkom burgijom. Najčešći uzročnici periodontitisa su patogeni anaerobi usne duplje i dentalnog plaka *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*), *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) i drugi. U dentalnom plaku prisutni su takođe *Eubacterium* i *Peptostreptococcus* sojevi a sem njih i različiti sojevi *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *E.coli*. Od sojeva mikroorganizama koji su izazvali infekciju zavisi tip imunološkog odgovora domaćina a posledično i stepen oštećenja tkiva.

Dosadašnja istraživanja familije galektina su u velikoj meri fokusirana na ulogu ovih proteina u animalnim modelima bolesti kao što su kolagenom indukovani artritis, EAE, dijabetes, niz parazitskih infestacija i bakterijskih i prionskih infekcija. Pošto do sada nije ispitivana uloga galektina u modelu eksperimentalno izazvanih periapeksnih inflamatornih lezija primena ovog modela na galektin-3 nokaut miševima predstavlja novo istraživanje i može se smatrati originalnim. Rezultati dobijeni korišćenjem klasičnih patološko-histoloških metoda i detekcijom ekspresije gena za različite pro- i antiinflamatorne medijatore na nivou informacione RNK (iRNK) real-time PCR metodom mogli bi da donekle rasvetle mehanizme uticaja galektina-3 u ovom inflamatornom modelu i eventualno da ukažu na to da li bi se njegovom manipulacijom na različitim nivoima moglo po potrebi uticati na tip inflamatornog odgovora i stepen oštećenja tkiva.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 PERIODONCIJUM

Periodoncijum je struktura u koju zub naleže svojim korenim delom i koja omogućava vezu zuba sa okolnim tkivima. Sastoji se od cementa (deo zuba), periodontalnog ligamenta, alveolarne kosti i gingive. Periodontalni ligament je specijalizovano vezivno tkivo koje drži čvrsto pričvršćen cement zuba za alveolarnu kost. Ovo tkivo u potpunosti prekriva koren zuba i veoma dobro je vaskularizovano i inervisano. Osnovne funkcije periodontalnog ligamenta su fiksiranje zuba u alveoli i snabdevanje osnovnim hranljivim materijama a učestvuje i u procesima stvaranja i resorpcije koštanog tkiva tokom razvoja i rasta zuba ([Angleraud R. 1973.](#)).

Sem fibroblasta i fibrocita vezivno tkivo periodontalnog ligamenta sadrži i osteoblaste, osteoklaste, makrofage, cementoblaste i ćelije Malasezovih ostrvaca. Zastupljena su kolagena vlakna koja se sastoje uglavnom od kolagena tipa I i III a koja čine snopiće nazvane po pravcu u kome se pružaju i njihovoj lokalizaciji (horizontalna, kosa, periapeksna, inter-radikularna i vlakna alveolarnog grebena)([Angleraud R. 1973.](#)).

Nervna vlakna se pružaju od kosti apikalno i formiraju mrežu oko zuba šireći se ka grebenu i gingivi. Na taj način CNS dobija informacije o svakom pa i najsitnijem pomeranju zuba.

Alveolarna kost okružuje koren zuba formirajući tzv. alveolarni džep a preko alveolarne kosti sa spoljašnje strane naleže gingiva ([Angleraud R. 1973.](#)).

2.2. PERIAPEKSNI PERIODONTITIS

Periapeksni periodontitis, zapaljenje periodontalnog ligamenta, je lokalna inflamatorna reakcija na bakterijsku infekciju pulpe korena zuba životinja i ljudi. Ovaj inflamatorni proces po toku može biti akutan i hroničan a kasnije i u formi kompleksnijih inflamatornih lezija kao što su granulomi, ciste, apscesi ili ožiljno tkivo pri čemu pulpitis i nekroza zubne pulpe predstavljaju inicijalni događaj za nastanak i razvoj ovih procesa ([Angelraud R. 1970a.](#)).

U akutnoj fazi, za koju se smatra da traje oko tri nedelje, najbrojnije ćelije u periapexnim inflamatornim infiltratima su neutrofilni granulociti, makrofagi i dendritske ćelije, a kasnije proces poprima hronični tok kada su najbrojnije mononuklearne ćelije. U fazi reparacije i rezolucije dolazi do proliferacije vezivnog tkiva, fibroblasta, fibrocita, sinteze kolagenih vlakana, a ponekad nastaju već pomenuti granulomi, ciste ili apscesi. Tokom inflamacije u periodoncijumu dolazi do razgradnje i resorpcije alveolarne kosti i zubnog cementa pri čemu se periodontalni prostor progresivno povećava a u inflamatornim infiltratima uočavaju se multijedarni osteoklasti, ćelije koje razgrađuju alveolarnu kost ([Angelraud R. 1970a.](#)).

Granulomi nastaju kao odgovor organizma na antigene rezistentne na delovanje efektorskih ćelija urođenog imunološkog odgovora (npr. neutrofili i eozinofili). Ovi antigeni mogu biti infektivni agensi (npr. *M.tuberculosis*) ili neke supstance strane organizmu, a često je antigen nepoznat kao što je slučaj kod sarkoidoze. Funkcija granuloma je stvaranje barijere za antigene koji se ne mogu eliminisati. Granulom je organizovani skup makrofaga a sem što definišu granulom makrofagi ponekad fuzionišu u multijedarne džinovske ćelije. Neki makrofagi dobijaju pridev *epiteloidni* što ukazuje na određeni stepen sličnosti sa epitelnim ćelijama. Razlikuju se od drugih makrofaga po izduženom, nabubrelom jedru i eozinofilnijoj citoplazmi. Periapexni granulom (dentalni granulom) je fokalni, negnojni, hronični periodontitis sa akumulacijom mononuklearnih ćelija, fibroblasta i kolagena oko vrha korena zuba praćen razgradnjom i resorpcijom koštanog tkiva zubnih alveola i zubnog cementa ([Angelraud R. 1970b.](#)).

2.3. EKSPERIMENTALNI PERIAPEKSNI PERIODONTITIS

Istorijski razvoj ovog modela doseže daleko u prošlost još od Milera koji je prvi utvrdio prisustvo bakterija u nekrotičnoj zubnoj pulpi ([Miller W.D., 1890.](#)). Kada su Kakehashi i saradnici ([Kakehashi S. et al 1965.](#)) utvrdili da se periapexne inflamatorne lezije ne mogu javiti kod *germ-free* laboratorijskih životinja koje se rađaju i čuvaju u sterilnim uslovima a da se relativno lako indukuju kod konvencionalno gajenih otvaranjem komunikacije između zubne pulpe i usne duplje, postalo je jasno da su uzročnici ovih promena mikroorganizmi. Osamdestih godina u naučnom svetu postojao

je konsenzus u mišljenju da bakterije (posebno anaerobi) imaju primarnu ulogu u etiologiji periapexnih lezija ([Lukić A. et al 2005.](#)). Još od šezdesetih godina 20. veka periapexne lezije su eksperimentalno izazivane na različitim životinjskim vrstama i to majmunima, psima, pacovima, kunićima i miševima. Izazivane su na različite načine, postavljanjem ligatura, ubrizgavanjem LPS-a u gingivu i otvaranjem zubne pulpe sa posledičnim prodorom mikroorganizama usne duplje što je ponekad potencirano ubrizgavanjem specifičnih patogena u tako nastali otvor na zubu i/ili naknadnim plombiranjem zuba.

Proces razvoja inflamatornih periapexnih lezija odvija se u dve faze pri čemu prvu fazu čini inicijalno oštećenje tkiva pod delovanjem mikroorganizama, a drugu lokalni inflamatorni odgovor pri čemu se stepen oštećenja progresivno povećava ([Nair P.N.R. 2004.](#)).

2.4. OŠTEĆENJE TKIVA

U eksperimentalnom modelu do prodora mikroorganizama usne duplje u zubnu pulpu dolazi usled bušenja rupica na zubima. Slično se dešava i prirodno kod karijesa, fraktura ali i kod naoko neoštećenih zuba kroz različite mikro-pukotine tvrdog zubnog tkiva. Do inficiranja pulpe dolazi i širenjem bakterija sa gingive i periodontalnih džepova putem oštećenih krvnih sudova i dobro vaskularizovanog korenog kanala ([Nair P.N.R. 2004.](#)). Kao posledica infekcije razvija se pulpitis i nekroza zubne pulpe.

Najčešće zubnu pulpu inficiraju patogene anaerobne bakterije *P.gingivalis*, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*, *P.intermedia* i druge. U zavisnosti od stepena oštećenja krunice zuba procentualna zastupljenost anaeroba varira a sem njih prisutni su i različiti sojevi *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacilus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *E.coli*. Ostali mikroorganizmi čine manje od 2% oralne mikroflore a ponekad se mogu uočiti i gljivice.

Svaki mikroorganizam koji inficira zubnu pulpu ima potencijal da inicira i periapexnu inflamaciju. Virulencija i patogenost pojedinih vrsta bakterija su različiti i zavise od prisustva drugih bakterija na mestu inflamacije. Neki slabo patogeni mikroorganizmi u prisustvu drugih bakterijskih vrsta postaju virulentni, a njihovo

preživljavanje duže. Sama patogenost pojedinih vrsta bakterija koje indukuju periapeksne lezije zavisi od četiri faktora (*Nair P.N.R. 2004.*):

- a. Interakcije i sinergizma sa drugim bakterijskim vrstama u korenom kanalu;
- b. sposobnosti ometanja i izbegavanja imunološkog sistema domaćina;
- c. oslobađanja lipopolisaharida (LPS) i drugih bakterijskih modulina;
- d. sinteze enzima koji oštećuju tkivo domaćina.

2.4.1 Interakcija bakterijskih vrsta

Utvrđeno je da eksperimentalna aplikacija pojedinih bakterijskih vrsta u otvorenu zubnu pulpu odnosno koreni kanal dovodi do periodontitisa srednjeg intenziteta dok se u kombinacijama od dve ili više bakterijskih vrsta razvija mnogo jači periapeksni inflamatorni proces (*Nair P.N.R. 2004.*). Ove interakcije mogu biti pozitivne (sinergističke) ili negativne (antagonističke) i zavise od uticaja pojedinih mikroorganizama na mikrofloru korenog kanala i pulpe oblikovanjem mikrosredine korišćenjem resursa kiseonika i nutritijenata (*Carlsson J. 1990.*).

2.4.2 Izbegavanje imunološkog sistema domaćina

Mikroorganizmi su tokom evolucije razvili niz mehanizama za izbegavanje, ometanje i zavaravanje imunološkog sistema domaćina. Bez ovih mehanizama njihov opstanak ne bi bio moguć.

Bakterijski lipopolisaharid (LPS) dovodi do pojačane ekspresije adhezivnih molekula na površini endotelih ćelija što inicira ekstravazaciju leukocita u oblasti infekcije. Uočeno je da karakteristični LPS koji luči *Porfiromonas gingivalis*, endodontni i periodontalni patogen, inhibira ekspresiju E-selektina na endotelnim ćelijama. Na taj način *P.gingivalis* blokira inicijaciju inflamatornog odgovora, krije se od imunološkog sistema domaćina i nesmetano umnožava (*Nair P.N.R. 2004.*). Periodontalni patogeni inhibiraju ili jačaju inflamatorno-imunološki odgovor domaćina u zavisnosti od toga šta je korisno za patogen pa tako *P.gingivalis* u početnoj fazi infekcije suprimira odbrambeni sistem domaćina a zatim ga stimuliše ne bi li oštećenjem tkiva došao do neophodnih nutritijenata (*Hajishengallis G. 2009.*).

Antigena sposobnost LPS javlja se u nekoliko formi kao npr. stimulacija B-limfocita na stvaranje neupotrebljivih nespecifičnih antitela. Gramnegativne bakterije oslobađaju pupljenjem delove ćelijske membrane i solubilne antigene koji deluju na efektivna antitela čineći ih nemoćnim protiv samog mikroorganizma (*Mims C.A. 1988.*) a pojedini mikroorganizmi stvaraju velike zgusnute kolonije koje fagociti domaćina teže uklanjaju.

2.4.3 LPS i drugi bakterijski modulini

LPS, nekada nazivani *endotoksinima*, su integralni deo ćelijskog zida gramnegativnih bakterija. Oslobađaju se pri dezintegraciji bakterija nakon njihove smrti a takođe tokom umnožavanja i rasta. LPS deluje interakcijom sa endotelnim ćelijama i makrofagima. Sem stimulacije ekspresije adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama LPS dovodi do aktivacije makrofaga koji onda sintetišu molekularne medijatore: tumor necrosis factor alpha (TNF α) i interleukine (IL).

Nije samo LPS produkt degradacije bakterija koji stimuliše ćelije sisara da sintetišu citokine. Čitav niz proteina, neki ugljeni hidrati i lipidi bakterijskog zida predstavljaju *moduline*, klasu molekula koji stimulišu sintezu citokina i odgovorni su za promene u tkivima domaćina (*Henderson B. et al 1996.*).

2.4.4 Enzimi

Bakterijska kolagenaza, hijaluronidaza, fibrinolizini i mnogobrojne proteaze su enzimi koji nisu direktno toksični ali omogućavaju širenje mikroorganizama u tkivu i organizmu domaćina.

Bakterije stvaraju i enzime koji dovode do degradacije različitih proteina krvne plazme uključenih u koagulaciju krvi i niz odbrambenih reakcija organizma domaćina. *Porphyromonas* i *Prevotella* npr. razgrađuju IgG, IgM i C₃ faktor komplementa kompromitujući opsonizaciju neophodnu za humoralni i fagocitni odgovor domaćina.

2.5. ODGOVOR ORGANIZMA NA OŠTEĆENJE TKIVA

Periapiksni periodontitis nastaje dinamičkom interakcijom bakterija korenog kanala zuba i lokalnog inflamatornog odgovora domaćina pri čemu glavno oštećenje tkiva nastaje usled delovanja ćelija imunološkog sistema.

Proces započinje u vidu inicijalnog, fokalnog periapexnog periodontitisa i karakteriše se hiperemijom, vaskularnom kongestijom, edemom periodontalnog ligamenta i ekstravazacijom neutrofilnih granulocita. Neutrofilni granulociti stižu na mesto inflamacije zahvaljujući hemotaksi izazvanoj inicijalnim oštećenjem tkiva, bakterijskim produktima (LPS) i faktoru komplementa C_{5a}. Integritet alveolarne kosti, cementa i dentina u ovoj fazi još nije narušen. Neutrofili (mikro-fagociti) ne deluju samo direktno na mikroorganizme već oslobađaju leukotriene i prostaglandine. LTB₄ privlači još više neutrofila i makrofaga u oblast inflamacije a kasnije aktivira osteoklaste i u roku od nekoliko dana počinje proces resorpcije alveolarne kosti oko vrha korena zuba što se može otkriti radiografijom. Neutrofili umiru na mestu inflamacije i oslobađaju enzime iz svojih citoplazmatskih granula sa posledičnom još izraženijom razgradnjom ekstraćelijskog matriksa i ćelija čime se sprečava širenje infekcije i stvara prostor za delovanje specijalizovanih ćelija odbrane. Tokom akutne faze i makrofagi se mogu uočiti oko apeksa korena zuba. Aktivirani makrofagi luče niz citokina od kojih proinflamatorni (IL-1 β , IL-6 i TNF α) i hemotaktični (IL-8) citokini imaju poseban značaj. Oni pojačavaju lokalni vaskularni odgovor, resorpciju koštanog tkiva od strane osteoklasta i degradaciju ekstraćelijskog matriksa i mogu dovesti organizam u stanje "uzbune" putem delovanja endokrinog sistema. Istovremeno se pojačava sinteza proteina akutne faze od strane hepatocita (*Lerner U.H. 1994.*) koji sa IL-6 stimulišu produkciju hematopoetskih GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) i trenutnu mobilizaciju neutrofila i prekursora makrofaga iz kostne srži. Akutni odgovor može i da se pojača u kasnijim fazama formiranjem antigen-antitelo kompleksa.

Ishod akutnog periapexnog zapaljenja može biti: spontano zalečenje, dalje intenziviranje procesa i širenje u alveolarnu kost (alveolarni apsces), nastajanje fistule ili proces postaje hroničan.

Prolongirano prisustvo bakterija i iritanata dovode do hroničnog periapexnog periodontitisa kada u inflamatornim infiltratima umesto neutrofilnih granulocita dominiraju mononuklearne ćelije (makrofagi, limfociti i plazmociti) u kolagenom vezivnom tkivu. Makrofagi vrše ingestiju i obradu ćelijskog detritusa nekrotičnih područja i sekretuju citokine. Proinflamatorni citokini makrofaga (IL-1 β , IL-6 i TNF α) snažno stimulišu limfocite. Aktivisani T-limfociti proizvode niz citokina koji inhibiraju

lučenje proinflamatornih citokina smanjujući na taj način aktivnost osteoklasta i resorpciju kosti. Oni stimuliraju sintezu TGF β i posledično tome proliferaciju fibroblasta i produkciju kolagena uz pojačanu neovaskularizaciju inflamiranog regiona. Po ranijim shvatanjima u ovaj proces uključene su T_h1 i T_h2 subpopulacije pomoćničkih T-ćelija ([Gemmel E. et al 2002.](#)) a danas su poznate još dve subpopulacije i to T_h17 i T_{treg}.

Navedeni procesi mogu dovesti do smanjenog nivoa degradacionih procesa u tkivu i eventualno potpunog odsustva resorpcije koštanog tkiva u ovoj fazi inflamacije. Istovremeno proliferiraju mlado vezivno tkivo koje popunjava nastale defekte i nastaju asimptomatske lezije.

Hronične periapeksne lezije mogu dugo ostati asimptomatske sve dok se, iz nekog razloga, ne naruši tkivna homeostaza kada mikroorganizmi iz korenog kanala prelaze u periapeksni prostor a proces opet dobija akutnu formu.

Ishod hroničnog periapexnog periodontitisa može biti formiranje periapexnih granuloma koji se sastoje od granulomatoznog tkiva sa inflamatornim ćelijama, fibroblasta i matriksa sa ponekad dobro razvijenom vezivno-tkivnom kapsulom. Smatra se da u oko 50% hroničnih periapexnih lezija dolazi do epitelizacije. Epitelne ćelije Malasezovih ostrvaca proliferiraju nasumično formirajući iregularnu epitelnu masu. Ponekad epitel urasta i u sam apiksni otvor. U oko 15% slučajeva sa epitelizacijom nastaju periapexne ciste ([Nair P.N.R. 2004.](#)).

Ekstra-epitelno tkivo sastoji se predominantno od sitnih krvnih sudova, limfocita, plazmocita i makrofaga. T-limfociti su često brojniji od B-limfocita a CD4⁺ ćelije brojno premašuju CD8⁺ limfocite ([Nair P.N.R. 2004.](#)).

2.6. CITOKINI I NJIHOVA FUNKCIJA

Inflamacija je kompleksan niz dešavanja koji obuhvata mnoge tipove ćelija koje međusobno komuniciraju na različite načine. Citokini su otkriveni pre skoro pola veka kao mali proteini ili polipeptidi koji učestvuju u međućelijskoj komunikaciji. Mogu delovati autokrino, jukstakrino, parakrino, endokrino ili intraćelijski i grupišu se po zajedničkim biološkim karakteristikama što je prikazano u *tabeli 1*:

Tabela 1. Podela citokina (*Schmitz M.L. et al 2011.*)

KLASA CITOKINA PO FUNKCIJI	GLAVNI FIZIOLOŠKI I PATOFIZIOLOŠKI EFEKTI	CITOKINI
CITOKINI KOJI STIMULIŠU UROĐENI IMUNOLOŠKI ODGOVOR		
PROINFLAMATORNI CITOKINI	inflamatorni medijatori, urođeni imunološki odgovor, aktivacija najvećeg broja ćelijskih tipova, pro metastatsko delovanje, resorpcija kostiju, proteini akutne faze	IL-1 α, IL-1 β, TNFα, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, IL-32, IL-33, IL-34, IL-36, MIF, CD40L, RANKL
HEMOKINI	pro-matastatska emigracija ćelija, neovaskularizacija, infiltracija leukocita, aktivacija velikog broja ćelijskih tipova	IL-8 (CXCL8), MCP1 (CCL2), MIP1α(CCL3), Rantes (CCL5), Groα/β/γ(CXCL1,2,3), MIF, ostali
CITOKINI KOJI REGULIŠU FUNKCIJE STEČENOG IMUNITETA		
RAST LIMFOCITA I FAKTORI DIFERENCIJACIJE	klonalna ekspanzija T-ćelija, Th1/TH2/TH17 odgovori, Th1/Th2/Th17 polarizacija, aktivacija B-ćelija, rast B-ćelija, auto-imunološki odgovor	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, IL-33, IL-35, IFNγ
CITOKINI KOJI SMANJUJU INTENZITET UROĐENOG IMUNOLOŠKOG ODGOVORA		
ANTIINFLAMATORNI CITOKINI	smanjuju proizvodnju inflamatornih medijatora, snižavaju smrtnost usled delovanja citokina, snižavaju autoimune i autoinflamatorne bolesti, stimulišu fibrozu tkiva, ispoljavaju anti-tumorske efekte	IL-10, IL-13, TGFβ, IL-22, IL-37 IL-1 Ra, IFNα/β
INTERFERONI		
TIP II IFN	stimulacija aktivacije makrofaga, pojačana ekspresija MHC II klase	IFNγ
TIP I IFN	anti-virusno delovanje, pojačana ekspresija MHC I klase, anti-inflamatorno i anti-angiogeno delovanje	IFNα, IFNβ

Specifični receptori domaćina - PRR vezuju se za molekularne obrasce patogena - PAMP i molekularne obrasce koji nastaju usled oštećenja tkiva - DAMP i njihova aktivacija dovodi do sinteze i oslobađanja proinflamatornih citokina (interleukini npr. IL-1, IL-6, IL-33), TNF α , hemokina i faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF). Navedeni citokini vrše koordinaciju ćelijskog odgovora domaćina radi savladavanja infekcije. PAMP su produkti patogenih mikroorganizama (*Takeuchi O., Akira S. 2010.*) a DAMP su okidači sterilne inflamacije endogenim medijatorima ili delovanjem

egzogenih stresnih faktora (*Chen G.Y., Nunez G. 2010., McDonald et al 2010.*). Citokine ne proizvode žlezde već ih može sintetisati bilo koja ćelija u organizmu koja ima jedro.

Oslobodjeni citokini mogu se vezati za sopstvene receptore i na taj način pojačati urođeni imunološki odgovor. Brza reakcija urođenog imuniteta je neophodna za borbu protiv niza brzo rastućih patogena a citokini pojačavaju izvorne signale gradeći mrežu regulatornih funkcionalnih petlji. Kada je infekcija savladana, i kada patogen više nije prisutan, inflamatorni proces se kontrolisano zaustavlja procesima jake negativne povratne sprege, koji se takođe ostvaruju kroz regulatorne petlje (*Schmitz M.L. et al 2011.*). Antigen prezentujuće ćelije (APĆ) a posebno dendritske ćelije (DĆ) su od suštinske važnosti za polarizaciju T pomoćničkih limfocita (T helper, Th) ka T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} ili ka T regulatornim limfocitima (T_{reg}) (*de Jong et al 2005.*). Glavni medijatori T_{h1} imunološkog odgovora, proinflamatorni citokini $IFN\gamma$, IL-1, IL-6 i $TNF\alpha$, uključeni su u progresiju inflamatornih lezija i razgradnju kosti u periapexnom periodontitisu kod ljudi (*Čolić M. et al 2009.*). Nasuprot tome imunosupresivni medijatori $TGF\beta$ i T_{h2} citokini IL-4, IL-5 i IL-10 odgovorni su za proces zalečenja i prestanak inflamacije (*Čolić M. et al 2009.*). IL-17 preko stimulacije lučenja IL-8 verovatno igra ulogu u egzacerbaciji inflamatornog procesa u periapexnim lezijama (*Čolić M. et al 2007.*) dok T regulatorne ćelije ispoljavaju imunosupresivno i antidestruktivno delovanje.

Citokini IL-12 familije (IL-12p70 se sastoji od p35 i p40 subjedinica, IL-23 od p19 i p40, a IL-27 od Epstein-Barr virusom indukovano molekula 3 i p28), koje proizvode pre svega DĆ i aktivisani makrofagi, su važna veza između urođenog i stečenog imuniteta (*Čolić M. et al 2009.*) i jaki su promotori T_{h1} subpopulacije limfocita.

Proinflamatorni citokini luče se veoma rano u odbrani protiv različitih stresnih faktora i uključeni su u urođeni i stečeni imunološki odgovor. Pripadaju različitim familijama i to IL-1, IL-6, $TNF\alpha$ i molekuli TNF familije promotori inflamatorne reakcije domaćina kao npr. limfotoksin α ($TNF\beta$), limfotoksin $\alpha\beta$, LIGHT, CD40 ligand, Fas ligand, CD30 ligand, CD27 ligand, 4-1BB ligand i OX40 ligand (*Beutler B. and Cerami A. 1989., Kishimoto T. et al 1992., Smith C.A. et al 1994., Dinarello C.A. 1998.*).

Ostali važni proinflamatorni citokini su $IFN\gamma$ i IL-2 koje proizvode T_{h1} ćelije kao i $IFN\alpha/\beta$ (*Smith K.A. 1988.*). Interferoni su pre svega medijatori urođenog imuniteta ali

su uključeni i u procese aktivacije stečenog imuniteta. IFN γ je snažan aktivator antigene prezentacije i ekspresije MHC molekula II klase dok su svi interferoni (α , β i γ) istovremeno stimulatori ekspresije MHC molekula I klase. Važnost interferona u aktivaciji stečenog imunološkog odgovora ogleda se u činjenici da su od svih citokina jedino interferoni, ako se abnormalno ekspimiraju na lokalnom nivou kod transgenih miševa, sposobni da indukuju autoimuno oboljenje zavisno od T ćelija kao što je diabetes mellitus ([Sarvetnick N. et al 1988.](#)).

Hemokini, članovi najbrojnije familije citokina, su osim svoje glavne funkcije hemoatraktanata i aktivatora leukocita uključeni u procese urođenog imunološkog odgovora i deluju proinflamatorno ([Kunkel S.L. et al 1996.](#)).

Dokazano je i da visoka produkcija i oslobađanje TNF α i IL-1 može inflamatorni proces odvesti neželjenim putem. Naime, proinflamatorni citokini, veoma važni za aktivaciju stečenog imunološkog odgovora i eliminaciju različitih patogena, mogu ponekad da dovedu i do razvoja autoimunih oboljenja. Delovanje proinflamatornih citokina zavisi od situacije i čitavog niza kvantitativnih i kvalitativnih faktora. Najznačajnije determinante njihove aktivnosti su koncentracija, trajanje i nivo ekspresije njihovih receptora na površini ćelija.

Inflamacija je regulisana i koncentracijom inhibitora citokina npr. sinergički deluju TNF α i IL-1 a antagonistički TNF α i antiinflamatorni IL-10.

Zbog svega navedenog jako je teško predvideti *in vivo* efekat i ulogu citokina dobro proučenih u *in vitro* modelima. Ni sve popularnija metoda relativne kvantifikacije iRNK korišćenjem real-time PCR ne prikazuje funkciju citokina u određenom trenutku zato što količina iRNK ne mora uvek da ukazuje na efekat citokina na lokalnom nivou mada je baš to najčešći slučaj ([Feldmann M. and Saklatvala J. 2004.](#)).

2.6.1. Citokini u periodontalnim lezijama

Porphyromonas gingivalis, mikroorganizam zubnog plaka, prisutan je u subgingivalnoj mikroflori pacijenata sa periodontalnom inflamacijom. On poseduje više različitih faktora virulencije koji, u interakciji sa periodontalnim tkivom, dovode do destruktivnog zapaljenskog procesa. Tu spada pre svega karakteristični LPS ali i drugi

faktori kao što su proteaze, hemaglutinini i fimbrije (*Taylor J.J. 2010.*). U novije vreme posebna pažnja posvećena je odnosu patogenih mikroorganizama i domaćina u interakciji PAMP/PRR i posledičnim signalnim putevima sekrecije citokina (*Kawai T. and Akira S. 2009.*). Ti rani događaji u prepoznavanju mikroorganizama od strane imunološkog sistema predstavljaju mehanizam aktivne regulacije inflamatornog odgovora. U zavisnosti od tipa bakterija koje dominiraju u dentalnom plaku i inflamatorni odgovor organizma će imati različite karakteristike. Posledica ovih prepoznavanja je modifikacija sinteze, obrade i sekrecije citokina koji vrše modulaciju i stimulaciju imunološkog odgovora domaćina. Citokini koji pokreću procese urođenog imuniteta i trenutnu zaštitu tkiva domaćina takođe su uključeni u humoralni i ćelijski imunološki odgovor. U slučaju perzistentne stimulacije prisustvom mikroorganizama zubnog plaka i njihovih produkata citokini deluju u pravcu destruktivnog tipa inflamacije karakterističnog za periodontitis. Citokinski milje je centralni regulator inicijacije, organizacije i funkcionisanja imunološkog odgovora tokom periodontitisa.

Citokini Interleukin-1 grupe omogućavaju normalno funkcionisanje urođenog imuniteta, regulaciju stečenog imunološkog odgovora i utiču na oštećenje tkiva tokom hronične inflamacije (*Barksby H.E. et al 2007.*).

IL-1 β (IL-1F2) indukuje sintezu i ekspresiju ostalih važnih medijatora npr. sintezu prostaglandina E₂, faktora aktivacije trombocita i azot oksida (NO), aktivirajući enzime neophodne za njihovu sintezu. On pojačava nivo ekspresije adhezivnih molekula, kao što su ICAM-1 i E-selektin na endotelnim ćelijama, i stimuliše sekreciju CXCL8 (IL-8) od strane keratinocita. IL-8 i slični hemokini stimulišu infiltraciju neutrofila u inflamirano tkivo. IL-1 β je sinergista sa ostalim proinflamatornim citokinima u indukovanju resorpcije kosti važnom obeležju hroničnog periodontitisa (*Stashenko P. et al 1987.*). IL-1 β ima važnu ulogu u stečenom imunitetu jer učestvuje u diferencijaciji ključnih APĆ kao što su dendritske ćelije i utiče na diferencijaciju i funkciju subpopulacija T-pomoćničkih limfocita. Stimulacija diferencijacije dendritskih ćelija je direktna veza između sinteze IL-1 β i stečenog imuniteta (*Wesa A., Galy A. 2002.*). Sem toga IL-1 β stimuliše sekreciju IL-6 od strane makrofaga i posledično aktivaciju B-limfocita a pojačava antigenu stimulaciju T-limfocita (*Ben-Sasson S.Z. et al 2009.*). IL-1 β važan je i za nastajanje CD4⁺ T-limfocita koji luče IL-17 a i za produkciju IL-23 koji

stimuliše lučenje IL-17 od strane navedenih ćelija ([Harris K.M. et al 2008.](#)). IL-1 β i IL-17 deluju sinergistički i stimulišu dalju produkciju IL-1 β čime funkcionišu po principu pozitivne povratne sprege.

IL-1 β je od suštinskog značaja u patogenezi periodontitisa. Imunohistohemijske studije pokazuju da se ovaj medijator nalazi u *lamina propria* gingive u većoj količini u makrofagima vezivnog tkiva ([Matsuki Y. et al 1993.](#)) i u malobrojnim IL-1 β ⁺ ćelijama u epitelu. Nivo ovog citokina raste u gingivalnoj ekstraćelijskoj tečnosti tokom razvoja gingivitisa uzrokovanog plakom i aktivnog periodontitisa ([Lee H.J. et al 1995.](#)) i u korelaciji je sa intenzitetom oboljenja. *In vitro* istraživanja pokazala su da većina ćelijskih tipova periodoncijuma sintetiše IL-1 β a istraživanja na animalnim modelima da njegovo dodavanje dovodi do egzacerbacije inflamacije i resorpcije alveolarne kosti ([Koide M. et al 1995.](#)).

IL-1 α je intraćelijski protein u svojoj prekursorskoj formi ili se eksprimira na ćelijskoj membrani a inače se ne sekretuje pa ga nema u ekstraćelijskoj sredini i cirkulaciji ([Dinarello C.A. 2009.](#)). Verovatno deluje kao autokrini faktor rasta važan za rast i diferencijaciju endotelnih ćelija, epitelnih ćelija i fibroblasta ([Dinarello C.A. 2009.](#)). Pošto se konstitutivno eksprimira on verovatno učestvuje u inflamaciji tokom oslobađanja iz nekrotičnih ćelija i tkiva kao neka vrsta *alarmnog citokina*. Takođe se eksprimira na površini monocita i u ovoj formi stimuliše imunološki odgovor preko direktnih interakcija između ćelija (npr. sekreciju IL-8) ([Kaplanski G. et al 1994.](#)) a ispoljava i niz efekata na osteoblaste i osteoklaste koji mogu biti važni za proces razgradnje alveolarne kosti tokom periodontitisa ([Tanabe N. et al 2005.](#)).

TNF α je uz IL-1 β primarni medijator urođenog imuniteta koji se sekretuje kao posledica direktnog stimulusa na ćeliju domaćina i aktivira mehanizme imunološkog odgovora preko sekundarnih molekularnih medijatora ([Ware C.F. 2003.](#)). TNF α ima veliki broj zajedničkih dejstava sa IL-1 β (sinteza hemokina, adhezivni molekuli, prostaglandin E₂) i u istraživanjima na TNF α deficijntnim nokaut miševima utvrđeno je da su oni jako prijemljivi na infekcije ukazujući na fundamentalni značaj ovog citokina.

TNF α pojačava aktivnost fagocitnih ćelija, npr. neutrofila, indukuje sekreciju metaloproteinaza matriksa (MMP) i stimuliše razvoj ćelija mijeloidne loze

(osteoklasta). On ograničava reparaciju tkiva indukujući apoptozu fibroblasta što sve zajedno govori o ulozi ovog citokina u razvoju destruktivnog periodontitisa.

Hemokini su velika grupa molekula čija je osnovna uloga hemotaksa i na osnovu strukturnih razlika podeljeni su u dve subfamilije i to CC i CXC. Sintetišu ih različiti tipovi imunoloških i somatskih ćelija i imaju ključnu ulogu u privlačenju neutrofila i ostalih imunokompetentnih ćelija na mesto inflamacije. Najveći broj istraživanja do sada fokusiran je na ulogu hemokina CXCL8 (IL-8) u periodontitisu. IL-8 pronađen je u tkivu desni ispod epitela tamo gde je tkivo izloženo delovanju zubnog plaka uz prisustvo infiltrata neutrofilnih granulocita ([Taylor J.J. 2010.](#)). IL-1 β verovatno stimuliše sekreciju IL-8 od strane keratinocita u usnoj duplji ali direktna interakcija bakterija i ovih ćelija dovodi do povećane sekrecije IL-8 i pojačane ekspresije ICAM-1 na gingivalnom epitelu što ima za posledicu migraciju neutrofila u epitel i gingivalni žleb ([Tonetti M.S. 1997.](#)). Hemokini takođe učestvuju u regulaciji aktivnosti osteoklasta utičući na diferencijaciju mijeloidnih ćelija u osteoklaste kao i u preživljavanju ovih ćelija što može biti važno za razvoj destruktivnog periodontitisa ([Silva T.A. et al 2007.](#)).

IL-6 grupa citokina koja uključuje još IL-11, faktor inhibicije leukemije (LIF) i onkostatin M (OSM) deli zajednički način prenošenja signala preko glikoproteina 130 (Gp 130) ([Taga T. and Kishimoto T. 1997.](#), [Heinrich P.C. et al 2003.](#)).

IL-6 je plejotropni citokin, kao i IL-1 β i TNF α , koji se sekretuje u ranoj fazi imunološkog odgovora ([Kishimoto T. 2005.](#)). Aktiviraju ga brojni citokini uključujući IL-1 β i TNF α a produkuje ga široki spektar imunokompetentnih ćelija i to aktivisani T-limfociti, B-limfociti i mijeloidne ćelije, pre svih makrofagi i dendritske ćelije i neke ćelije koje ne pripadaju imunološkom sistemu kao npr. keratinociti, endotelne ćelije i fibroblasti ([Taylor J.J. 2010.](#)). Sem sistemskih IL-6 ispoljava brojne aktivnosti vezane za lokalni imunološki odgovor karakterističan za periodontitis. Pre svega on je regulator proliferacije i diferencijacije B-limfocita ([Kishimoto T. 2005.](#)) a takođe je važan za diferencijaciju dendritskih ćelija ([Park S.J. et al 2004.](#)). Sekretuju ga i osteoblasti stimulišući resorpciju kosti i razvoj osteoklasta ([Taylor J.J. 2010.](#)). IL-6 je stimulator diferencijacije T-limfocita i ima centralnu ulogu u balansu različitih subpopulacija ovih ćelija a posebno u aktivaciji T pomoćničkih ćelija koje sekretuju IL-17 promovišući T_H17 odgovor. U nedostatku IL-6 (neinflamatorno stanje npr.) TGF β aktivira

imunosupresorske regulatorne T-ćelije, međutim u prisustvu IL-6 dolazi do diferencijacije pomoćničkih T-limfocita u IL-17 sekretujuće ćelije i jačanja imunološkog odgovora (*Bettelli E. et al 2006.*).

IL-6 je prisutan u tkivima i ćelijama tokom periodontitisa a smatra se da utiče na diferencijaciju monocita u osteoklaste i na propadanje koštanog tkiva tokom ovog patološkog procesa. Takođe utiče na diferencijaciju i proliferaciju B-limfocita u periodoncijumu.

Korišćenjem IL-6 deficijentnih nokaut miševa i izazivanjem periodontitisa putem oralne infekcije bakterijom *P.gingivalis* utvrđeno je da je propadanje alveolarne kosti kod ovih životinja slabije izraženo u odnosu na kontrolne miševe koji imaju IL-6 (*Baker P.J. et al 1999.*).

Neki autori su pratili balans proinflamatornih u odnosu na antiinflamatorne citokine tokom periodontalnog oboljenja (*Gemmell E. and Seymour G.J. 2004.*). IL-10 familija citokina je visoko plejotropna a ovi citokini, posebno IL-10 deluju imunosupresivno (*Commins S. et al 2008.*). IL-10 sekretuju regulatorne T-ćelije, monociti i B-ćelije i svoju imunosupresivnu ulogu ostvaruje na sekreciju citokina T_h1 i T_h2 tipa ćelija, monocita, makrofaga i NK ćelija. Mnogi njegovi efekti često su indirektni i ostvaruju se primarnim efektom na monocitima, makrofagima i dendritskim ćelijama (*Commins S. et al 2008.*).

Istraživanja na animalnim modelima periapeksnog periodontitisa ukazuju na ključnu ulogu IL-10 u smanjenom intenzitetu destruktivnih inflamatornih procesa jer je kod IL-10 deficijentnih nokaut miševa razgradnja i resorpcija alveolarne kosti izraženija. U istom modelu IL-12p40 i IL-10 deficijentni miševi rezistentni su na gubitak kosti (*Sasaki H. et al 2008.*) što ukazuje da je IL-12p40 odgovoran za destruktivni oblik inflamacije u ovom modelu (preko T-limfocitnih subpopulacija) a ovu aktivnost normalno suprimira IL-10.

IL-10 familija citokina takođe obuhvata i niz citokina otkrivenih u novije vreme kao IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 i IL-29 koji još nisu ispitivani u modelu periapeksnih lezija.

TGFβ je visoko plejotropan antiinflamatorni medijator sa mnogo imunoregulatornih funkcija pre svega u regulaciji diferencijacije subpopulacija

pomoćničkih T-limfocita a važan je u regeneraciji i reparaciji tkiva jer učestvuje u metabolizmu kolagena u fibroblastima.

2.6.2. Citokini i subpopulacije T-limfocita

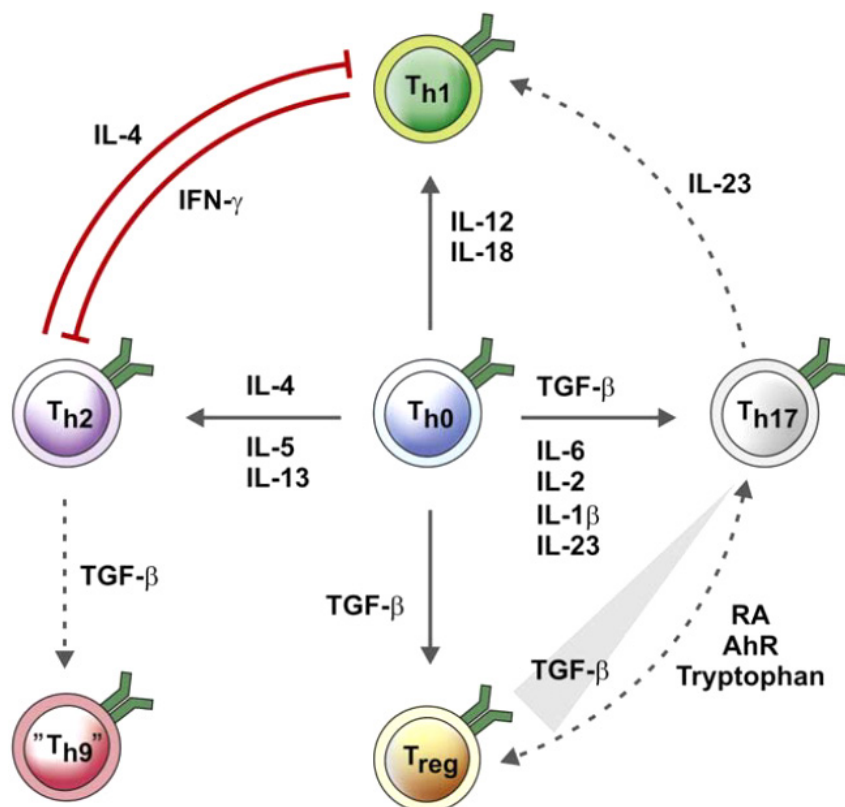
Citokini imaju dve važne uloge u razvoju i aktivnosti T-limfocita a to su: regulacija diferencijacije T-ćelija u posebne subpopulacije i regulacija njihove aktivnosti. Istovremeno igraju ulogu u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru i ove dve uloge se prepliću pri čemu je delovanje IL-1 β na diferencijaciju D δ faktor koji ih povezuje.

Mnogi citokini različitih subpopulacija T-limfocita deluju u sistemu pozitivne povratne sprege i petlji stimulišući aktivaciju i diferencijaciju ćelija od kojih potiču istovremeno inhibirajući razvoj drugih subpopulacija. Brojne subpopulacije CD4⁺ T-ćelija definišu se na osnovu fenotipskih karakteristika i efektorskih funkcija. T-pomoćničke ćelije tipa 1 (T_h1) aktiviraju se delovanjem IL-12 i IL-18 i sekretuju IFN γ koji aktivira makrofage, NK ćelije i CD8⁺ T-limfocite ([Taylor J.J. 2010.](#)). T-pomoćničke ćelije tipa 2 (T_h2) aktiviraju se delovanjem IL-4 i učestvuju u regulaciji humoralnog imuniteta i funkcije mast ćelija preko sekrecije IL-4, IL-5 i IL-13 ([Taylor J.J. 2010.](#)). Istovremeno IL-4 i IFN γ inhibiraju razvoj T_h1 i T_h2 ćelija kao i drugi citokini (IL-10 inhibira T_h1 ćelije) sa regulatornom funkcijom.

U novije vreme definisane su i druge subpopulacije T-limfocita. Pod delovanjem IL-2 i TGF β diferenciraju se regulatorne T-ćelije koje deluju imunosupresivno sekrecijom TGF β i važne su za prevenciju autoimunih oboljenja ([Waldman H. and Cobbold S. 2009.](#)). TGF β je važan citokin u razvoju IL-17 sekretujućih T-ćelija kada su prisutni i IL-6, IL-21 i IL-23 ([Korn T. et al 2009.](#)).

IL-17 sekretujuće T-ćelije ispoljavaju proinflamatorno delovanje važno za imunološki odgovor protiv ekstraćelijskih infekcija preko IL-17. T-ćelije koje sekretuju IL-17 ili regulatorne T-ćelije dominiraju u zavisnosti od količine i odnosa IL-6 i IL-23 i TGF β koji determinišu razvojni put naivnih T-ćelija ([Dorhoi A. and Kaufmann S.H. 2009.](#), [Korn T. et al 2009.](#)).

Šema 1: citokini i subpopulacije T-limfocita (Dorhoi A. and Kaufmann S.H. 2009.)



Različiti mikroorganizmi interakcijom svojih molekularnih obrazaca i TLR dovode do nastanka različitih T-ćelijskih subpopulacija preko dendritskih ćelija i njihovih citokina koji determinišu tip subpopulacije (Dorhoi A. and Kaufmann S.H. 2009.) (Šema 1.).

Iako u periapexnim lezijama i periodontitisu proinflamatorni citokini deluju već u ranoj fazi oboljenja tokom urođenog imunološkog odgovora limfociti su često dominantne ćelije u inflamatornim infiltratima. Smatra se da fenotipske razlike između T-limfocita karakterišu različite faze periodontalnog oboljenja i različite kliničke simptome pojedinih lezija. Pošto se subpopulacije ovih ćelija razlikuju po tipu citokina koje sekretuju detekcijom količine pojedinih citokina u tkivu a na osnovu njihovog međusobnog odnosa može se odrediti faza periodontitisa.

Smatralo se da jak urođeni imunološki odgovor dovodi do sinteze IL-12 od strane tkivnih makrofaga, Th1 tipa ćelija i sekrecije IFN γ koji opet aktivira makrofage, NK ćelije i citotoksične T-limfocite omogućavajući jak ćelijski odgovor (Seymour G.J. and Gemmell E. 2001.). Ovo je tzv. stabilna periodontalna lezija. Slab urođeni odgovor dovodi do lučenja smanjene količine IL-12 što omogućava razvoj IL-4 zavisnog Th2

odgovora, aktivacije B-limfocita i razvoja destruktivnih periodontalnih lezija verovatno usled pojačanog lučenja IL-1 β (B-limfociti) (*Seymour G.J. and Gemmell E. 2001.*). Ova shvatanja su novijim istraživanjima ozbiljno dovedena u pitanje.

U novije vreme utvrđeno je da T_h1/T_h2 model ne može da objasni brojne eksperimentalne rezultate i sve aspekte regulacije stečenog imunološkog odgovora (*Gor D.O. et al 2003.*) kao npr. T-ćelijsku regulaciju delovanja neutrofilnih granulocita (*Waldman H. and Cobbold S. 2009.*). Ključni trenutak bio je otkrivanje nove subpopulacije T-pomoćničkih ćelija koje sekretuju IL-17 i njegove sinergističke uloge sa IL-1 β i TNF α tokom inflamatornog odgovora i razvoja destruktivnog periodontitisa. U stvari subpopulacija T-ćelija koje luče IL-17 omogućava razvoj inflamatornog odgovora koji je u stanju da ukloni infektivne mikroorganizme koje T_h1 i T_h2 ćelije nisu u stanju da eliminišu (*Korn T. et al 2009.*).

Infekcije različitim patogenima dovode do jakog T_h17 odgovora i sekrecije IL-17 (IL-17A), IL-17F kao i IL-21 i IL-22 (*Korn T. et al 2009.*). Interleukin-21, član IL-2 familije citokina ne indukuje samo diferencijaciju IL-17 sekretujućih T-ćelija (sa TNF β i IL-6) već mehanizmom pozitivne povratne sprege dovodi do stimulacije ekspanzije B-limfocita i sinteze različitih antitela (*Etinger R. et al 2005.*). IL-17 sekretuju ćelije koje pripadaju i urođenom i stečenom imunitetu kao npr. $\gamma\delta$ T-ćelije, NK ćelije, neutrofili, eozinofili ali glavni izvor ovog citokina su pomoćničke T-ćelije.

IL-17 ispoljava niz proinflamatornih aktivnosti i deluje sinergistički sa IL-1 β a posebno sa TNF α stimulišući sintezu niza citokina (i IL-1 β i TNF α) od strane makrofaga i ekspresiju hemokina sa posledičnom infiltracijom neutrofilnih granulocita (*Taylor J.J. 2010.*). IL-17 ispoljava proinflamatorni potencijal i tokom periodontitisa stimulacijom lučenja IL-6 i IL-8 hemokina od strane fibroblasta i delujući sinergistički sa IFN γ izaziva sekreciju niza medijatora od strane ovih ćelija. IL-17 u kulturi gingivalnih fibroblasta dovodi do stvaranje matriksnih metaloproteinaza 1 i 2 (*Beklen A. et al 2007.*) a pojačava i sekreciju IL-1 β i TNF α (preko TLR) u kulturi gingivalnih epitelih ćelija (*Beklen A. et al 2009.*).

U mišijem modelu periodontitisa izazvanog infekcijom *P.gingivalis* nedostatak IL-17 receptora (IL-17RA nokaut miševi) dovodi do pojačane razgradnje alveolarne

kosti što ukazuje na protektivnu ulogu IL-17 u homeostazi kosti verovatno preko uticaja na funkciju neutrofila (*Yu J.J. et al 2008.*, *Yu J.J. et al 2007.*).

Uloga autoimunog oboljenja kao elementa hroničnog periodontitisa nije isključena (*Gemmell E. et al 2007.*) i verovatno je da regulatorne pomoćničke T-ćelije igraju ulogu u modulaciji ovog oboljenja.

Već dugi niz godina moguće je detektovati ekspresiju gena za citokine u tkivu odnosno količinu iRNK korišćenjem DNK mikročipova (DNA microarrays) ili real-time PCR (qPCR) ili na nivou sekretovanih proteina korišćenjem antitela ali dosadašnji broj ovakvih studija na periodontalnim ćelijama ili tkivima je relativno mali. Koristeći DNK mikročipove Wang i saradnici (*Wang P.L. et al 2003.*) prikazali su simultanu povećanu ekspresiju gena za IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF α kao i pojačanu ekspresiju receptora CD14, TLR-2, TLR-4 u gingivalnim fibroblastima pacijenata sa periodontitisom u odnosu na zdrave kontrole.

Tradicionalni pogled na ulogu citokina u periodontitisu ostaje nepromenjen jer na osnovu znanja o funkciji pojedinih citokina, i na osnovu studija o periodontalnim lezijama uopšte, jasno je da inicijalni citokinski odgovor pokreće urođeni imunitet i inflamaciju. Proinflamatorni citokini IL-1 β , TNF α i IL-6 su primarni signalni citokini koji dominiraju u periodontalnim lezijama i aktiviraju urođeni imunološki odgovor. Skorašnje studije otkrivaju i druge citokine funkcionalno slične IL-1 β i IL-6 (*Barksby H.E. et al 2007.*) ali njihova uloga u periodontitisu tek treba da bude istražena, a IL-17 je proinflamatorni citokin od velike važnosti.

2.6.3. Bakterije zubnog plaka i citokini

Interakcija *P.gingivalis* i ćelija domaćina važan je element patogenosti ovog mikroorganizma prisutnog i izučavanog u različitim tipovima periapeksnih lezija. Adhezija velike fimbrije (FimA) koja se vezuje za integrine domaćina i sekrecija bakterijskih proteaza su neophodni za invazivnost *P.gingivalis* na šta ćelije domaćina reaguju sekrecijom citokina i pojačanom ekspresijom različitih molekula na svojoj površini. Od vrsta bakterija koje se nalaze u zubnom plaku zavisi i imunološki odgovor domaćina ali i od uslova pod kojima se sprovode različite studije na pacijentima i animalnim modelima. Kao primer može da posluži studija u kojoj u kulturi epitelnih

ćelija gingive *P.gingivalis* smanjuje sekreciju IL-8 dok druge bakterije usne duplje stimulišu jako lučenje ovog hemokina ([Taylor J.J. 2010.](#)), a istovremeno *P.gingivalis* inhibira IL-8 odgovor na druge bakterije. Ova inhibicija kao i smanjena ekspresija E-selektina na endotelnim ćelijama lokalnih krvnih sudova može značajno da utiče na smanjenu migraciju neutrofila. Ovo nije univerzalan nalaz jer u velikom broju studija infekcija *P.gingivalis* stimuliše produkciju citokina IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF α .

U studiji Handfilda i saradnika ([Handfield M. et al 2008.](#)) prikazana je uporedna analiza ekspresije gena za citokine humanih gingivalnih keratinocita inficiranih sa četiri različite bakterije zubnog plaka: *P.gingivalis*, *A.actinomyetemcomitans*, *F.nucleatum* i *S.gordonii*. Ove vrste bakterija odabrane su zbog svog međusobno različitog patogenog potencijala, a i različitih faza oboljenja u kojima su prisutne. *S.gordonii* je rani kolonizator, *F.nucleatum* je prisutan u plaku zdravih individua ali i kod pacijenata sa periodontitisom dok su *P.gingivalis* i *A.actinomyetemcomitans* obično prisutni kod već uznapređovalog periodontalnog oboljenja ([Marsh P.D. et al 2009.](#)). Handfield i saradnici pokazali su da su promene u ekspresiji gena specifične za vrstu mikroorganizma i da citokinski odgovor nema mnogo zajedničkih karakteristika kada se međusobno uporede ove četiri vrste bakterija ([Handfield M. et al 2008.](#)).

Invazivna sposobnost *P. gingivalis* znatno je izraženija u odnosu na *A. actinomyetemcomitans* ([Handfield M. et al 2005.](#)), a postoje i razlike u patogenosti ovih bakterija ali ove karakteristike izgleda da ne utiču na nivo pojedinih citokina i njihov međusobni odnos. Signalni putevi zajednički su za navedene četiri bakterijske infekcije ali se pojedinačni geni različito eksprimiraju.

U Handfildovoj studiji *P.gingivalis* i *A.actinomyetemcomitans* dovode do povećane ekspresije gena za IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 i IL-8. *P.gingivalis* smanjuje ekspresiju gena za IL-3 dok je *A.actinomyetemcomitans* povećava ali smanjuje ekspresiju gena za IL-11 i IFN α 17. *P.gingivalis* povećava ekspresiju gena za IL-12 α i β ([Handfield M. et al 2008.](#)).

Delovanje *F.nucleatum* i *S.gordonii* slabije je izraženo jer *F.nucleatum* povećava ekspresiju samo gena za IL-1 α i IL-23 α a smanjuje ekspresiju gena za IL-8, IL-11 i IFN α 15. *S.gordonii* povećava ekspresiju gena za IL-8 i IL-23 a smanjuje ekspresiju gena za IL-1 α i β , IL-6 i IL-11 ([Handfield M. et al 2008.](#)).

Navedeno istraživanje je jedno od prvih na temu citokina i njihovog međusobnog odnosa tokom periodontitisa a rezultati su dobijeni u ranoj fazi, 2h posle inficiranja gingivalnih keratinocita pa zbog toga TLR2 i TLR4 nisu imali uticaja na rezultate ([Taylor J.J. 2010.](#)). Ovo istraživanje ukazalo je još jednom na već poznatu činjenicu da je *P.gingivalis* bakterija sa patogenim potencijalom i invazivnošću većim od ostalih bakterija zubnog plaka. *P.gingivalis* poseduje više različitih faktora virulencije koji u interakciji sa periodontalnim tkivom dovode do destruktivnog zapaljenskog procesa i to karakteristični LPS, fimbrije, proteaze i drugi ([Taylor J.J. 2010.](#)).

2.6.3.1 LPS

Prepoznavanje LPS-a patogenih bakterija odvija se putem kompleksa ekstraćelijskih molekula i receptora na površini ćelija među kojima TLR-4 ima centralnu ulogu ([Kawai T. and Akira S. 2009.](#)). Dosadašnje studije uglavnom su se odnosile na LPS enterobakterija i to *E.coli* ali struktura lipida A LPS-a *P.gingivalis* razlikuje se od lipida A *E.coli* ([Ogawa T. 1993.](#)). Takođe LPS *P.gingivalis* je biohemijski heterogen i njegova interakcija sa TLR odvija se na više različitih načina. U prirodi se javljaju različite strukturne varijante ovog LPS-a koje učestvuju u prenošenju signala preko TLR-4 ali i preko TLR-2 ([Ogawa T. et al 2002.](#), [Hajishengallis G. et al 2002.](#), [Dixon D.R. and Darveau R.P. 2005.](#), [Darveau R.P. et al 2004.](#)). Mnoge imunološke studije ukazuju da LPS *P.gingivalis* indukuje drugačiji imunološki odgovor i da je biološki manje potentan od LPS-a *E.coli* ([Dixon D.R. et al 2004.](#)).

Primer predstavlja podatak da LPS *P.gingivalis* ispoljava neuporedivo slabiji efekat u stimulaciji sekrecije TNF α od strane murinih makrofaga od LPS-a *Salmonella minnesota* ali je situacija obrnuta na humanim monocitima ([Tanamoto K. et al 1997.](#)).

Brojne studije su pokazale da LPS *P.gingivalis* stimuliše sekreciju IL-1 β , TNF α , IL-6 i IL-8 od strane fibroblasta, neutrofila i monocita/makrofaga iako je opisan i njegov inhibitorni efekat na sekreciju IL-8 u epitelnim ćelijama ([Lamont R.J. and Jenkinson H.F. 1998.](#)).

Efekat LPS na ekspresiju gena za citokine i druge molekule rađen je na endotelnim ćelijama korišćenjem DNK mikročipova. Geni sa povećanom ekspresijom su uglavnom geni za citokine uključene u urođeni imunološki odgovor pre svega geni za hemokine. Povećana je ekspresija gena za IL-18 kod oba LPS-a i *P.gingivalis* i *E.coli* ali je

nešto viša kod LPS *E.coli*. LPS *P.gingivalis* izaziva diferencijaciju monocita u makrofage a istovremeno povećava ekspresiju gena za TLR1 i TLR2 (*Foster N. et al 2007.*) slično je i sa LPS *E.coli* ali je ekspresija još veća. Takođe povećana ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , TNF α i IL-6 uočava se kod oba tipa LPS-a a i gena za antiinflamatorni citokin IL-10.

2.6.3.2 Fimbrije

Porphyromonas gingivalis ima dve vrste fimbrija i to velike fimbrije (FimA) i male fimbrije (Mfa) (*Hajishengallis G. 2009.*). FimA u interakciji sa epitelnim ćelijama gingive imaju centralnu ulogu u invazivnosti bakterija omogućavajući njihovo vezivanje za epitel. Uticaj FimA na imunološke procese je relativno poznat (*Lamont R.J. and Jenkinson H.F. 1998.*), a novije studije *in vitro* i *in vivo* ukazuju na molekularne mehanizme interakcije sa ćelijama domaćina i posledične efekte na sekreciju citokina. FimA stimuliše nuklearni faktor-kappaB i sekreciju IL-8 na humanim gingivalnim epitelnim ćelijama preko TLR2 (*Asai Y. et al 2001.*) pri čemu je CD14 esencijalni koreceptor za aktivaciju epitelnih ćelija FimA *P.gingivalis*-a (*Hajishengallis G. et al 2006.*). U nedostatku membranskog receptora CD14 produkcija citokina IL-6, IL-8, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) i TNF α je slabija (*Eskan M.A. et al 2007.*). Monociti inače u interakciji sa FimA *P.gingivalis* -a sekretuju znatne količine IL-6, IL-8 i TNF α (*Eskan M.A. et al 2007.*).

U interakciji FimA sa receptorom-3 komplementa aktiviraju se intraćelijski signalni putevi koji inhibiraju produkciju IL-12 preko TLR-2 (*Hajishengallis G. et al 2007.*). IL-12 koji sekretuju aktivisani makrofagi aktivira NK ćelije i citotoksične CD8⁺ T-ćelije, proces važan za eliminaciju inficiranih ćelija i njegova inhibicija produžava opstanak *P.gingivalis* *in vitro* i *in vivo* (*Hajishengallis G. et al 2008.*). Ovaj mikroorganizam takođe suprimira ćelijski imunološki odgovor snižavajući nivo IFN γ (*Hajishengallis G. 2009.*).

FimA stimuliše sekreciju IL-8 od strane endotelih ćelija (*Nassar H. et al 2002.*) ali i ingestiju *P.gingivalis* od strane dendritskih ćelija monocitnog porekla i posledičnu sekreciju IL-1 β , IL-6, TNF α i IL-10 od strane tih ćelija (*Jotwani R. and Cutler C.V. 2004.*).

2.6.3.3. Proteaze

Porphyromonas gingivalis sintetiše brojne proteaze koje razlažu proteine domaćina i obezbeđuju nutritijente ovoj bakteriji ali takođe ometaju imunološki odgovor i narušavaju tkivni integritet. Među ovim proteazama dve klase cistein proteaza su najbolje istražene i to lizin-specifična gingipain Kgp i arginin-specifične gingipain RgpA i RgpB. Ove proteaze ispoljavaju delovanje na imunološki sistem na različite načine npr. razlažu i inaktivišu TNF α (Calkins C.C. et al 1998.) i CD14 deo receptorskog kompleksa za koji se vezuje LPS pa tako direktno ali i indirektno utiču na sekreciju citokina (Duncan L. et al 2004., Sugawara S. et al 2000.). Ove proteaze stimulišu sekreciju citokina u ćelijama domaćina uklanjanjem ili aktivacijom proteaza-aktivisanih receptora (PAR). RgpB proteaza aktivira dva različita receptora, PAR-11 i PAR-2 i stimuliše lučenje IL-6 od strane humanih epitelnih ćelija usne duplje (Lourbakos A. et al 2001.). I Rgp i Kgp proteaze stimulišu sekreciju IL-6 i IL-8 od strane monocita preko PAR-1, PAR-2 i PAR-3 receptora (Uehara A. et al 2008.).

2.6.3.4. Ostali faktori virulencije

Porphyromonas gingivalis poseduje i druge faktore virulencije kao npr. kratkolančane masne kiseline u milimolarnim koncentracijama. Buturična kiselina indukuje apoptozu T i B-ćelija, gingivalnih keratinocita i fibroblasta. Ove efekte ostvaruje na nivou acetilacije histona i poremećaja ekspresije gena u ćelijama domaćina (Harris J.I. et al 2002., Riggs M.G. et al 1977.). Kratkolančane masne kiseline doprinose infekciji indukujući destrukciju tkiva (npr. procesom apoptoze) a deluju i kao potencirajući faktor proinflamatornih stimulusa LPS. Njihova aktivnost još uvek nije dovoljno istražena. Bakterijski DNK deluje na imunološki sistem preko TLR9 i stimuliše sintezu veće količine IL-12, što je karakteristika signala preko TLR9 a sa LPS-om deluje sinergistički i pojačava sekreciju citokina (Cowdery J.S. et al 1996.).

2.6.4. Destruktivna i protektivna uloga citokina

Hronični periodontitis karakteriše se destrukcijom periodontalnih tkiva koja okružuju koren zuba i drže zub u aveoli. Proces započinju prisutni patogeni mikroorganizmi ali oni sami nisu dovoljni za razvoj oboljenja (Graves D.T. et al 2008.)

već je neophodna inflamatorna reakcija imunološkog sistema domaćina i delovanje proinflamatornih medijatora. Za razliku od njih antiinflamatorni medijatori usporavaju progresiju oboljenja i smanjuju nivo destrukcije tkiva. U novije vreme niz studija pokazao je da perzistentni inflamatorni imunološki odgovor domaćina protiv patogena dovodi do destrukcije mekih i mineralizovanih periodontalnih tkiva (*Graves D.T. et al 2008.*). Na kompleksnost ovih procesa ukazuje i postojanje niza subpopulacija T-limfocita sa pro i antiinflamatornim karakteristikama.

Molekularni mehanizmi uključeni u remodelovanje tkiva tokom periodontitisa uglavnom su poznati. Među proteinazama domaćina koje deluju na ekstraćelijski matriks (EĆM) matriksne metaloproteinaze (MMP) se najčešće povezuju sa remodelovanjem periodontalnih tkiva (*Verstappen J. and Von den Hoff J.W. 2006.*). MMP, familija cink i kalcijum zavisnih proteinaza obično je u balansu sa grupom endogenih proteina – tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) što omogućava regulaciju remodelovanja matriksa (*Hannas A.R. et al 2007.*). U stvari MMP i TIMP se izbalansirano eksprimiraju u zdravom periodontalnom tkivu, a gubitak balansa MMP/TIMP, odnosno visok nivo MMP, a nizak nivo TIMP, karakterističan je za destruktivni periodontitis praćen propadanjem mekih i mineralizovanih tkiva zuba (*Garlet G.P. et al 2004.*).

Uz propadanje periodontalnog vezivnog tkiva ključni događaj destruktivnog periodontitisa je propadanje alveolarne kosti čiji integritet zavisi od očuvanja delikatne ravnoteže između resorpcije kosti delovanjem osteoklasta i njenog formiranja putem osteoblasta. Osnovni regulatorni mehanizam aktivnosti osteoklasta odvija se preko RANK receptora (receptor aktivator nuklearnog faktora- $\kappa\beta$) i njegovog liganda RANKL sa solubilnom formom OPG (osteoprotegerin) (*Leibbrandt A. and Penninger J.M. 2008.*). RANKL se vezuje za receptor RANK na površini pre-osteoklasta dovodeći do njihove maturacije i aktivacije dok OPG inhibira ovo vezivanje. Zbog toga je balans RANKL/OPG od suštinske važnosti za osteolizu alveolarne kosti tokom periodontitisa i razliku između agresivne i hronične forme oboljenja.

2.6.4.1 Urođeni imunitet i destrukcija periodontalnog tkiva

Prepoznavanje PAMP mikroorganizama od strane ćelija domaćina dovodi do lučenja proinflamatornih medijatora. TLR se eksprimiraju na tkivnim ćelijama i

leukocitima u periodontalnom tkivu i vezuju za bakterijske komponente (LPS, DNK i druge). Skorije studije ukazuju na ulogu TLR2 i TLR4 u prepoznavanju periodontalnih patogena *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* i *T.fosythensis* (Nussbaum G. et al 2009., Kikkert R. et al 2007.). Posle aktivacije TLR receptora stimulirana je intraćelijska signalna kaskada koja vodi do aktivacije transkripcionih faktora, posledične sekrecije proinflammatoryh citokina, migracije leukocita i geneze osteoklasta. Nedostatak TLR2 i TLR4 kod odgovarajućeg nokaut miša dovodi do smanjenog gubitka alveolarne kosti posle infekcije *P.gingivalis* (Nakamura H. et al 2008., Costalonga M. et al 2009.). Sem TLR receptora i NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) receptori i sistem inflamazoma opisani su kao potencijalni akcesorni molekuli okidači urođenog imunološkog sistema protiv periodontalnih patogena. Kao odgovor na prepoznavanje mikroorganizama luče se citokini urođenog imuniteta među kojima TNF α , IL-1 i IL-6 deluju prvi.

TNF α ima ulogu u migraciji ćelija koju ostvaruje na više nivoa a pre svega pojačavanjem ekspresije adhezivnih molekula i stimulacijom sekrecije hemotaktičkih hemokina. Prisutan je u obolelim periodontalnim tkivima i njegova količina je u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom MMP i RANKL (Garlet G.P. et al 2004., Graves D.T. et al 2008., Graves D.T. and Cochran D. 2003.). Na osnovu studija na ljudima i pacovima utvrđeno je da TNF α igra centralnu ulogu u inflamatornoj reakciji, resorpciji alveolarne kosti i propadanju vezivnog tkiva periodontalnog ligamenta (Graves D.T. et al 2008., Graves D.T. and Cochran D. 2003.).

TNF α stimuliše produkciju proinflammatoryh citokina IL-1 β i IL-6 koji se kao i TNF α povezuju sa migracijom inflamatornih ćelija i procesom geneze osteoklasta (Graves D.T. et al 2008.).

Citokini urođenog imuniteta stvaraju se u tkivnim epitelnim ćelijama i fibroblastima i inflamatornim ćelijama, pre svega makrofagima i neutrofilnim granulocitima, u periodontalnom tkivu.

2.6.4.2 Stečeni imunitet i destrukcija periodontalnog tkiva

Stečeni imunitet iniciran je prepoznavanjem mikroorganizama periodontalnog prostora od strane APC kao što su DC. Po aktivaciji zrele DC eksprimiraju

kostimulatorne molekule i sekretuju različite citokine koji determinišu polarizaciju i aktivaciju antigen-specifičnih limfocita (*Cutler C.W. and Jotwani R. 2004.*).

CD4⁺ T-ćelije prvobitno su bile podeljene u dve subpopulacije T_h1 i T_h2 pri čemu je T_h1 subpopulacija bila nosilac ćelijskog i proinflamatornog imuniteta dok je T_h2 subpopulacija povezivana sa humoralnim imunološkim odgovorom i antiinflamatornim svojstvima (*Janković D. et al 2001.*). Skorija istraživanja, dajući niz novih objašnjenja, opisuju dve nove subpopulacije pomoćničkih T-ćelija i to T_h17 i T_{reg} (regulatorne T-ćelije) koje imaju antagonističke uloge kao efektorne i supresivne ćelije (*Appay V. et al 2008., Sallusto F. and Lanzavecchia A. 2009., Weaver C.T. and Hatton R.D. 2009.*). Ova otkrića omogućila su bolje razumevanje funkcije i regulacije T-ćelija ali i mehanizama nastanka imunološkog poremećaja tokom periodontitisa. Karakteristični markeri T_h1, T_h2, T_h17 i T_{reg} subpopulacija pomoćničkih T-ćelija otkriveni su u obolelim periodontalnim tkivima a najnovije studije ukazuju da patogene ali i nepatogene bakterije mogu da izazovu produkciju citokina karakterističnih za sve ove subpopulacije (*Garlet G.P. 2010.*).

IFN γ , karakterističan za T_h1 imunološki odgovor, glavni je aktivator makrofaga i stimulator sekrecije proinflamatornih citokina i hemokina. IFN γ je prisutan u periodontalnim lezijama u visokim koncentracijama i dovodi se u vezu sa najdestruktivnijim oblicima periodontitisa (*Garlet G.P. et al 2003.*). Istraživanja na glodarima pokazala su da je ovaj medijator uključen u inflamatornu reakciju i resorpciju kosti kod infekcija mikroorganizmima *P.gingivalis* i *A.actinomycetemcomitans* (*Garlet G.P. et al 2008.*). Ova *in vivo* istraživanja nisu potvrđena u *in vitro* eksperimentima gde IFN γ sistematski inhibira formiranje osteoklasta inhibirajući RANKL signalne puteve (*Takayanagi H. et al 2000.*). Ovi *in vitro* rezultati potvrđuju raniju hipotezu da su T_h1 ćelije u vezi sa stabilnim lezijama a T_h2 ćelije sa progresivnim lezijama (*Gemmel E. et al 2007.*) ali ipak se čini da proinflamatorni efekti IFN γ demonstrirani *in vivo*, koji dovode do pojačane sinteze TNF α i IL-1 β (posledično i RANKL) imaju veću težinu (*Garlet G.P. et al 2008.*).

Da T_h1 odgovor dovodi do većeg oštećenja tkiva ukazuje i činjenica da IL-12 (glavni induktor T_h1) ima važnu ulogu u resorpciji alveolarne kosti na mišijem modelu posle infekcije *P.gingivalis* (*Sasaki H. et al 2008.*). Kao i kod IFN γ i rezultati dobijeni u

patogenezi humanog periodontitisa u vezi IL-12 su zanimljivi jer istraživanja pokazuju da je koncentracija IL-12 niža u obolelim nego u zdravim tkivima desni (*Johnson R.B. and Serio F.G. 2005.*).

Skorija istraživanja ukazuju da T_{h17} subpopulacija limfocita indukuje osteoklastogenezu i gubitak koštanog tkiva tokom periodontitisa (*Yago T. et al 2009.*). Subpopulacija $CD4^{+}$ pomoćničkih ćelija, koja produkuje IL-17, nastaje delovanjem različitih citokina u odnosu na citokine koji indukuju nastanak T_{h1} i T_{h2} limfocita i preko IL-17 uključena je u destrukciju kosti jer IL-17 deluje stimulatивно na produkciju RANKL (*Sato K. et al 2006.*). Iako neka istraživanja ukazuju da je IL-17 manje potentan stimulator MMP od klasičnih citokina urođenog imuniteta (*Beklen A. et al 2007.*) sposobnost T_{h17} ćelija da produkuju IL-6 i stimulišu stvaranje IL-1 β i TNF α dovodi do povećane ekspresije MMP i RANKL (*Beklen A. et al 2007.*) i posledičnog propadanja mekih i mineralizovanih tkiva periodoncijuma. Skorija istraživanja utvrdila su prisustvo T_{h17} ćelija kao i T_{h17} citokina u hroničnim periodontalnim lezijama (*Cardoso C.R. et al 2009.*). Smatra se da ove ćelije doprinose egzacerbaciji hroničnog zapaljenja i akutizaciji inflamatornog procesa stimulišući okolne ćelije na lučenje proinflamatornih citokina.

Sem klasičnih citokina koji aktiviraju fagocitne ćelije poput IFN γ , i T_{h17} /IL-17 subpopulacija, sama ili sa T_{h1} citokinima, mobilise makrofage i neutrofile protiv intra i ekstraćelijskih patogena (*Silva M.T. 2010.*). IL-17 dovodi se u vezu sa mobilizacijom neutrofila tokom infekcije *P.gingivalis* (*Yu J.J. et al 2007.*) i egzacerbacijom inflamatornog procesa kao i povećanom osetljivošću TLR u humanim ćelijama desni (*Beklen A. et al 2009.*) čime potpomaže funkciju urođenog imuniteta.

T_{h2} subpopulacija T-ćelija prisutna je u periodontalnim lezijama i takođe može imati ulogu u destrukciji tkiva. Njihovo nastajanje i delovanje u zavisnosti je od produkcije IL-4, tipičnog T_{h2} citokina koji takođe stimuliše i B-limfocite (*Sallusto F. and Lanzavecchia A. 2009.*) što čini i IL-6 koji doprinosi diferencijaciji ovih ćelija i produkciji antitela (*Cronstein B.N. 2007.*). Utvrđeno je da B-limfociti produkuju RANKL kao odgovor na bakterijske stimulse (*Han X. et al 2009.*) a da je najveći broj B-limfocita u periodontalnim lezijama RANKL $^{+}$ (*Kawai T. et al 2006.*). U najvećem broju slučajeva periodontitisa B-ćelije su brojnije od T-ćelija a predominacija T_{h2} imunološkog odgovora dovodi do akumulacije ćelija koje produkuju RANKL i do destrukcije tkiva

(*Kawai T. et al 2006.*). U nedostatku B-ćelija T-limfociti pod delovanjem LPS mogu da indukuju propadanje koštanog tkiva.

Još jedna destruktivna komponenta T_H2 /B-ćelijskog sistema je stvaranje autoantitela na komponente periodontalnog tkiva (kolagen, heat-shock proteini, vimentin, spektrin, filamin, aktin, laminin, keratin, tubulin) a destruktivno delovanje ispoljavaju i autoreaktivne B-ćelije koje su prisutne u inflamiranim periodontalnim tkivima (*Donati M. et al 2009.*).

2.6.4.3 Antiinflamatorni citokini i destrukcija periodontalnog tkiva

Antiinflamatorni medijator IL-10 prisutan je u inflamiranim periodontalnim tkivima gde ostvaruje protektivnu ulogu i dovodi se u vezu sa oboljenjem slabijeg intenziteta (*Garlet G.P. 2010.*). IL-10 deficijentni nokaut miševi su jako prijemljivi na propadanje alveolarne kosti tokom periodontitisa indukovano bakterijom *P.gingivalis* (*Sasaki H. et al 2004.*). IL-10 slabi intenzitet destruktivnog periodontitisa na više načina pre svega slabljenjem inflamatorne reakcije inhibicijom transkripcije iRNK proinflamatornih medijatora urođenog imuniteta (*Yoshimura A. et al 2003.*). Ova inhibicija se može proširiti i na supresore signala citokina (SOCS) koji slabe prenos signala kao deo negativne povratne sprege i inhibicije određenih stimulusa (*Yoshimura A. et al 2007.*). Skorija istraživanja pokazuju da pojačana ekspresija SOCS indukovana bakterijskom DNK značajno smanjuje intenzitet inflamatorne reakcije (*Taubman M.A. et al 2007.*).

Sem supresije citokina urođenog imuniteta IL-10 deluje direktno i na produkciju IFN γ i IL-17 od strane T-limfocita.

IL-10 ispoljava i direktnu antidestruktivnu ulogu modulacijom MMP i RANKL sistema. On povećava nivo TIMP koje inhibiraju delovanje svih tkivnih MMP na nespecifičan način (*Garlet G.P. 2010.*) i stimuliše produkciju OPG snižavajući resorpciju kosti sprečavanjem vezivanja RANK-RANKL (*Garlet G.P. 2010.*).

IL-4, citokin T_H2 tipa, sem destruktivne uloge može delovati protektivno snižavajući nivo inflamacije na sličan način kao IL-10 i to na nivou transkripcije proinflamatornih citokina i IFN γ i suprimirajući nastanak T_H1 pomoćničkih T-ćelija (*Garlet G.P. 2010.*). IL-4 takođe indukuje sekreciju citokina sa sličnim delovanjem kao

IL-10 a inhibira oštećenje tkiva direktnim delovanjem na produkciju MMP i RANKL i konstantnom indukcijom sinteze TIMP i OPG ([Garlet G.P. 2010.](#)).

T_{reg} pomoćnički limfociti su T-ćelijska subpopulacija sa protektivnom ulogom u periodontalnim inflamatornim lezijama. T_{reg} ćelije su CD4⁺CD25⁺ i specifično regulišu aktivaciju, proliferaciju i efektorsku funkciju aktivisanih konvencionalnih T-ćelija. U periodontitisu T_{reg} eksprimiraju FOXp3, CTLA-4, IL-10, GITR, CD103 i CD45_{RO} ([Nakajima T. et al 2005.](#)). Skorija studija Garleta i saradnika pokazuje da tokom periodontitisa ove ćelije migriraju u periodontalno tkivo dok pri inhibiciji (anti-GITR tretman) dolazi do pojačane resorpcije alveolarne kosti i pojačane migracije inflamatornih ćelija ([Garlet G.P. 2010.](#)).

TGFβ takođe igra ulogu u smanjenju nivoa oštećenja periodontalnih tkiva. To je plejotropni citokin koji reguliše ćelijski rast, diferencijaciju i produkciju matriksa i potentni je imunosupresivni faktor koji deluje na nivou transkripcije proinflamatornih faktora kao npr. IL-1β i TNFα i MMP ([Okada H. and Murakami S. 1998.](#), [Steinsvoll S. et al 1999.](#)). U periodontalnim lezijama nivo TGFβ je u negativnoj korelaciji sa nivoom RANKL ukazujući na njegovu protektivnu ulogu protiv geneze osteoklasta i resorpcije alveolarne kosti ([Steinsvoll S. et al 1999.](#)).

Na osnovu dokaza iz naučne literature zapaža se dvostruka priroda inflamatornog imunološkog odgovora domaćina jer mehanizmi koji zaustavljaju infekciju dovode i do oštećenja periodontalnih tkiva a u oba procesa uključeni su isti mehanizmi. Može se reći da proinflamatorne T_h1 i T_h17 ćelije dovode do oštećenja tkiva različitog stepena ali su efikasne u kontroli periodontalne infekcije i borbi protiv patogena preko hemoatrakcije i aktivacije fagocitnih ćelija. Uloga T_h2 subpopulacije pomoćničkih limfocita i B-ćelija u progresiji periodontitisa je kontroverzna jer je produkcija antitela efikasna u borbi protiv infekcije dok autoantitela i autoreaktivni B-limfociti mogu delovati destruktivno. Na kraju, antiinflamatorni IL-10 i T_{reg} povezuju se sa slabijim oštećenjem tkiva a izgleda da ne utiču negativno na borbu protiv patogenih mikroorganizama.

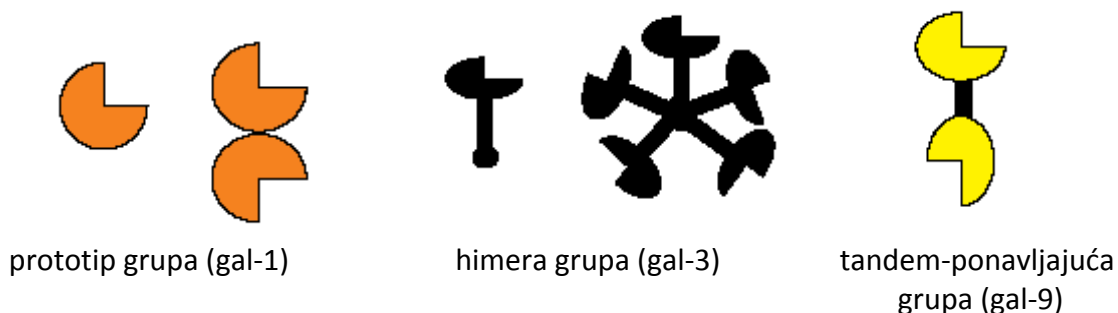
2.7. LEKTINI

Lektini su jedinstvena grupa proteina čija je osnovna funkcija prevođenje bioloških informacija kodiranih i čuvanih u specifičnim oligosaharidnim strukturama glikokonjugata. Klasifikovani su u familije među kojima galektini spadaju u najstarije i najinteresantnije. Galektini su definisani evolutivno očuvanim aminokiselinskim sekvencama i po prepoznavanju β -galaktozidnih struktura (*Barondes S.H. et al 1994.*). Mogu se pronaći u najstarijim organizmima na planeti kao što su sunđer, gljivice i virusi ali i kod nematoda, insekata, kičmenjaka i biljaka. Nisu prisutni kod kvasaca.

Dosad je otkriveno 15 tipova galektina kod sisara (*Radosavljevic G. et al 2012.*) i svi oni poseduju CRD domen (conserved carbohydrate recognition-binding domain), domen koji prepoznaje ugljene hidrate i koji se sastoji od oko 130 aminokiselina. Na osnovu broja i organizacije CRD-a članovi galektin familije klasifikovani su u tri podtipa:

- a. Prototip grupa (galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 i -15);
- b. himera grupa (galektin-3);
- c. tandem-ponavljajuća grupa (galektin-4, -6, -8, -9 i -12).

Šema 2. (*Norling L.V. et al 2009.*)



Članovi *prototip grupe* imaju jedan CRD. Galektin-3, jedini *himerični* galektin kičmenjaka, takođe ima jedan CRD povezan sa neobično dugačkim N-terminalnim domenom (NT), bogatim prolinom i glicinom. Članovi *tandem-ponavljajuće grupe* sastoje se od jednog polipeptidnog lanca koji formira dva različita ali homologa CRD-a odvojena jednom "vezujućom sekvencom" do 70 aminokiselina. Galektini sa dva CRD-a mogu da se vežu za dva ugljenohidratna epitopa. Neki galektini sa jednim CRD-om u

stanju su da formiraju dimere ili oligomere u zavisnosti od specifičnih uslova (prisustvo i koncentracija liganda) što omogućava bivalentno ili multivalentno vezivanje za ugljenohidratne ligande. Ovo vezivanje, od ključnog značaja za neke od bioloških funkcija galektina, pojačano je ako je galaktoza vezana za neki drugi saharid npr. N-acetilglukozamin (*Hirabayashi J. et al 2002.*)

Galektini kičmenjaka pronađeni su u citoplazmi i nukleusu, na površini ćelije i u vanćelijskom prostoru zahvaljujući sekreciji tzv. neklasičnim putem. Galektini su detektovani u različitim tipovima ćelija i tkiva i obavljaju niz različitih funkcija pa se u poslednje vreme intenzivno proučavaju. Najviše proučavan član galektin familije je galektin-3, sveprisutan protein sa nizom bioloških funkcija.

2.7.1. GALEKTIN-3

Galektini, pripadnici drevne proteinske grupe lektina, karakterišu se specifičnim vezivanjem za β -galaktozide preko evolutivno veoma starog i očuvanog CRD domena. Oni se eksprimiraju u nizu inflamatornih i neinflamatornih ćelija, uključujući monocite, makrofage, dendritske i mast ćelije, a uključeni su u niz procesa kao što je ćelijska adhezija, prenos signala, proliferacija, diferencijacija i apoptoza (*Dhirapong A. et al 2009.*). Deluju intra i ekstraćelijski uticajem na niz patoloških procesa kao što su akutno i hronično zapaljenje, alergijske reakcije, autoimunitet i invazivnost tumora.

Po strukturi jedinstven pripadnik familije lektina je himerični galektin-3 koji uz CRD sadrži N-terminalni domen zahvaljujući kome je u stanju da formira oligomere. Galektin-3 je široko rasprostranjen među različitim tipovima ćelija i tkiva, lokalizovan je intraćelijski u nukleusu i citoplazmi ili ekstraćelijski na membrani i u vanćelijskom prostoru (*Radosavljevic G. et al 2012.*). Preko specifičnih interakcija sa velikim brojem intra- i ekstraćelijskih proteina uključen je u niz različitih fizioloških i patofizioloških stanja i procesa kao što su imunološki odgovor, razvoj, neoplastične transformacije i metastaze

Galektin-3 protein (29-35 kDa) inicijalno je otkriven kao Mac-2 antigen na površini ćelije murinih peritonealnih makrofaga (*Ho M.K. and Springer T.A. 1982.*). Kasnije je opisan kao CBP-35 (35 kDa) protein u fibroblastima miša (*Roff C.F. and Wang J.L. 1983.*), ϵ BP (ϵ -vezujući protein) iz bazofilnih granulocita pacova sa leukemijom (*Liu*

F.T. and Orida N. 1984.), RL-29 u plućnom tkivu pacova (*Cerra R.F. et al 1985.*) i HL-29 u plućima čoveka (*Sparrow C.P. et al 1987.*). Pominju se još L-34 iz onkogenom transfektisanih embrionalnih fibroblasta pacova i LBP, neintegrinski protein koji se vezuje za laminin u makrofagima (*Woo H.J. et al 1990.*).

Analizom aminokiselinskog redosleda i genskih sekvenci pomenutih proteina različitih vrsta utvrđen je veoma visok stepen homologije (*Cherayil B.J. et al 1989., Laing J.G. et al 1989., Woo H.J. et al 1990.*) pa je u skladu sa nomenklaturom predstavljenom 1994. ovaj protein dobio ime galektin-3 (*Barondes S.H. et al 1994.*).

Struktura galektina-3 jedinstvena je među svim poznatim galektinima kičmenjaka (*Houzelstein D. et al 2004.*). To je jedan polipeptidni lanac koji formira dva strukturno različita domena, atipični NT i CRD. Mnoge studije ukazuju na postojanje dubokih strukturnih i funkcionalnih razlika ova dva domena (*Dumic J. et al 2006.*).

2.7.1.1 NT domen

U zavisnosti od vrste, NT domen se sastoji od 110-130 aminokiselina. Ova relativno fleksibilna struktura sadrži mnogobrojna homologa ponavljanja (*Dumic J. et al 2006.*) od kojih svako poseduje zajedničku sekvencu Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly za kojom slede tri dodatne aminokiseline. NT domen molekula galektina-3 se veoma malo razlikuje kod različitih vrsta. Takođe je publikovano da je NT domen 33.5% identičan sa kolagenom $\alpha 1$ (II) lancem iz hrskavice goveda (*Raz A. et al 1989.*) pa se NT domen naziva i "collagen-like" NT domen.

Iako se NT domen ne vezuje za ugljene hidrate on je neophodan za punu biološku aktivnost galektina-3 (*Seetharaman J. et al 1998.*). Šta više, noviji rezultati ukazuju na to da NT domen preko Tyr¹⁰² i rezidua zajedno sa CRD učestvuje u vezivanju za oligosaharide (*Barboni E.A. et al 2000.*) a važan je za formiranje multimera i sekreciju galektina-3 van ćelija (*Menon R.P. and Hughes R.C. 1999.*).

2.7.1.2 CRD

C-terminalni domen galektina-3 sastoji se od oko 130 aminokiselina koje formiraju globularnu strukturu, mesto gde se vezuju ugljeni hidrati (*Ochieng J. et al 1993.*). Posebno zanimljiva je aminokiselinska sekvenca NWGR, očuvana u BH1

domenu Bcl-2 familije proteina. Smatra se da je ova sekvenca odgovorna za anti-apoptotsku aktivnost Bcl-2 i galektina-3 (Yang R.Y. et al 1996.). NWGR je takođe uključen u samoudruživanje galektin-3 molekula preko CRD-a u nedostatku saharidnih liganda (Yang R.Y. et al 1998.). Jedna rezidua cisteina koja se nalazi u blizini NWGR (Cys¹⁸⁶) neophodna je za nastajanje dimera murinog galektina-3 koji u toj formi ima znatno veći afinitet za vezivanje laminina od monomera.

Takođe CRD ispoljava jak afinitet za krajnje produkte glikozilacije (AGE) u odnosu na ceo molekul galektina-3 pa se smatra da poseduje specifična mesta za AGE vezivanje koja su delimično pokrivena NT domenom u celom molekulu galektina-3 (Vlassara H. et al 1995.).

2.7.1.3 Specifičnost vezivanja šećera i multivalentnost galektina-3

Dosadašnja proučavanja opisuju N-acetilaktozamin (LacNAc, Gal β 1,4 (3)GlcNAc) kao glavni ligand galektina-3 (Dumic J. et al 2006.) mada galektin-3 poseduje dovoljno dugačak lanac za vezivanje i većih oligosaharida kao što su polilaktozaminoglukani. Interakcija galektina-3, odnosno njegovog CRD sa ugljenohidratnim ligandima, omogućena je promenama strukture galektina-3.

Galektin-3 je bivalentan odnosno multivalentan molekul i kada ima samo jedan CRD. Zna se da CRD i NT domen stvaraju multimerne formacije galektina-3 za šta je po jednoj hipotezi odgovoran NT domen.

Postoji veliki broj bioloških liganda galektina-3 koji se međusobno strukturno i funkcionalno veoma razlikuju. Sa nekima od njih galektin-3 stupa u kontakt preko terminalnih N-acetilaktozamin (LacNAc) rezidua na njegovom šećernom delu. Ne mogu svi glikoproteini koji poseduju LacNAc da budu i funkcionalni delovi galektina-3 jer je taj odnos specifičan.

Sa druge strane specifičnost vezivanja može biti povećana prisustvom pojedinih peptida u blizini LacNAc rezidua. Treba znati i to da pojedini "in vitro" ligandi galektina-3 nisu biološki relevantni jer se ne eksprimiraju u tkivima gde je on prisutan ili se ne eksprimiraju u isto vreme kada se eksprimira galektin-3.

Sve u svemu, specifičnost za vezivanje galektina i neke druge biološke komponente ne zavise samo od sposobnosti galektina da veže šećere i njegove

fosforilacije već i od vremena i mesta njihove ekspresije i naravno same strukture molekula.

2.7.1.4 Tkivna distribucija galektina-3

Kod odraslih galektin-3 prisutan je skoro u svim tkivima. Međutim utvrđeno je da tokom mišije embriogeneze njegova ekspresija zavisi od vrste tkiva i razvojnog stadijuma. Prvo se pojavljuje u ćelijama trofoektoderma blastocista a u kasnijoj fazi razvoja miša galektin-3 se nalazi u kičmenoj hrskavici, rebrima, kostima lica, bazalnim ćelijama epidermisa i endodermalnim slojevima žučne kese, grkljana i dušnika. Neka vrsta tačkaste ekspresije uočava se u pojedinim organima kao npr. jetri, plućima i mineralizovanim delovima kostiju i ukazuje na povezanost galektina-3 sa makrofagima i sličnim ćelijskim tipovima (osteoklasti). Ekspresija galektina-3 tokom prva tri meseca embriogeneze čoveka ograničena je uglavnom na epitel (koža, epitel digestivnog, respiratornog trakta i urinarnog trakta), ćelije miokarda, hondrocite.

Iako je kod odraslih galektin-3 sveprisutan molekul njegova ekspresija je najviše izražena na epitelnim i mijeloidnim/ameboidnim ćelijama.

Lokalizacija galektina-3 u tkivima:

- epitel tankog creva
- epitel kolona
- epitel kornee i konjunktive
- olfaktorni epitel (sitna područja)
- epitel bubrega, pluća, timusa, grudi, prostate
- ćelije duktusa pljuvačnih žlezda, pankreasa, bubrega, oka
- ćelije intrahepatičkih žučnih puteva
- epitel uterusa odmah nakon implantacije
- ćelije sluznice želuca

Lokalizacija galektina-3 u tipovima ćelija:

- fibroblasti
- hondrociti i osteoblasti
- osteoklasti

keratinociti
Schwan ćelije
endotelne ćelije niza tkiva i organa

Galektin-3 je prisutan u nizu ćelija ukljućenih u imunološki odgovor kao npr. u neutrofilima, eozinofilima, bazofilima, mast ćelijama, Langerhansovim ćelijama, dendritskim ćelijama, monocitima i makrofagima različitih tkiva. U limfocitima se normalno ne eksprimira ali pod delovanjem različitih stimulusa može se ekspimirati.

Galektin-3 se takođe eksprimira u nizu tumora a intenzitet ekspresije zavisi od progresije tumora, njegove invazivnosti i metastatskog potencijala ([van den Brule F. et al 2004.](#)).

2.7.1.5 Imunološki potencijal galektina-3

Galektin-3 poseduje jedinstvenu sposobnost delovanja u dva pravca naime on štiti ćelije od apoptoze ili stimuliše ćelijsku smrt u zavisnosti da li funkciju ostvaruje intraćelijski ili ekstraćelijski ([Dhirapong A. et al 2009.](#)).

Vanćelijski galektin-3 može da indukuje apoptozu aktivisanih T-limfocita. Tretman T-ćelija ekstraćelijskim rekombinantnim galektinom-3 indukuje apoptozu aktivacijom kaspaznog puta ([Fukumori T. et al 2003.](#)). Uočeno je da galektin-3 direktno inicira apoptozu timocita i T-limfocita delujući na taj način imunosupresivno ([Stillman B.N. et al 2006.](#)) indukujući imunotoleranciju.

Vanćelijski galektin-3 igra važnu ulogu u inflamatornom odgovoru i može učestvovati u nastanku autoimunoloških oboljenja. Korišćenjem galektin-3 nokaut miševa utvrđeno je da ovi miševi produkuju veću količinu inflamatornih citokina kao odgovor na LPS ([Li Y. et al 2008.](#)), a efekat je slabiji ako je galektin-3 preinkubiran LPS-om pre ubrizgavanja u miša. Vezivanje galektina-3 i LPS-a je mehanizam ove modulacije.

Dodavanje galektina-3 može dovesti do degranulacije mastocita, oslobađanja citokina i produženog trajanja inflamacije ([Chen H.Y. et al 2006.](#)). Intraćelijski galektin-3 štiti ćelije od apoptoze i stimuliše T-ćelijsku proliferaciju ([Yang R.Y. et al 1996.](#)) ometanjem apoptotskog mehanizma a jaka ekspresija galektina-3 štiti T-limfocite od toksina koji indukuju apoptozu ([Matarrese P. et al 2000.](#)).

Sem održavanja homeostaze T-ćelija galektin-3 učestvuje u regulaciji preživljavanja imunokompetentnih ćelija, njihove migracije i oslobađanja citokina. U makrofagima galektin-3 takođe ostvaruje svoju dvostruku funkciju jer su makrofagi galektin-3 nokaut miševa osetljiviji na apoptotske stimulse. Nokaut miševi takođe ispoljavaju smanjeni nivo inflamatornog odgovora koji se ogleda u smanjenoj veličini i broju leukocitnih infiltrata. Ako se nokaut miševima doda rekombinantni galektin-3 on se ponaša kao hemoatraktant za makrofage i dovodi do pojačanog inflamatornog odgovora (*Chen H.Y. et al 2006.*). Galektin-3 igra važnu ulogu u degranulaciji mastocita, oslobađanju citokina iz ovih ćelija kao i u fagocitozi jer makrofagi galektin-3 nokaut miša sporije reaguju na fagocitne stimulse i fagocituju manje ćelija nego makrofagi običnih miševa (*Sano H. et al 2003.*).

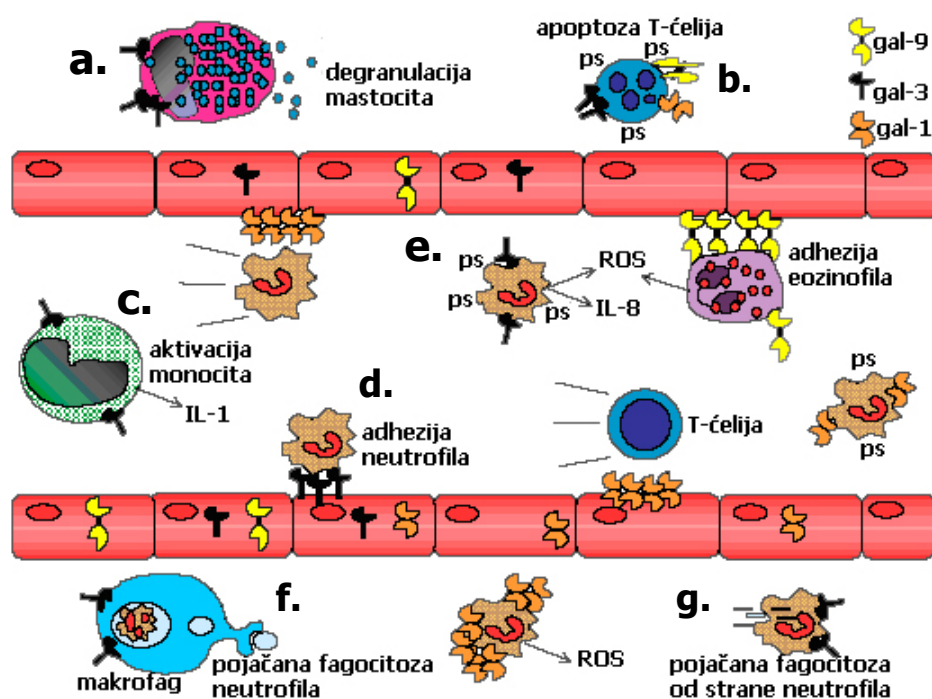
2.7.1.6 Galektini u kontroli inflamatornog odgovora

Tokom inflamatornog odgovora javljaju se kardinalni znaci inflamacije crvenilo, otok, povišena temperatura, bol i poremećaj funkcije. Ovi simptomi su rezultat niza mikroskopskih promena do kojih dolazi na mestu inflamacije ali i na sistemskom nivou. Inflamatorna reakcija je pre svega protektivna u cilju očuvanja tkivne homeostaze ali prejaka i nekontrolisana inflamacija dovodi do oštećenja tkiva. Osnovni uzrok tkivnog oštećenja je nagomilavanje leukocita, inače strogo regulisani proces koji zahteva niz specifičnih i sekvencijalnih molekularnih interakcija leukocita i vaskularnog endotela. Inicijalne leukocitno-endotelne interakcije (kontakt, kotrljanje) nastaju prvenstveno zahvaljujući familiji selektinskih receptora i njihovim olisaharidnim ligandima a adhezija i transmigracija delovanjem leukocitnih integrina u interakciji sa endotelnom imunoglobulinskom superfamilijom adhezivnih molekula.

Reparatorna faza i faza rezolucije nije pasivni već aktivni proces. Dok niz proinflamatornih medijatora inicira inflamaciju, veliki broj antiinflamatornih medijatora i mehanizama kontroliše fazu rezolucije inhibirajući migraciju leukocita i stimulišući njihovo uklanjanje sa mesta inflamacije (*Gilroy D.W. et al 2004., Serhan C.N. et al 2007.*). Postoje brojni dokazi koji svrstavaju galektine u kategoriju imunoregulatornih medijatora odnosno potencijalnih antiinflamatornih agenasa. Galektin-3 je promotor adhezije granulocita za endotelne ćelije (*šema 3.d*) i komponente EĆM a stimuliše i ekspresiju fosfatidilserina na granulocitima i apoptozu

T-ćelija (šema 3.b). Proinflamatorno delovanje galektina-3 ogleda se i u aktivaciji monocita i sekreciji IL-1 od strane ovih ćelija (šema 3.c), stimulaciji degranulacije mastocita (šema 3.a) i stvaranja reaktivnih kiseonikovih radikala (ROS - reactive oxygen species) i IL-8 od strane neutrofilnih granulocita (šema 3.e) (Norling L.V. et al 2009.). Stimulišući fagocitozu apoptotičnih granulocita od strane makrofaga i bakterija od strane neutrofilnih granulocita (šema 3.f,g) galektin-3 učestvuje i u rezoluciji inflamacije (Norling L.V. et al 2009.). Delovanje galektina na ćelije vaskularnog sistema prikazano je na šemi 3:

Šema 3. delovanje galektina na ćelije vaskularnog sistema (Norling L.V. et al 2009.)



2.7.1.7 Antiinflamatorni i proinflamatorni galektini:

Galektin-1 ispoljava niz antiinflamatornih efekata na različitim ćelijskim tipovima, inhibira promet ćelija, indukuje apoptozu i modulira oslobađanje inflamatornih medijatora. Stimulacijom aktivacije leukocita galektin-3 ispoljava niz proinflamatornih dejstava, razlikujući se na taj način od galektina-1. Galektin-9 ima jaku hemotaktičku funkciju prema eozinofilima i negativni je regulator T_H1 imunološkog odgovora.

2.7.1.8 Delovanje egzogenog Galektina-3

Galektin-3 (LGALS3 antigen, IGE-vezujući protein, ugljenohidratno-vezujući protein-35, epsilon BP, HL-29, RL-29) prvi put je identifikovan kao antigen eksprimiran na površini murinih makrofaga (*Ho M.K. and Springer T.A. 1982.*). Za razliku od galektina-1, galektin-3 je proinflamatorni protein.

Tokom inflamacije galektin-3 se oslobađa u ekstraćelijski prostor gde aktivira inflamatorne ćelije i stimuliše njihovo zadržavanje na mestu inflamacije. To ostvaruje pojačavanjem interakcija ćelija sa glikoproteinima ekstraćelijskog matriksa. Egzogeni galektin-3 dovodi do aktivacije ćelija uključenih u inflamatorno-imunološki odgovor, npr. do degranulacije mast ćelija (*Suzuki Y. et al 2008.*), produkcije IL-1 i superoksida od strane monocita (*Jeng et al 1994., Liu F.T. et al 1995.*) kao i oslobađanja L-selektina u neutrofilima (*Nieminen J. et al 2005., Farnworth S.L. et al 2008.*). Kada su neutrofilni granulociti u pitanju funkcije galektina-3 su brojne. On pojačava ćelijsku ekspresiju CEACAM1 i CEACAM8 koji zatim deluju kao receptori za galektin-3 posredovanu aktivaciju NAD(P)H oksidaze (*Fernandez G.C. et al 2005.*).

Egzogeni galektin-3 ćelija stimuliše i adheziju ćelija i to indirektno ali i direktno delujući kao adhezivni molekul. U prisustvu dvovalentnih katjona dovodi do aktivacije neutrofila stimulišući njihovu adheziju za ligande kao npr. fibronektin, do adhezije neutrofila za laminin (*Kuwabara I. and Liu F.T. 1996.*) i do adhezije neutrofila direktno za endotelne ćelije *in vitro*. Igra i važnu ulogu u β -2 integrin-nezavisnoj ekstravazaciji neutrofila *in vivo* (*Sato S. et al 2002.*).

Navedeni podaci, uz znatno umanjene inflamatorne infiltrate u brojnim *in vivo* inflamatornim modelima na galektin-3 deficijntnim nokaut miševima ukazuju na veliki značaj ovog molekula na distribuciju leukocita tokom inflamatornog odgovora (*Bernardes E.S. et al 2006., Nieminen J. et al 2008.*). U modelu eksperimentalnog hepatitisa utvrđeno je prisustvo manjeg broja efektorskih ćelija u odnosu na miša divljeg tipa, što je objašnjeno ulogom galektina-3 u aktivaciji DĆ i makrofaga i proliferaciji aktivisanih T-limfocita (*Radosavljevic G et al 2012.*). U modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE) uočena je značajno smanjena leukocitna infiltracija nervnog tkiva kod galektin-3 deficijntnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa tretirane na isti način (*Jiang H.R. et al 2009.*).

Kada je u pitanju apoptoza, galektin-3 ostvaruje funkciju na različite načine u zavisnosti od lokalizacije (intra ili ekstraćelijski).

Intraćelijski galektin-3 inhibira apoptozu što omogućava produženo preživljavanje inflamatornih ćelija na mestu inflamacije ispoljavajući proinflamatorno dejstvo. To ostvaruje mitohondrijski galektin-3 sprečavajući oslobađanje citohroma c ([Moon B.K. et al 2001.](#)). Ovaj antiapoptotski efekat galektin-3 ostvaruje na nizu ćelijskih tipova kao odgovor na široki spektar agenasa koji indukuju apoptozu.

Egzogeni galektin-3, kao i galektin-1 pojačava eksprimiranje fosfatidilserina i apoptozu T limfocita ([Stillman B.N. et al 2006.](#), [Stowell S.R. et al 2008.](#)). Ovi galektini vezuju se za brojne receptore na T ćelijama, pri čemu su neki receptori zajednički. Za CD7 vezuje se isključivo galektin-1 indukujući apoptozu ([Pace K.E. et al 2000.](#)) dok se galektin-3 vezuje za ITGB1, SPN, PTPRC i TFRC od kojih je svaki na neki način povezan sa procesom apoptoze. Galektin-3 dovodi i do apoptoze mastocita ([Suzuki Y. et al 2008.](#)) dok njegovo delovanje na apoptozu neutrofilnih granulocita nije još uvek do kraja raščišćeno.

Galektin-3 takođe promoviše hemotaksu monocita *in vivo* i makrofaga *in vitro* ([Sano H. et al 2000.](#)) i eozinofila u OVA-indukovanoj astmi ([Zuberi R.I. et al 2004.](#)).

Važnu ulogu galektin-3 ima i u procesu fagocitoze što je prikazano na eksperimentalnom modelu hemolitičke anemije gde galektin-3 deficijentni miševi ispoljavaju znatno niži stepen fagocitne aktivnosti u fagocitozi eritrocita od strane Kupferovih ćelija jetre ([Sano H. et al 2003.](#)). Galektin-3 takođe pojačava fagocitnu funkciju neutrofilnih granulocita ([Farnworth S.L. et al 2008.](#)). Zbog toga je neophodan u fazi rezolucije inflamacije kada deluje na alternativni put aktivacije makrofaga T_h2 citokinima (IL-4 ili IL-13).

Antiinflamatorno delovanje galektina-1 ogleda se u tome da utiče na T_h1/T_h2 balans stimulišući T_h2 odgovor a nasuprot njemu galektin-3 suprimira T_h2 odgovor inhibirajući stvaranje IL-5 od strane eozinofila i antigen-specifičnih T-ćelijskih linija ([Cortegano I. et al 1998.](#)).

2.7.1.9 Galektin-3 deficijenti miševi i imunološki odgovor *in vivo*

Galektin-3 deficijenti miševi, kao i galektin-1 deficijenti, imaju normalan razvoj, žive normalno i fertilni su ([Colnot C. et al 1998a.](#)) kao i dvostruki nokaut miševi galektin-1/galektin-3.

Skoro je otkriveno da galektin-3 nokaut miševi oko šestog meseca starosti spontano razvijaju patološke promene na jetri tipične za bolest nealkoholne masne jetre verovatno usled toga što je galektin-3 receptor za glikozilaciju i njene krajnje produkte (Advanced Glycation end Products - AGEs) pri čemu su nivo AGE i AGE receptora RAGE povišeni kod Galektin-3 deficijentnog miša ([Nomoto K. et al 2006.](#)).

U odnosu na miševe divljeg tipa, galektin-3 deficijenti miševi ispoljavaju inflamatorni odgovor smanjenog intenziteta što ukazuje na proinflamatornu prirodu ovog proteina. Smanjen broj neutrofilnih granulocita na mestu akutne inflamacije ([Colnot C. et al 1998b.](#), [Nieminen J. et al 2008.](#)), produženo preživljavanje galektin-3 deficijentnih miševa posle intracerebralne i periferne infekcije prionom uzročnikom skrapija ([Mok S.W. et al 2007.](#)) kao i redukovan nastanak granuloma nakon infestacije helmintima *Šistosomama* ([Breuilh L. et al 2007.](#)) sa dominantnim T_h2 tipom odgovora nedvosmisleno ukazuju na to. Izgleda da galektin-3 pojačava snagu imunološkog odgovora čiji su okidač dendritske ćelije. Zrele DĆ galektin-3 deficijentnog miša indukuju pojačanu proliferaciju T-ćelija i produkciju IFN γ i IL-4. Infekcija galektin-3 deficijentnog miša parazitom *T.Gondii* takođe je praćena smanjenim stepenom inflamacije i višim nivoom T_h1 odgovora sa povećanim nivoom IFN γ i IL-12 ([Bernardes E.S. et al 2006.](#)).

Galektin-3 ispoljava zaštitno delovanje kod streptozotocin-indukovanog dijabetesa ([Pugliese G. et al 2001.](#)) što je isto tako utvrđeno korišćenjem galektin-3 deficijentnih miševa.

Galektin-3 nokaut miševi su mnogo osetljiviji na endotoksični šok u odnosu na miševe divljeg tipa i imaju povećanu produkciju proinflamatornih citokina i azot oksida (NO) ([Li Y. et al 2008.](#)). Galektin-3 se vezuje za LPS mnogih bakterija (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli*) i ove interakcije se odvijaju i preko CRD i preko N-terminalnog domena galektina-3 ([Mey A. et al 1996.](#)). Galektin-3 negativni makrofagi senzitivniji su na LPS pri čemu stvaraju veću količinu citokina u odnosu na

makrofage miševa divljeg tipa. Nasuprot ovome galektin-3 potpomaže preživljavanje salmonele (*Li Y. et al 2008.*). Galektin-3 deficijentni miševi razvili su pojačani T_H1 odgovor na infekciju salmonelama što možda doprinosi znatno smanjenoj replikaciji salmonela kod ovih miševa. Fenotip galektin-3 nokaut miševa prikazan je u tabeli 2:

Tabela 2. Fenotip galektin-3 nokaut miševa

TIP NOKAUT MIŠA	MODEL BOLESTI/UZROČNIK INFLAMACIJE	FENOTIP	REFERENCE
galektin-3	dijabetes	ubrzana glomerulopatija u modelu streptozotocin-indukovanog dijabetesa sa izrazitim povećanjem nivoa cirkulišućih i glomerularnih AGE	Pugliese et al. 2001.
	peritonitis	smanjen broj neutrofila	Colnot et al. 1998ab.
	endotoksični šok	pojačana prijemljivost sa povećanom produkcijom pro-inflamatornih citokina i NO	Li et al. 2008.
	bakterijske infekcije	smanjen broj neutrofila u plućnom tkivu tokom infekcije <i>S. pneumoniae</i>	Nieminen et al. 2008.
	parazitske infekcije	snižen stepen inflamatornog odgovora kod infestacije <i>T. gondii</i> , viši $Th1$ odgovor sa povećanim nivoom IFNG i IL12, smanjeno stvaranje granuloma po infestaciji šistosomom	Bernardes et al. 2006. Breuilh et al. 2007.
prionske infekcije	produženo preživljavanje nakon intracerebralne i periferne infekcije uzročnikom skrapija	Mok et al. 2007.	

2.7.1.10 Ciljni receptori za galektine

Ekstraćelijski matriks (EĆM) sastoji se od brojnih komponenti, uključujući kolagen, glikozaminoglukane, laminin, fibronektin, i niza drugih glikoproteina. Funkcija EĆM je strukturna podrška tkivima ali i aktivna regulacija ćelijskog okruženja ([Streuli C. 1999.](#)). Postoje dva glavna načina na koji EĆM ostvaruje svoje funkcije: direktna interakcija ćelija – EĆM i preko različitih faktora rasta ([Taipale J. and Keski-Oja J. 1997.](#)). Mnoge komponente EĆM identifikovane su kao ligandi galektina-1 i 3 uključujući laminin i fibronektin ([Zhou Q. & Cummings R.D. 1993.](#), [Ozeki Y. et al 1995.](#), [Kuwabara I. & Liu F.T. 1996.](#)). Vezivanje galektina-1 sa proteinima EĆM dovodi do redukcije

leukocitne adhezije i inhibicije migracije T-ćelija kroz EĆM ([He J. & Baum L.G. 2006.](#)) dok galektin-3 pojačava adheziju leukocita.

Ostali ligandi za galektine su membranski proteini kao npr. integrini, LAMPs (lisosome-associated membrane proteins) i neki gangliozidi.

Galektin-1 ligand, gangliozid GM1, u poslednje vreme je identifikovan kao važan za procese endocitoze galektin-1 u Jurkat ćelijama, procese u kojima učestvuje klatrin i mnoštvo lipidnih komponenti mada razlog internalizacije galektina-1 tek treba da bude razjašnjen ([Fajka-Boja R. et al 2008.](#)).

Galektin-1 vezuje se za brojne molekule na površini leukocita uključujući CD4, CD7, SPN i PTRPC ([Perillo N.L. et al 1995.](#), [Hernandez J.D. & Baum L.G. 2002.](#), [Stillman B.N. et al 2006.](#)), ali precizne ugljeno-hidratne strukture ovih makromolekula koje galektini prepoznaju nisu još uvek dovoljno proučene. Studije u kojima su korišćeni galektini konjugovani biotinom doprinele su prepoznavanju struktura na limfocitima za koje se vezuju galektini 1 i 3. Ligandi za galektin-1 i galektin-3 su često funkcionalno povezani. Preinkubacija limfocita sa galektinom-3 dovodi do parcijalne promene mesta vezivanja galektina-1 ([Stillman B.N. et al 2006.](#)) sugerišući da su pojedina mesta vezivanja galektina-1 specifična ili da je eventualno afinitet ka galektinu-1 veći nego ka galektinu-3. Naravno, dobro je poznato da specifičnost vezivanja galektina za oligosaharide zavisi od suptilnih razlika u strukturi njihovog CRD ([Hirabayashi J. et al 2002.](#)).

2.7.1.11 Delovanje intraćelijskog galektina-3

Intra-citoplazmatska i intra-nuklearna lokalizacija galektina-3 je dobro proučena ([Wang J.L. et al 2004.](#)) ali i pored toga zavisi od različitih faktora kao što su tip ćelije i njen proliferativni status, uslovi kultivacije i neoplastična progresija i transformacija ([Dumic J. et al 2006.](#)). Sa druge strane, biološka funkcija galektina-3 određena je njegovom lokalizacijom u ćeliji.

2.7.1.12 Galektin-3 u citoplazmi

Prisustvo galektina-3 u citoplazmi odavno je poznato ([Roff C.F. and Wang J.L. 1983.](#)) ali njegove brojne biološke funkcije do skoro nisu bile razjašnjene. Brojni citosolni molekuli identifikovani su kao ligandi galektina-3 ([Dumic J. et al 2006.](#)) i

njihove različite biološke funkcije ukazuju na učešće galektina-3 u nizu intraćelijskih događaja. Prvi identifikovani ligand galektina-3 *in vivo* bio je Bcl-2, molekul uključen u regulaciju apoptoze ([Yang R.Y. et al 1996.](#)). Galektin-3 se vezuje za Bcl-2 preko svog domena za prepoznavanje ugljenohidratnih komponenti, a ovu interakciju inhibira laktoza i Bcl-2 se vezuje za rekombinantni C-terminalni deo galektina-3.

Poslednjih godina otkriven je niz novih molekula koji su uključeni u proces apoptoze, a vezuju se za galektin-3. Korišćenjem ko-imunoprecipitacije i konfokalne mikroskopije utvrđeno je da galektin-3 stupa u interakciju sa CD95 (APO-1/Fas), članom familije receptora smrti koji indukuju apoptozu ([Fukumori T. et al 2004.](#)). Nukling 160-kDa protein, uključen u regulaciju apoptoze se takođe vezuje za galektin-3 kao i Alix/AIP1 sa Jurkat ćelijske linije ([Liu L. et al 2004.](#), [Liu F-T. et al 2002.](#)).

Uloga citosolnog galektina-3 u regulaciji ćelijske proliferacije, diferencijacije, preživljavanja ćelije i ćelijske smrti dodatno je potvrđena podacima o tome da se galektin-3 selektivno vezuje za K-Ras (K-Ras-GTP) dok direktna interakcija sa Akt proteinom nije dokazana ([Shalom-Feuerstein R. et al 2005.](#), [Oka N. et al 2005.](#)).

U citoplazmi epitelnih ćelija mlečne žlezde čoveka galektin-3 se vezuje za sineksin (annexin VII), 51-kDa Ca^{2+} - protein ([Yu F. et al 2002.](#)). Sineksin učestvuje u inhibiciji translokacije galektina-3 na perinuklearnu mitohondrijalnu membranu i utiče na njegovu anti-apoptotsku aktivnost. Ovi nalazi ukazuju na mitohondrije kao novu lokalizaciju galektina-3 i na ulogu sineksina u njegovom intraćelijskom prometu.

Takođe neki citokeratini sa α 1,3 vezanom N-acetilgalaktozaminskom reziduom su mogući ligandi galektina-3 u citoplazmi ([Goletz S. et al 1997.](#)) mada *in vivo* interakcije do danas nisu dokazane.

2.7.1.13 Galektin-3 u nukleusu

Prisustvo galektina-3 u ćelijskom jedru je dokazano ali tačna lokalizacija i mehanizmi delovanja ovog proteina nedovoljno su proučeni. Zanimljivo je da ga pojedini tipovi ćelija uprkos jakoj koncentraciji u citoplazmi ne eksprimiraju u nukleusu ([Sato S. et al 1993.](#)). Sam mehanizam ulaska galektina-3 u nukleus još uvek je nejasan dok je transport iz nukleusa u citoplazmu donekle rasvetljen. Izlazak galektina-3 iz nukleusa je brz i selektivan proces preko mehanizma koji inhibira Leptomycin ([Tsay J.G. et al 1999.](#)).

U nukleusu galektin-3 se nalazi u okviru ribonukleoproteinskih kompleksa (*Laing J.G. and Wang J.L. 1988.*). Smatra se da ima ulogu kao pre-i-RNK faktor u stvaranju petlji i njihovih kompleksnijih konfiguracija (*Dagher S.F. et al 1995.*). Neke studije ukazuju na indirektno delovanje galektina-3 na pre-i-RNK preko proteinskih kompleksa koji sadrže Gemin 4 koji je prikazan kao intranukleusni duplikat galektina-3 (*Park J.W. et al 2001.*).

Lin i saradnici (*Lin H.M. et al 2002.*) ukazali su na ulogu galektina-3 u regulaciji transkripcije gena.

2.8. NOKAUT MIŠEVI

Nokaut miševi su dobijeni genskim inženjeringom metodom inaktivacije gena (knockout) kod kojih je isključen jedan ili više gena. Oni predstavljaju neophodan animalni model za proučavanje sekvenciranih gena čija funkcionalnost još uvek nije dovoljno razjašnjena ili je sasvim nepoznata. Isključivanjem jednog takvog gena i poređenjem svih fenotipskih karakteristika u odnosu na normalne miševe istraživači sada imaju mogućnost da razjasne njegovu funkciju (*Schäfer C. 2007.*).

Prvi nokaut miš nastao je 1989. godine, stvorili su ga Mario R. Capecchi, Martin Evans i Oliver Smithies i za to su 2007. godine dobili Nobelovu nagradu iz oblasti medicine (*Schäfer C. 2007.*).

Galektin-3 nokaut miševе (C57BL/6 Gal-3 ^{-/-}) genski je modifikovao Daniel K. Hsu (Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, CA, USA) (*Hsu D.K. et al 2000.*).

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

3.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da se korišćenjem galektin-3 deficijentnih nokaut miševa u modelu eksperimentalnih periapeksnih inflamatornih lezija ispita sledeće:

1. Uticaj galektina-3 na razvoj i morfologiju periapeksnih inflamatornih lezija;
2. uticaj galektina-3 na tip, broj i međusobni odnos različitih inflamatornih ćelija u periapeksnim inflamatornim infiltratima u različitim terminima i to mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja oboljenja;
3. uticaj galektina-3 na intenzitet (broj ćelija po mm^2) i ekstenzivnost inflamacije mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja oboljenja;
4. da se morfometrijskom analizom ustanovi nivo resorpcije alveolarne kosti i zubnog cementa i širina periodontalnog prostora mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja oboljenja;
5. uticaj galektina-3 na ekspresiju gena za pojedine proinflamatorne i antiinflamatorne citokine u tkivu periapeksnih inflamatornih lezija mesec dana od inicijacije oboljenja i intaktnom tkivu zdravih životinja i
6. da se analizom dobijenih rezultata odredi tip stečenog imunološkog odgovora (T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} ili T_{reg}) mesec dana od inicijacije oboljenja.

3.2. ZADACI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu utvrđenih ciljeva istraživanja postavljeni su sledeći radni zadaci:

1. Izazivanje eksperimentalnog periapexnog periodontitisa otvaranjem zubne pulpe uz pomoć stomatološke burgije kod galektin-3 deficijernih C57BL/6 nokaut miševa i C57BL/6 miševa divljeg tipa;
2. uzimanje tkiva zuba sa periodontalnim ligamentom i alveolarnom kosti (u različitim terminima od inicijacije oboljenja) radi patološko-histološke analize promena u periapexnom području;
3. uzimanje tkiva zuba sa periodontalnim ligamentom i alveolarnom kosti (mesec dana od indukovanja oboljenja) radi real-time PCR detekcije ekspresije gena za proinflamatorne i antiinflamatorne citokine;
4. patološko histološka analiza tkivnih preseka;
5. real-time PCR detekcija relativne ekspresije gena;
6. deskriptivna i statistička obrada i analiza dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Miševi C57BL/6 (divlji tip) i C57BL/6 galektin-3 $-/-$ (nokaut miševi), starosti 12 nedelja \pm 2 nedelje, uzgajani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA u Beogradu. Galektin-3 nokaut miševi ustupljeni su IMI-VMA ljubaznošću Prof Miodraga Lukića iz Centra za molekularnu medicinu Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu (genski ih je modifikovao Daniel K. Hsu Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, CA, USA).

eksperimentalne grupe

Miševi su podeljeni u dve eksperimentalne grupe C57BL/6 (divlji tip) i C57BL/6 galektin-3 $-/-$ (nokaut) i dve kontrolne grupe sa intaktnim zubima C57BL/6 (divlji tip) i C57BL/6 galektin-3 $-/-$ (nokaut) (Tabela 3.). Svaku grupu čini 10 životinja sem grupe žrtvovane mesec dana od izazivanja periapeksnih lezija (10 za patohistološki nalaz + 10 za real-time PCR analizu). Eksperimentalne grupe su formirane za svaki termin žrtvovanja životinja i to mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja periapeksnih lezija što je prikazano u tabeli 3:

Tabela 3. broj životinja u eksperimentalnim grupama

termini žrtvovanja	C57BL/6 divlji tip + bušeni zubi	C57BL/6 galektin-3 $-/-$ + bušeni zubi	C57BL/6 divlji tip (intaktno tkivo)	C57BL/6 galektin-3 $-/-$ (intaktno tkivo)
1 mesec	10 životinja za histološku analizu + 10 životinja za real-time PCR	10 životinja za histološku analizu + 10 životinja za real-time PCR	10 životinja za histološku analizu + 10 životinja za real-time PCR	10 životinja za histološku analizu + 10 životinja za real-time PCR
6 nedelja	10 životinja za histološku analizu	10 životinja za histološku analizu	/	/
4 meseca	10 životinja za histološku analizu	10 životinja za histološku analizu	/	/

4.2. IZAZIVANJE PERIAPEKSNIH LEZIJA

Periapiksne lezije izazivane su izlaganjem zubne pulpe miševa delovanju mikroorganizama usne duplje u različitim vremenskim periodima. Miševi su anestetizirani intra-peritonealnim injekcijama tiopentanol (thiopental injection, 30mg/kg t.m.), fiksirani selotejpom na fiksacionoj ploči od stiropora, uz pomoć specijalnih kuka otvarana su im usta, a zatim je zubna pulpa prednja dva mandibularna molara (M1 i M2) sa desne strane otvarana uz pomoć ¼ okrugle stomatološke burgije. Radi preciznosti tokom rada korišćen je Zeiss binokularni mikroskop za mikrohirurške zahvate. Po završetku zahvata svakom mišu je intra-peritonealno aplikovano 1ml fiziološkog rastvora, a tokom trajanja eksperimenta vodi za piće dodavani su analgetici (Acetaminophen 2x500mg/l vode).

4.3. ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I UZIMANJE UZORAKA TKIVA

Životinje su žrtvovane predoziranjem anestetika (thiopental injection, 60mg/kg t.m.) u tri termina i to mesec dana, šest nedelja i četiri meseca od izazivanja periapeksnih lezija.

Uzorci tkiva uzimani su sa donje vilice (leva strana kao kontrola) zajedno sa zubima i delom alveolarne kosti i fiksirani u 4% paraformaldehidu za imunohistohemijska bojenja iz kriostatskih rezova, dok su za patohistološku analizu fiksirani i čuvani u 10% neutralnom formalinu.

Tkiva za real-time PCR analizu uzimana su mesec dana posle izazivanja oboljenja zajedno sa zubom i delom alveolarne kosti a zatim posle usitnjavanja i macerisanja utapana u RNA-later i čuvana na temperaturi od -20°C.

4.4. KORIŠĆENI LABORATORIJSKI PROTOKOLI

Za pravljenje kriostatskih rezova tkiva, imunohistohemijska i imunofluorescentna bojenja korišćen je protokol za fiksaciju tkiva u paraformaldehidu, sprovođenje dekalifikacije kostiju u EDTA i uklapanje tkiva u tečnost za zamrzavanje ([Coleman B. et al 2009.](#)):

1. Fiksacija tkiva u svežem (ne starijem od 72h) 4% Paraformaldehidu (PFA), prethodno zagrejanom do 37°C na sobnoj temperaturi uz mešanje;

2. 3x po 5 minuta ispiranje u PBS (0.1M, pH 7.4);
3. svaki tkivni isečak prebacuje se radi dekalifikacije u 20ml 10% EDTA (0.1M PBS, pH 7.4) na 4°C uz mešanje. EDTA se menja svakog dana do kompletne dekalifikacije – traje oko 2 nedelje;
4. uklanjanje tkiva iz EDTA i ispiranje 3x po 5 minuta u PBS (0.1M, pH 7.4);
5. ubacivanje tkiva u malu bočicu sa 10% saharozom, 20°C, 30 minuta uz mešanje;
6. ubacivanje tkiva u malu bočicu sa 15% saharozom, na 20°C, 30 minuta uz mešanje;
7. prebacivanje bočice na 4°C i uz mešanje ostaviti tkivo da prenoći;
8. prebacivanje tkiva u rastvor 15% saharoze i OCT (tečnost za zamrzavanje) u odnosu 1:1 i uz mešanje ostaviti tkivo da prenoći na 4°C u frižideru ili hladnoj sobi;
9. prebacivanje tkiva u oko 2ml čistog OCT i uz mešanje ostaviti tkivo da prenoći na 4°C u frižideru ili hladnoj sobi;
10. pravilna orijentacija tkiva uz dodavanje još OCT-a i zamrzavanje u tečnom azotu ili zamrzivaču;
11. sečenje tkiva u kriotomskoj komori na -20°C

Neisečeno tkivo čuva se na -80°C

Protokol za pravljenje 4% PFA (0.1M PBS, pH 7.2) – za 1l rastvora

- a. Rastvor PFA (500ml): Paraformaldehid 40g + destilovana H₂O do 500ml

Rastvor se zagreva do 60-65°C, zatim se temperatura smanjuje i dodaje se 2-3ml 1.0M NaOH u kapima do obezbojavanja.

- b. 0.2M PBS, pH 7.2

Štok A (NaH_2PO_4) – 28ml + Štok B (Na_2HPO_4) – 72ml + destilovana H_2O do 500ml.
PFA FIKSATIV (1l) = RASTVOR PFA (500ml) + 0.2M PBS, pH 7.2 (500ml)

Protokol za pravljenje 10% EDTA u 0.1M PBS, pH 7.4 (za 1l EDTA)

1. Odmeriti 100g čistog EDTA praška;
2. dodati 450-500ml destilovane vode;
3. dodavati na mešalici 5M NaOH do obezbojenja rastvora (potrebno oko 250ml 5M NaOH) (do potpunog rastvaranja supstance dolazi pri pH većem od 4.5);
4. podesiti pH na 7.4 dodavanjem 5M NaOH;
5. dodati 100ml 10x PBS;
6. dopuniti destilovanom vodom do 1l

Za patohistološka bojenja uzorci tkiva fiksirani su u 10% neutralnom formalinu, posle procedure dekalifikacije u EDTA kalupljeni su u parafinske blokove, sečeni na tkivne isečke debljine 5-6 μm i bojeni HE (hematoksilin-eozin) metodom.

Za imunohistohemijska/imunofluorescentna bojenja prethodno fiksirani (4% paraformaldehid) i dekalifikovani uzorci uklopljeni su u tečnost za zamrzavanje i sečeni na kriostatske rezove debljine 5-10 μm a zatim su na njima inkubirana antitela direktno konjugovana FITC-om u trajanju od jednog sata. Imunofluorescentna analiza rađena je na konfokalnom mikroskopu Zeiss Axiovert 200M (objektiv 63x oil).

Korišćena antitela:

- a. pacovski anti-mišiji CD14, FITC conjugated (LPS-r, Mo2, clone Sa2-8 eBioscience);
- b. mišiji anti-pacovski (mišiji) OX6 (MHC class II) FITC conjugated. (ABCAM, USA)

4. 5. KVANTITATIVNA I SEMI-KVANTITATIVNA ANALIZA HISTOLOŠKIH PROMENA

Morfometrijska analiza apeksnog i periapeksnog regiona obuhvata sledeće parametre (*Tanomaru J.M.G. et al 2008.*):

1. Intenzitet periapeksnog inflamatornog infiltrata;
2. resorpcija kosti;
3. debljina periapeksnog periodontalnog ligamenta;
4. ekstenzivnost periapeksnog inflamatornog infiltrata;
5. resorpcija cementa.

Intenzitet periapeksnog inflamatornog infiltrata dobijen je brojanjem inflamatornih ćelija, odnosno pojedinih ćelijskih tipova korišćenjem binokularnog svetlosnog mikroskopa NICON Eclipse 50i i pripadajućeg programa NIS Elements D 2.30 pri uvećanju 600x i površini testiranog polja virtualne mreže od 10x10 μ m. Važno je reći da su napravljeni nizovi serijskih isečaka tkiva, kojima je zahvaćen ceo periodontalni ligament, a da je kvantitativna i morfometrijska analiza urađena na isečcima kod kojih su inflamatorno-destruktivni procesi bili najizraženiji.

Debljina periapeksnog periodontalnog ligamenta (rastojanje od vrha korena zuba do alveolarne kosti) merena je u mikrometrima pri uvećanju 40x (NICON Eclipse 50i, NIS Elements D 2.30). Statističkom analizom određeni su kvartili 25% i 75% i medijana 50% od podataka iz svih eksperimentalnih grupa što je omogućilo bodovanje debljine svakog pojedinačnog periodontalnog ligamenta brojem od 1 do 4.

Resorpcija kosti analizirana je na osnovu debljine periapeksnog periodontalnog ligamenta i to na sledeći način:

- 1 – bez resorpcije
- 2 - "popravljena" resorpcija
- 3 – prisustvo resorpcije kosti (manje od medijane pp ligamenta)
- 4 - prisustvo resorpcije kosti (više od medijane pp ligamenta)

Ekstenzivnost periapikalnog inflamatornog infiltrata - bodovanje je sprovedeno na sledeći način:

- 1 – bez infiltrata
- 2 – prisustvo infiltrata oko apeksnog otvora
- 3 – prisustvo infiltrata do polovine pp ligamenta
- 4 - prisustvo infiltrata na više od polovine pp ligamenta

Resorpcija apikalnog cementa

- 1 – bez resorpcije
- 2 – do polovine debljine cementa
- 3 – preko polovine debljine cementa
- 4 – zahvata i dentin

Kvantitativna statistička analiza intenziteta periapikalnih inflamatornih infiltrata i zastupljenosti pojedinih ćelijskih tipova u njima urađena je korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0.05$).

Semikvantitativna statistička analiza urađena je dodavanjem svih ispitivanih parametara za svaku pojedinačnu grupu a zatim upoređivanjem grupa međusobno korišćenjem Kruskal-Wallis testa ($p < 0.05$). U slučajevima kada je utvrđena statistička značajnost za poređenje pojedinih grupa međusobno korišćen je Dunnett-ov test.

4.6. EKSPRESIJA GENA ZA CITOKINE – REAL-TIME PCR ANALIZA

U tabeli 4. prikazani su prajmeri korišćeni u ovoj analizi:

Tabela 4. Korišćeni prajmeri

broj	gen	sekvenca
1	mIFN γ F mIFN γ R	5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3' 5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCTC-3'
2	mIL-1 β F mIL-1 β R	5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3' 5'-ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT-3'
3	mIL-1 α F mIL-1 α R	5'-GCACCTTACACCTACCAGAGT-3' 5'-AAACTTCTGCCTGACGAGCTT-3'
4	mIL-6 F mIL-6 R	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC-3' 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
5	mTNF α F mTNF α R	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
6	mIL-10 F mIL-10 R	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3' 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'
7	mIL-12 β F mIL-12 β R	5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3' 5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3'
8	mIL-17 F mIL-17 R	5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3' 5'-CTTCCCTCCGCATTGACAC-3'
9	mTGF β F mTGF β R	5'-CTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3' 5'-GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG-3'
10	mTLR2 F mTLR2 R	5'-ACAATAGAGGGGAGACGCCTTT-3' 5'-AGTGTCTGGTAAGGATTTCCCAT-3'
11	mTLR4 F mTLR4 R	5'-GCCTTTCAGGGAATTAAGCTCC-3' 5'-AGATCAACCGATGGACGTGTAA-3'
12	mIL-21 F mIL-21 R	5'-GGACCCTTGTCTGTCTGGTAG-3' 5'-TGTGGAGCTGATAGAAGTTCAGG-3'
13	mIL-23 F mIL-23 R	5'-AAAATAATGTGCCCGTATCCAG-3' 5'-GCTCCCTTTGAAGATGTCAG-3'
14	mIL-18 F mIL-18 R	5'-GACTCTTGCCTCAACTCAAGG-3' 5'-CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA-3'
15	mIL-8 F mIL-8 R	5'-CCAACCACCAGGCTACAGG-3' 5'-GCG TCA CAC TCA AGC TCT G-3'
16	mIL-4 F mIL-4 R	5'-GGTCTCAACCCCAGCTAGT-3' 5'-GCCGATGATCTCTCAAGTGAT-3'
17	mIL-22 F mIL-22 R	5'-ATGAGTTTTTCCCTTATGGGGAC-3' 5'-GCTGGAGTTGGACACCTCAA-3'
18	mIL-2 F mIL-2 R	5'-ACACCTTTAATTGGTCAACACGA-3' 5'-CCTGCTACGTTCTACTCTCT-3'

Izolacija RNK

RNK je izolovana iz uzoraka korišćenjem Qiagen RNAeasy Fibrous Tissue kita sa kolonicom na koju se stavlja DNA-za.

Real-time PCR korišćenjem SYBR® GREEN-a

Genska ekspresija je urađena u triplikatima real-time PCR metodom (SyBR Green na Vii7 Applied Biosystems uređaju). Svaki gen je normalizovan u odnosu na RPL27 i izražen kao 2- $DDCt$.

Protokol za real-time PCR korišćenjem SYBR® GREEN-a

1. Materijal

- cDNK uzorci: čuvani na $-20^{\circ}C$
- Prajmeri 3.75 μ M: čuvani na $-20^{\circ}C$

2. Pripremiti mešavinu za svaki prajmer: popuniti tabelu 5:

Tabela 5.

PCR Mix	Za 1 reakciju	Za x reakcija
CDNA razblažena 1/10	3 μ l	
Primer R + F 3.75 μ M svaki	2 μ l	
Voda	7.5 μ l	
SYBR® Green	12.5 μ l	

3. Applied Biosystems Vii7 uređaj je korišćen za real-time PCR, koji se sastojao od sledećih koraka: inicijalna denaturacija na $95^{\circ}C$ 10 min, posle koji sledi 40 ciklusa: $95^{\circ}C$ 30 s, $55^{\circ}C$ 1 min, $72^{\circ}C$ 1 min.

4. Izračunavanje

Rezultat PCR-a je izražen u Ct vrednostima, posle čega sledi izračunavanje količine ekspresije ispitivanog gena po sledećim formulama:

- Izračunati ΔCt :

$$\Delta Ct \text{ ispitivanog gena} = Ct \text{ ispitivanog gena} - Ct \text{ endogene kontrole}$$

(npr. Ispitivani gen = bilo koji citokin/hemokin; endogena kontrola = konstitutivno eksprimiran gen, npr. RPL27)

- Izračunati $-\Delta\Delta Ct$:

$$-\Delta\Delta Ct = - (\Delta Ct \text{ ispitivanog gena} - \Delta Ct \text{ kalibratora})$$

kalibrator označava gensku ekspresiju u netretiranom uzorku (npr. u WT mišu)

- Izračunati količinu ekspresije ispitivanog gena : (normalizovanu u odnosu na endogenu kontrolu i kalibrator):

Formula : $2^{-\Delta\Delta Ct}$

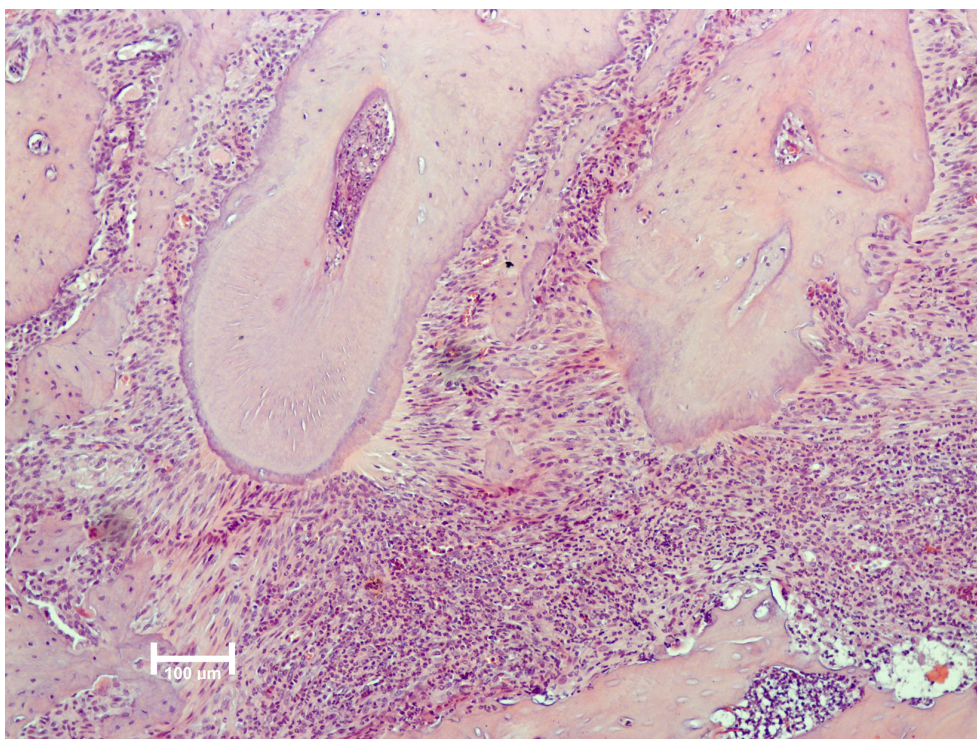
5. REZULTATI

5.1. PATOLOŠKO-HISTOLOŠKI NALAZ

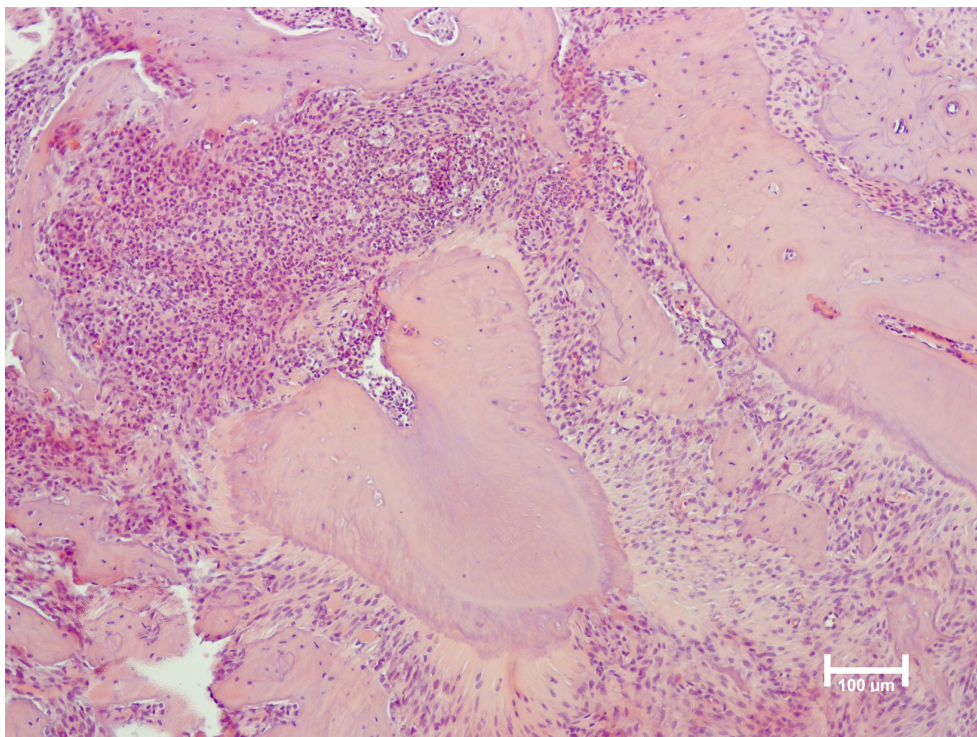
5.1.1 mesec dana od otvaranja zubne pulpe

C57BL/6 miševi divljeg tipa

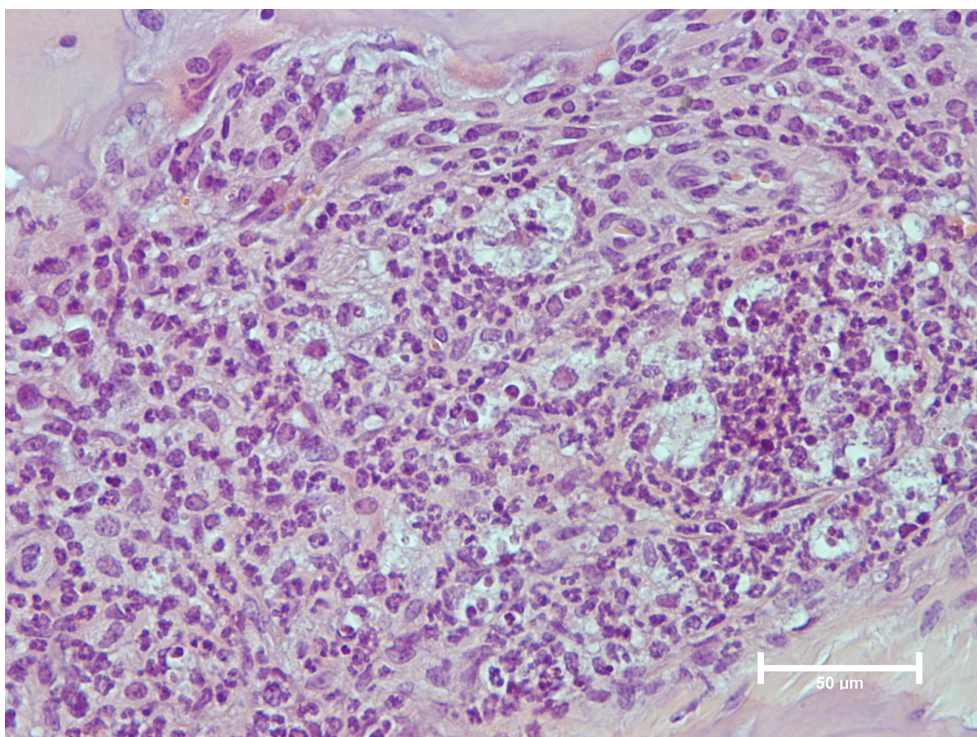
U periodontalnom prostoru molara C57BL/6 miševa divljeg tipa, žrtvovanih mesec dana od otvaranja zubne pulpe, uočen je jak periapeksni inflamatorni proces (*Slika 1.*). Brojni neutrofilni granulociti, mononuklearne ćelije, pre svih krupni makrofagi, penušave citoplazme, sa centralno postavljenim jedrom i limfociti nalazili su se u periodontalnom ligamentu oko samog vrha korena zuba (*Slike 2, 3 i 4.*). Na pojedinim tkivnim presecima primećeni su mikroapscesi sa demarkacionom zonom vezivno-tkivnih vlakana i penušavih makrofaga. Proces je praćen resorpcijom alveolarne kosti i zubnog cementa i prisustvom multijedarnih osteoklasta.



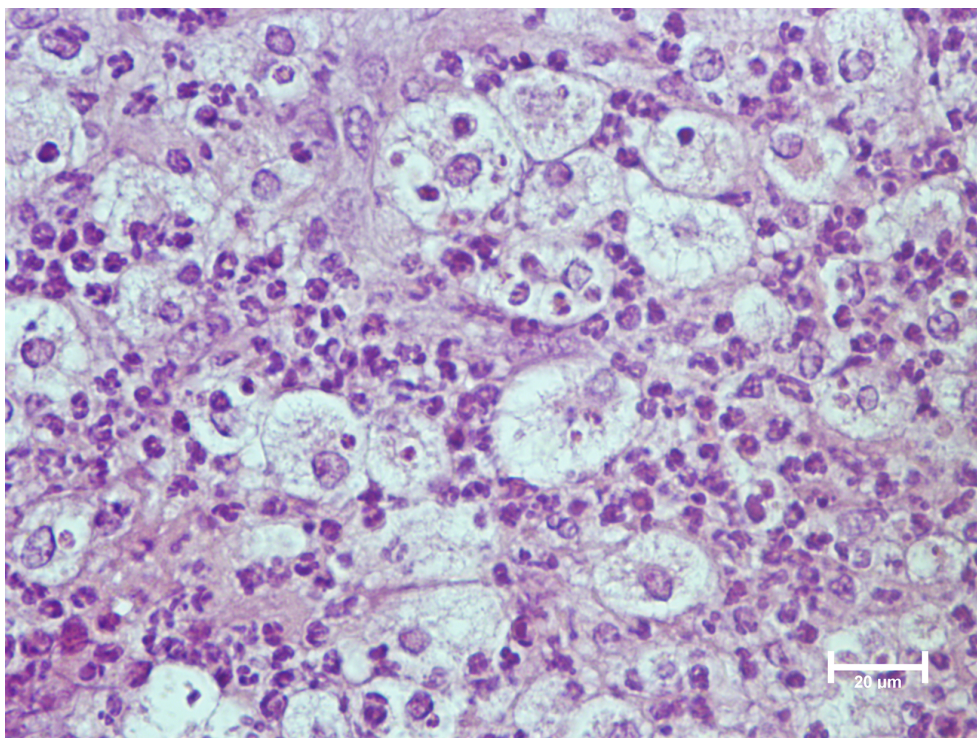
Slika 1. Jak granulocitno-mononuklearni infiltrat u periodontalnom prostoru zuba miša C57BL/6 mesec dana od otvaranja zubne pulpe
HE 100x



Slika 2. Jak granulocitno-mononuklearni infiltrat u periodontalnom prostoru zuba miša C57BL/6 mesec dana od otvaranja zubne pulpe
HE 100x



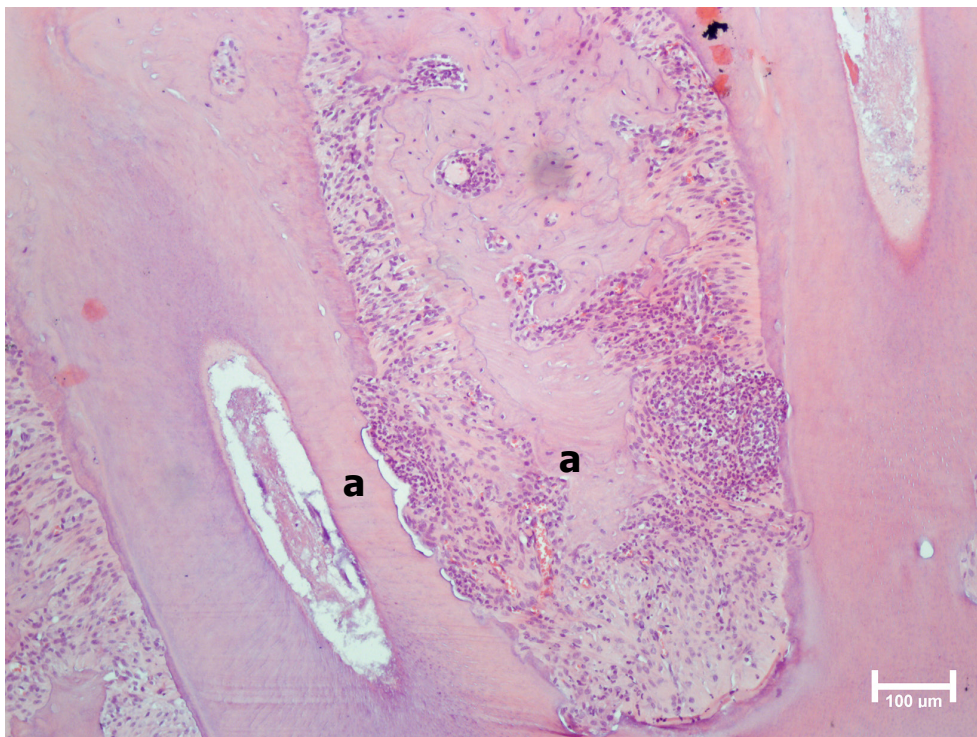
Slika 3. Penušavi makrofagi, neutrofilni granulociti i limfociti u periodontalnom prostoru zuba miša C57BL/6 mesec dana od otvaranja zubne pulpe
HE 400x



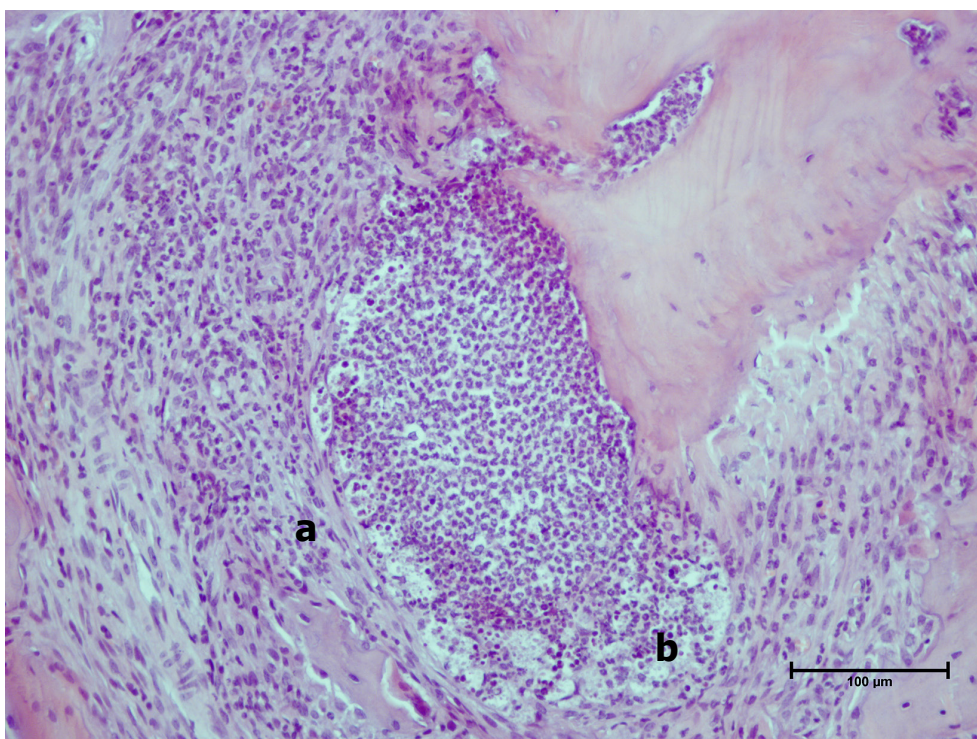
Slika 4. Penušavi makrofagi, neutrofilni granulociti i limfociti u periodontalnom prostoru mesec dana od otvaranja zubne pulpe
HE 600x

C57BL/6 galektin-3 nokaut miševi

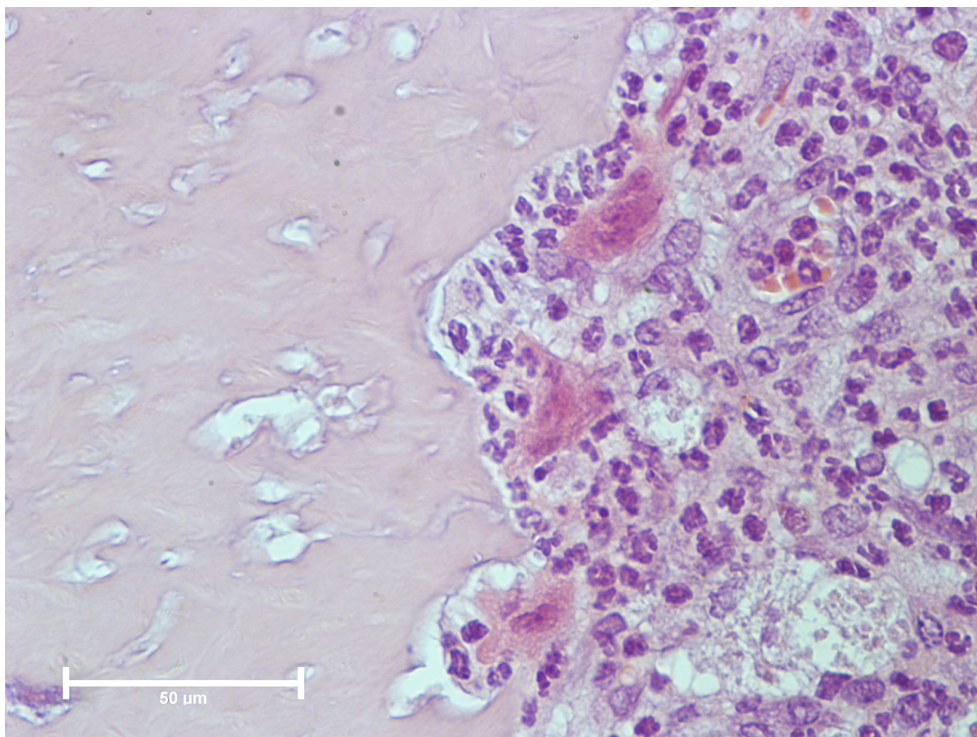
U periodontalnom prostoru molara galektin-3 nokaut C57BL/6 miševa, žrtvovanih mesec dana od otvaranja zubne pulpe, uočen je periapiksni inflamatorni proces istog tipa ali slabijeg intenziteta u odnosu na miševe divljeg tipa (*Slika 5.*). U inflamatornim infiltratima uočeni su krupni, svetli, penušavi makrofagi sa centralno postavljenim jedrom, nešto limfocita i brojni neutrofilni granulociti među kojima su neki bili apoptotični. Nalaz mikroapscesa sa tankom demarkacionom zonom vezivno-tkivnih vlakana i penušavih makrofaga nije bio redak (*Slika 6.*). Prisustvo brojnih osteoklasta ukazivalo je na proces razgradnje i resorpcije alveolarne kosti (*Slika 7.*), a u području uz koren zuba, kod nekoliko životinja, uočeni su retki siderociti i kristali hematoidina kao posledica sitnih krvavljenja (*Slika 8.*).



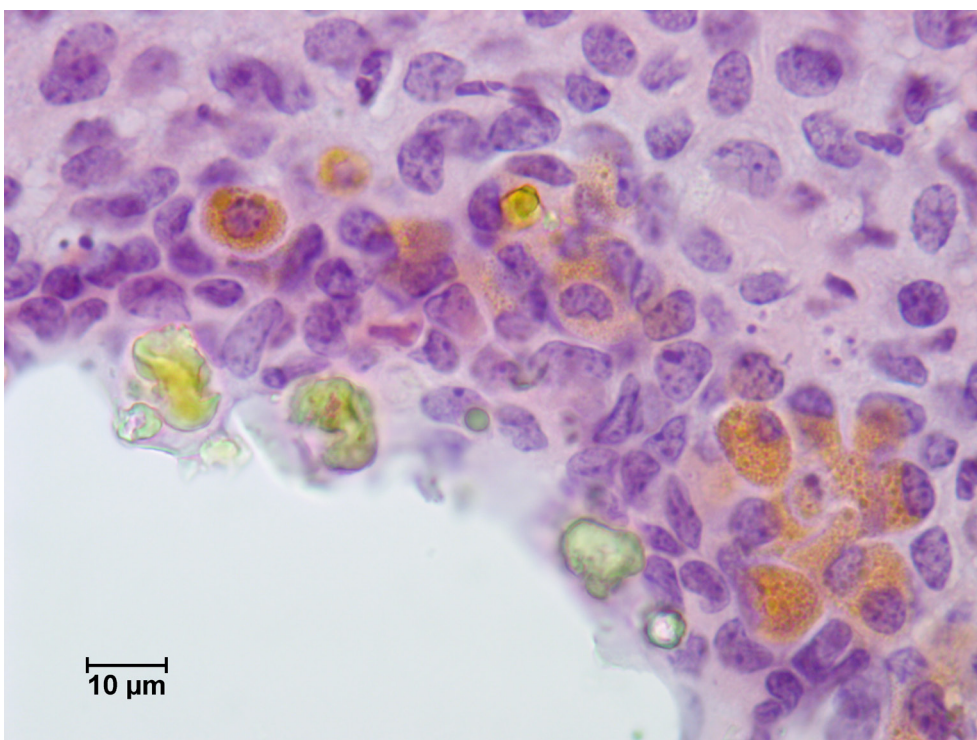
Slika 5. Granulocitno-mononuklearni infiltrat u periodoncijumu galektin-3 nokaut miša C57BL/6 mesec dana od otvaranja zubne pulpe. Vidi se i jaka resorpcija zubnog cementa i alveolarne kosti (a). HE 100x



Slika 6. Mikroapsces sa demarkacionom zonom vezivno-tkivnih vlakana (a) i penušavih makrofaga (b) u periodontalnom prostoru HE 200x



*Slika 7. Razgradnja alveolarne kosti i multijedarni osteoklasti u periodontalnom prostoru mesec dana od otvaranja zubne pulpe.
HE 600x*

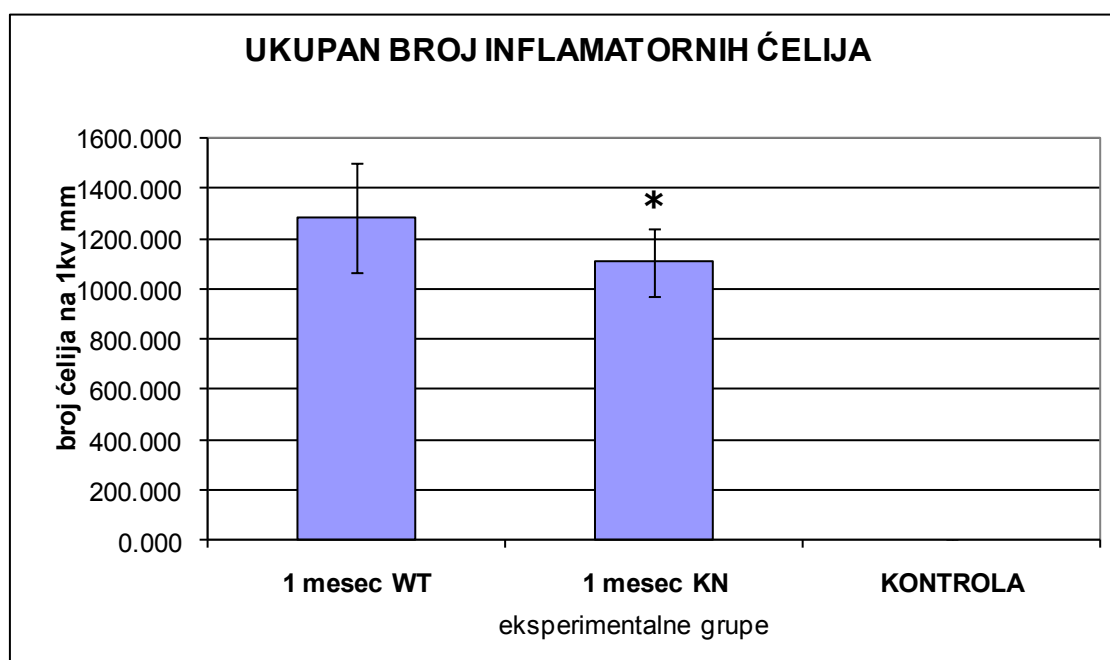


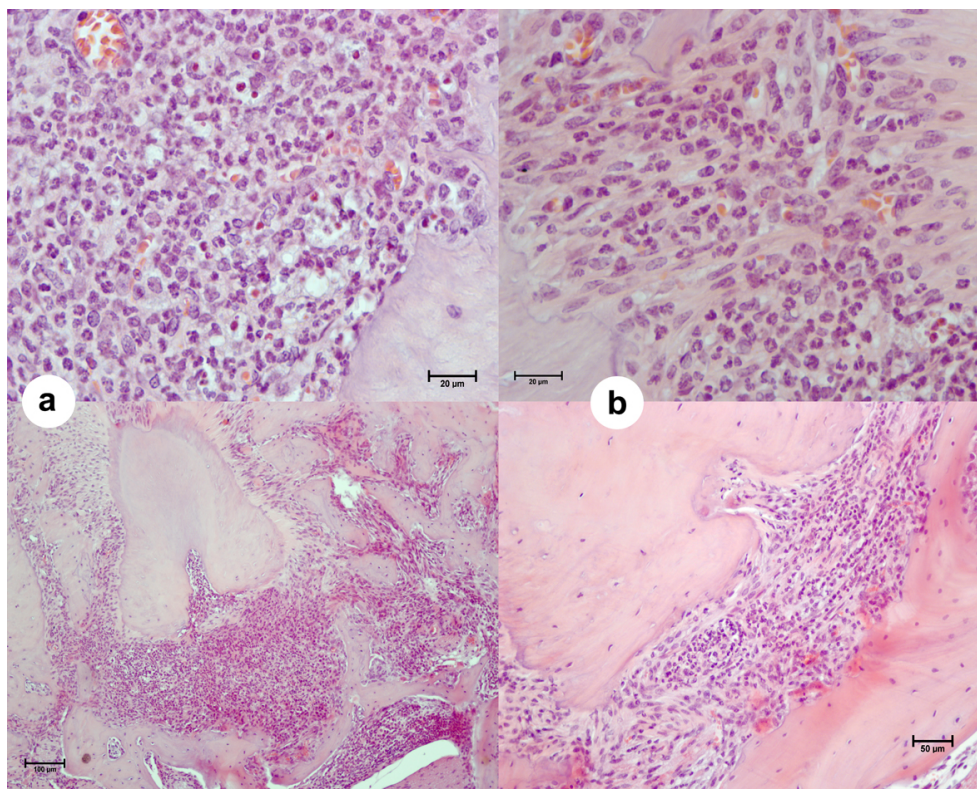
*Slika 8. Siderociti i kristali hematoidina u periodontalnom prostoru galectin-3 nokaut miša C57BL/6
HE 1000x*

Kvantitativna analiza:

Brojanjem inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm^2) mesec dana od otvaranja zubne pulpe utvrđen je statistički značajno ($p < 0.05$) niži intenzitet inflamacije periodontalnog prostora kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na miševe divljeg tipa (grafikon br.1)(Slika 9.).

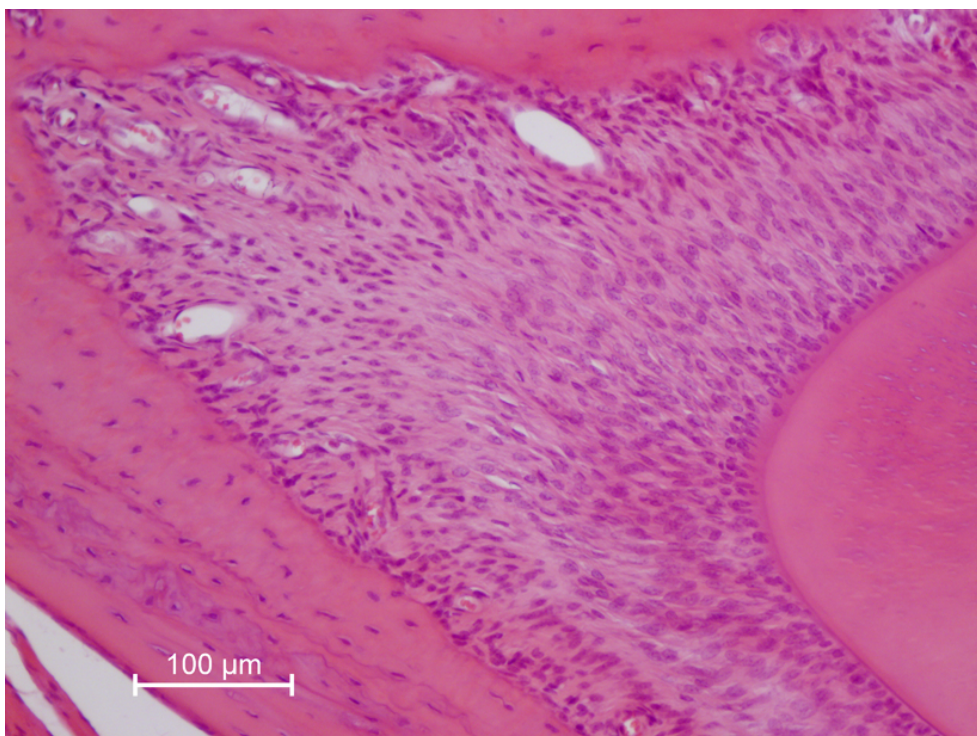
grafikon br. 1

**p<0.05**



Slika 9. a. Jaka infiltracija periodoncijuma – divlji tip C57BL/6
b. Infiltrat srednjeg intenziteta - C57BL/6 galektin-3 nokaut miš

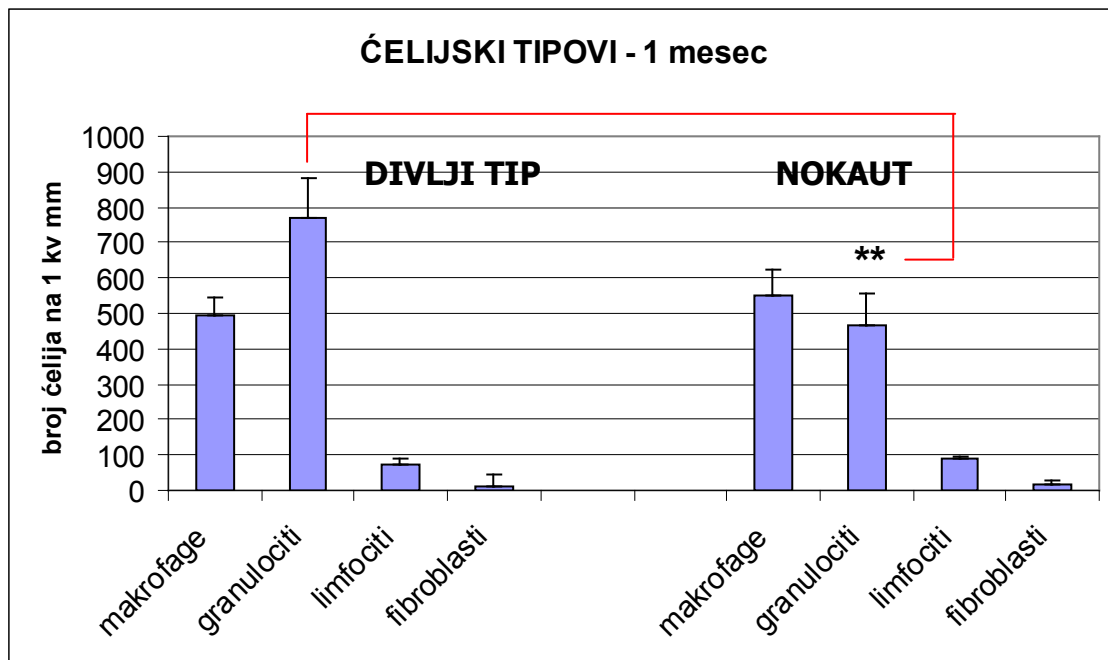
Na slici je prikazan je periodontalni ligament zdravih životinja, bez prisustva inflamatornih ćelija (Slika 10.).



Slika 10. Periodontalni ligament miša bez inflamatornih promena
HE 200x

Brojanjem pojedinih tipova inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm²) mesec dana od otvaranja zubne pulpe utvrđen je statistički veoma značajno manji broj neutrofilnih granulocita ($p < 0.01$) u inflamatornim infiltratima periodontalnog prostora kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na divlji tip (*grafikon br. 2*). Treba napomenuti da je broj makrofaga kod ovih životinja bio veći od broja granulocita što nije bio slučaj kod miševa divljeg tipa.

grafikon br. 2

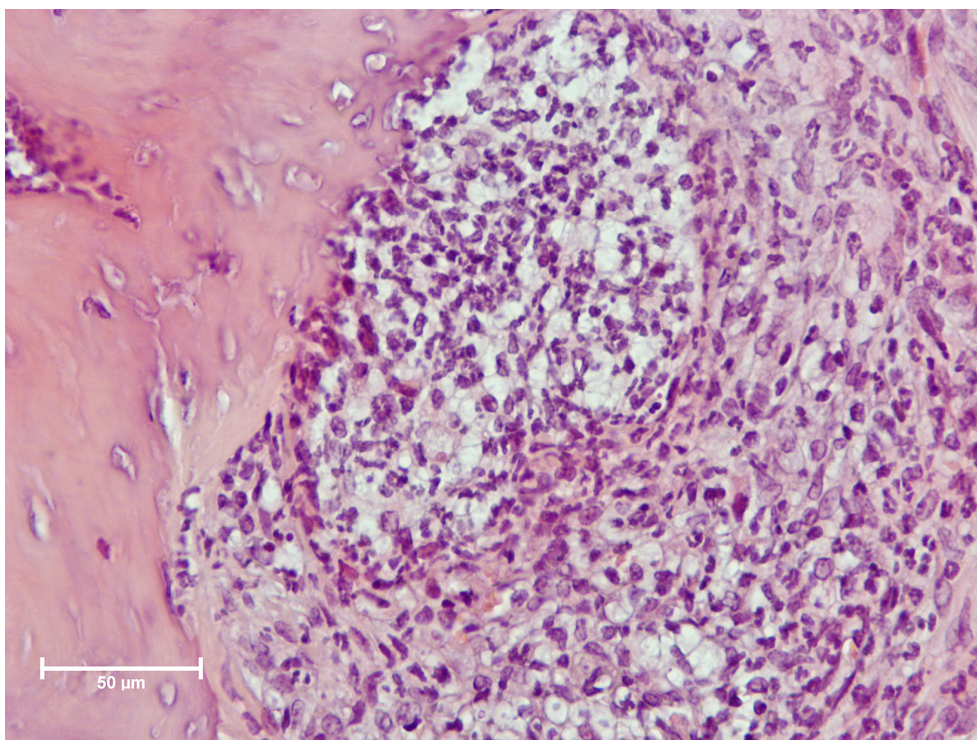


** $p < 0.01$

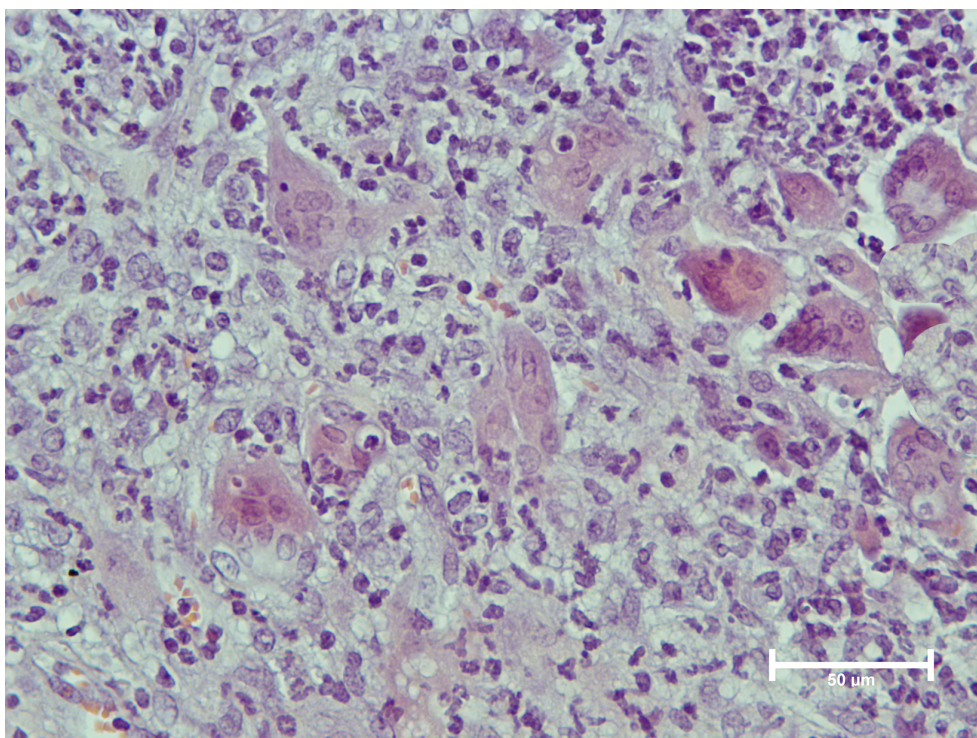
5.1.2 šest nedelja od otvaranja zubne pulpe

C57BL/6 miševi divljeg tipa

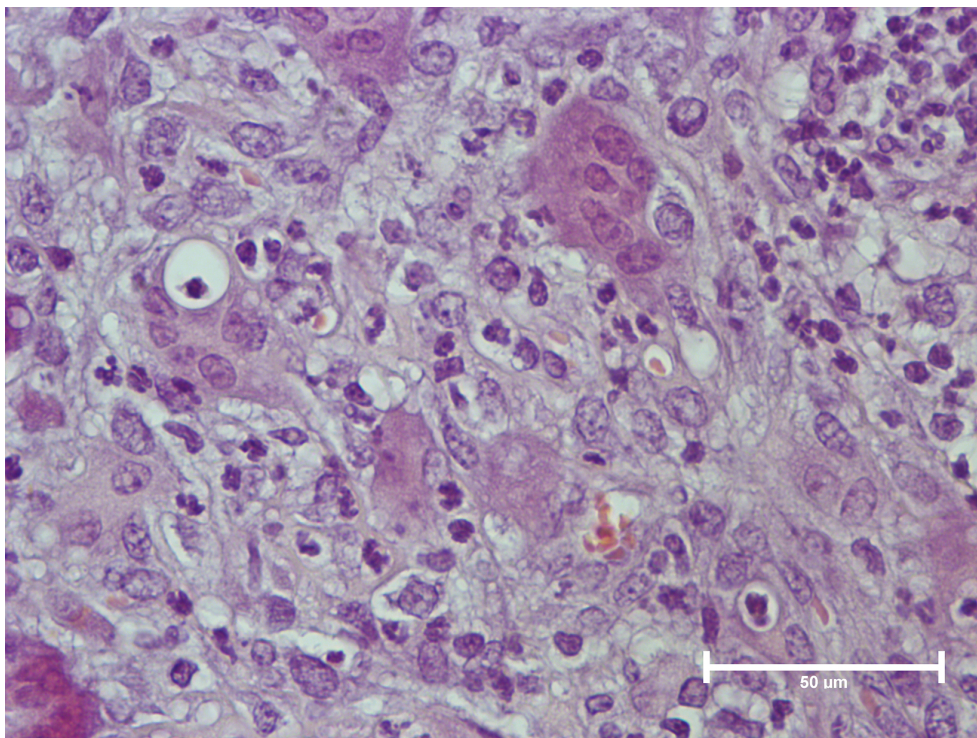
U periodontalnom prostoru molara C57BL/6 miševa žrtvovanih šest nedelja od otvaranja zubne pulpe uočen je jak periapiksni inflamatorni proces (*Slike 11 i 14*). Brojni neutrofilni granulociti i mononuklearne ćelije, pre svih krupni makrofagi penušave citoplazme sa centralno postavljenim jedrom i limfociti, nalazili su se u periodontalnom ligamentu oko samog vrha korena zuba. Proces je praćen jakom resorpcijom alveolarne kosti i zubnog cementa sa prisustvom multijedarnih osteoklasta (*Slike 12 i 13*), a reparatorni procesi bili su intenzivniji u odnosu na termin posle mesec dana. Kod pojedinih životinja uočeni su i mikroapscesi (*Slika 11*).



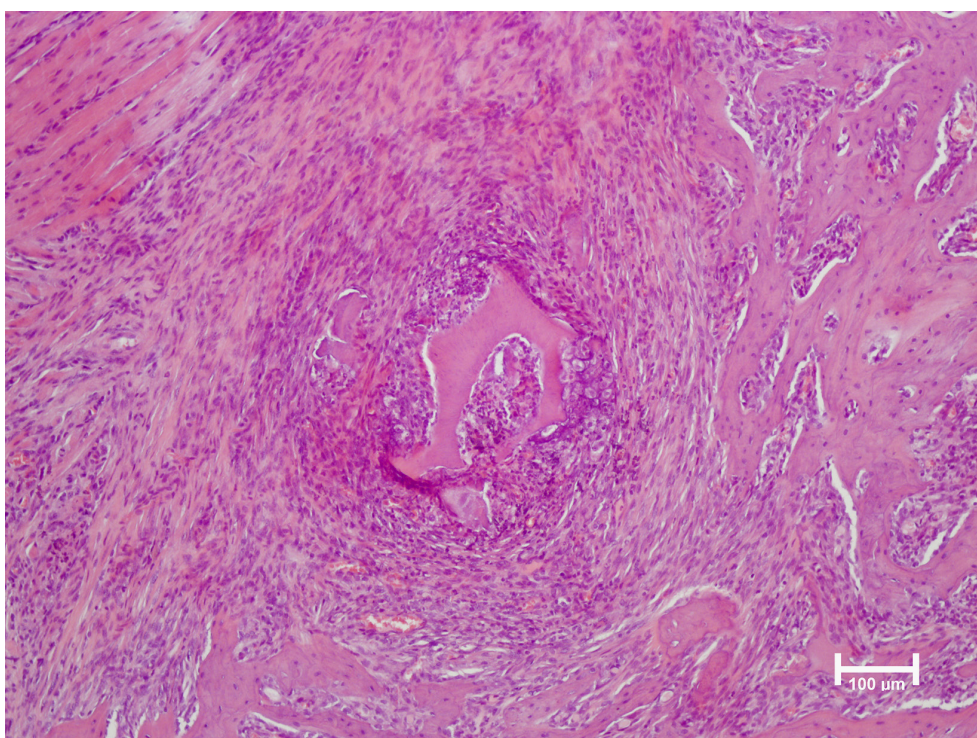
Slika 11. Mikroapsces ograničen vezivno-tkivnom kapsulom i jak inflamatorni infiltrat u periodontalnom prostoru miša divljeg tipa C57BL/6 šest nedelja od otvaranja zubne pulpe.
HE 400x



Slika 12. Veliki broj multijedarnih osteoklasta u periodontalnom prostoru miša divljeg tipa C57BL/6 šest nedelja od otvaranja zubne pulpe.
HE 400x



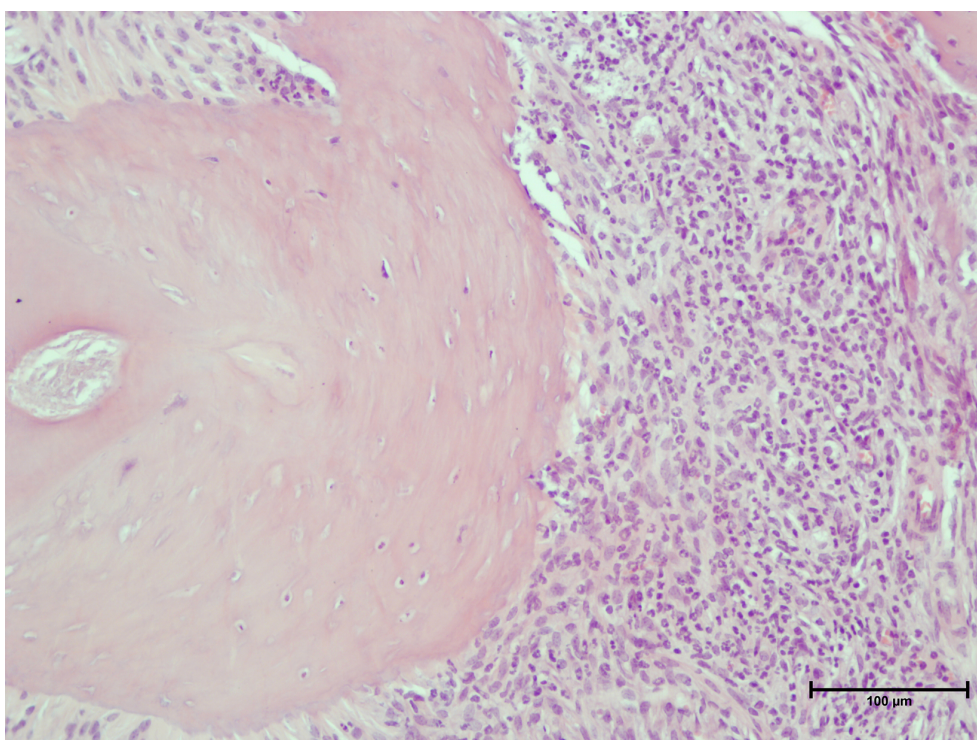
Slika 13. Multijedarni osteoklasti u periodontalnom prostoru šest nedelja od otvaranja zubne pulpe.
HE 600x



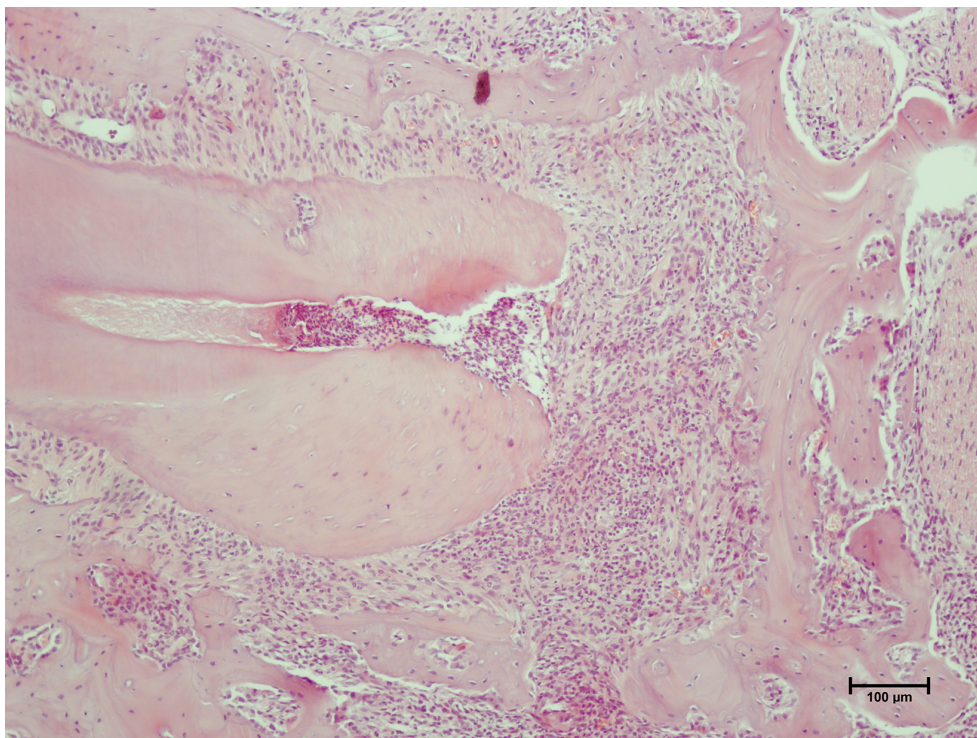
Slika 14. Jak inflamatorni infiltrat u periodontalnom prostoru miša divljeg tipa C57BL/6 šeste nedelje od otvaranja zubne pulpe.
Uočava se jako proširen periodontalni ligament
HE 100x

C57BL/6 galektin-3 nokaut miševi

U periodontalnom prostoru molara galektin-3 nokaut C57BL/6 miševa, žrtvovanih šest nedelja od otvaranja zubne pulpe, uočen je periapeksni inflamatorni proces istog tipa ali slabijeg intenziteta u odnosu na miševe divljeg tipa (*Slika 15.*). U inflamatornim infiltratima najzastupljeniji su bili makrofagi i neutrofilni granulociti sa manjim brojem limfocita. Mlado vezivno tkivo širilo se u vidu eliptičnih traka (*Slika 15.*) i bilo je nešto jače izraženo nego kod miševa divljeg tipa u istom terminu. Uočena je jaka razgradnja i resorpcija alveolarne kosti i zubnog cementa uz proširenje periodontalnog prostora. (*Slika 16.*) i brojne multijedarne osteoklaste.



Slika 15. *Inflamatorni infiltrat u periodontalnom prostoru galektin-3 nokaut miša C57BL/6 šest nedelja od otvaranja zubne pulpe. Uočavaju se trake mladog vezivnog tkiva. HE 200x*

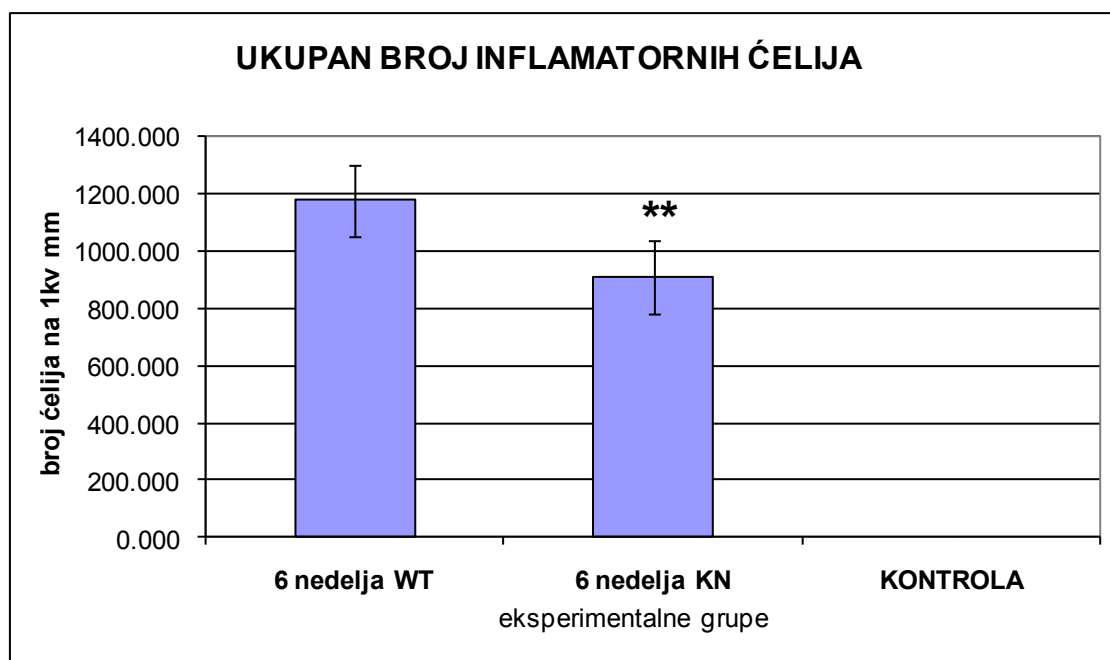


Slika 16. C57BL/6 galektin-3nokaut miš šest nedelja od otvaranja zubne pulpe. Periodontalni ligament je proširen usled resorpcije alveolarne kosti i zubnog cementa HE 100x

Kvantitativna analiza:

Brojanjem inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm^2) šest nedelja od otvaranja zubne pulpe utvrđen je statistički veoma značajno ($p < 0.01$) niži intenzitet inflamacije periodontalnog prostora kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na divlji tip (*grafikon br.3*).

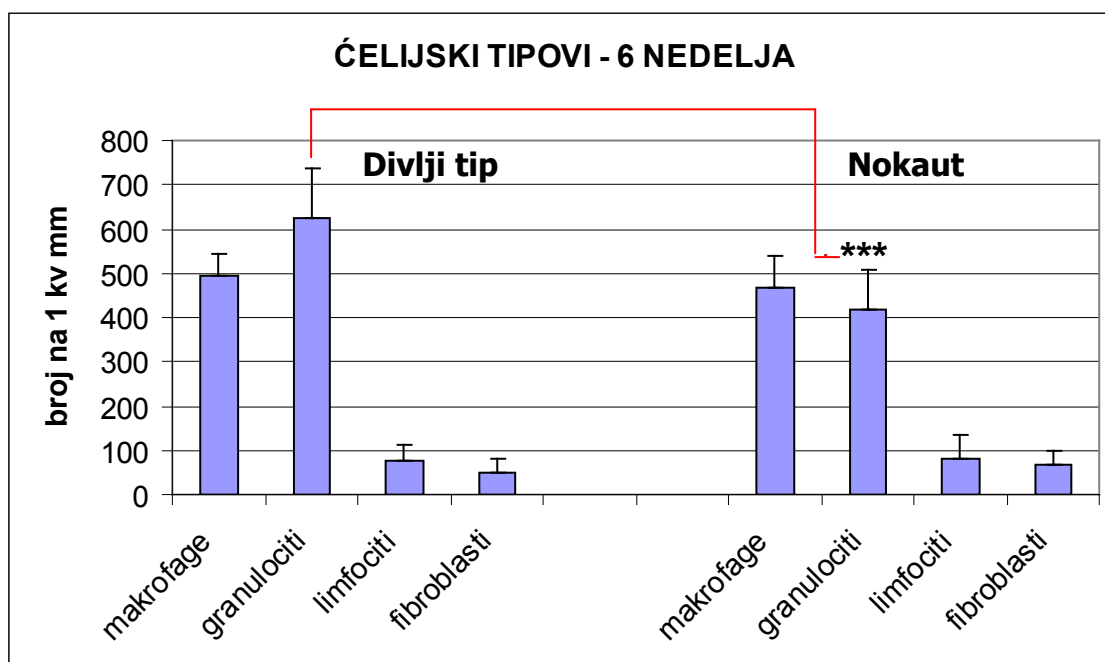
grafikon br. 3



** p<0.01

Brojanjem pojedinih tipova inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm²) šest nedelja od otvaranja zubne pulpe utvrđen je statistički veoma značajno manji broj neutrofilnih granulocita (p<0.001) u inflamatornim infiltratima periodontalnog prostora kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na divlji tip (*grafikon br.4*).

grafikon br. 4

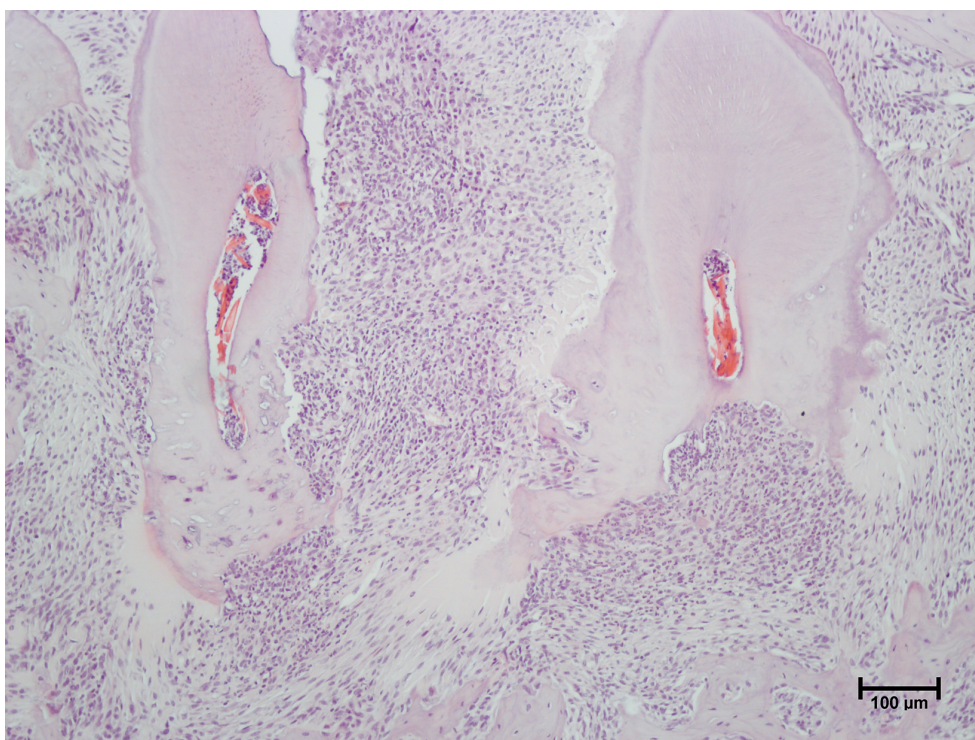


*** p<0.001

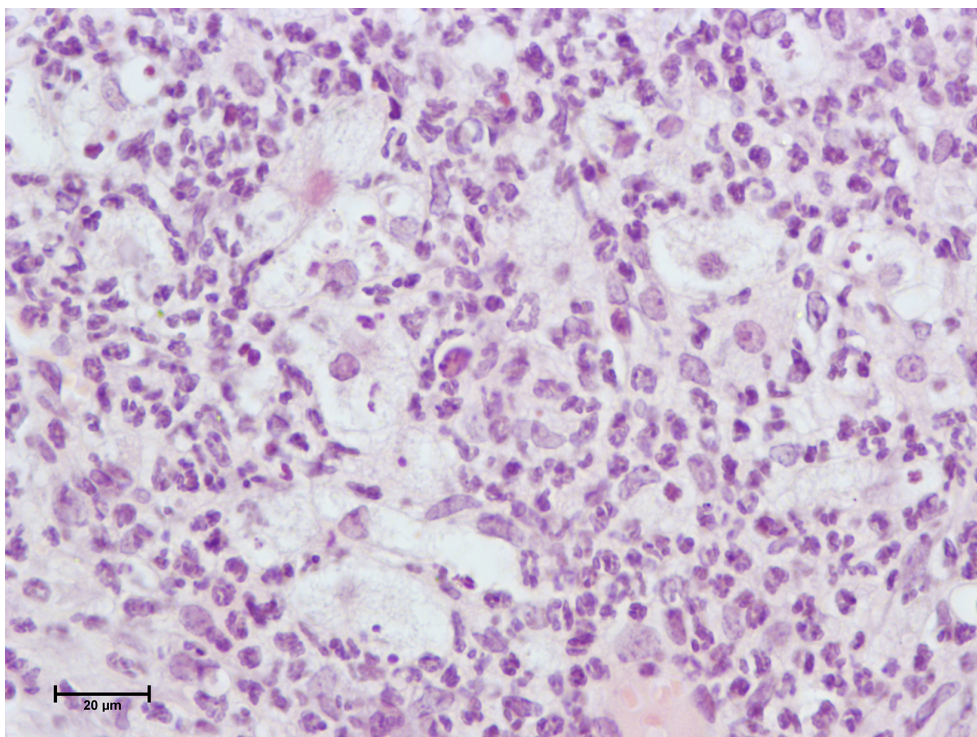
5.1.3 četiri meseca od otvaranja zubne pulpe

C57BL/6 miševi divljeg tipa

U periodontalnom prostoru molara C57BL/6 miševa žrtvovanih četiri meseca od otvaranja zubne pulpe uočen je manje intenzivan ali mnogo ekstenzivniji periapiksni inflamatorni proces u odnosu na prethodne termine (*Slika 17.*). Najbrojnije ćelije u inflamatornim infiltratima bili su makrofagi različite morfologije sa mnogo manje neutrofilnih granulocita (*Slika 18.*) i nešto više limfocita nego u prethodnim terminima. Proces je bio praćen jakom resorpcijom alveolarne kosti i zubnog cementa sa prisustvom multijedarnih osteoklasta i intenzivnijim reparatornim procesima u odnosu na prethodne termine.



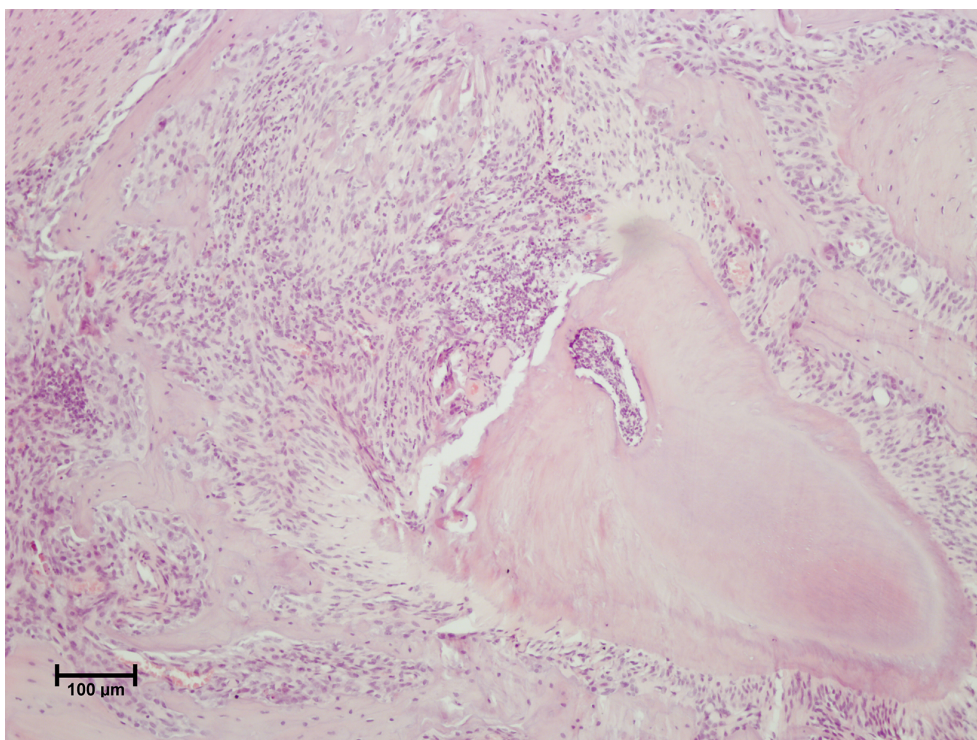
Slika 17. Ekstenzivan inflamatorni proces u periodontalnom prostoru miša divljeg tipa C57BL/6 četvrtog meseca od otvaranja zubne pulpe. Uočava se jako proširen periodontalni ligament
HE 100x



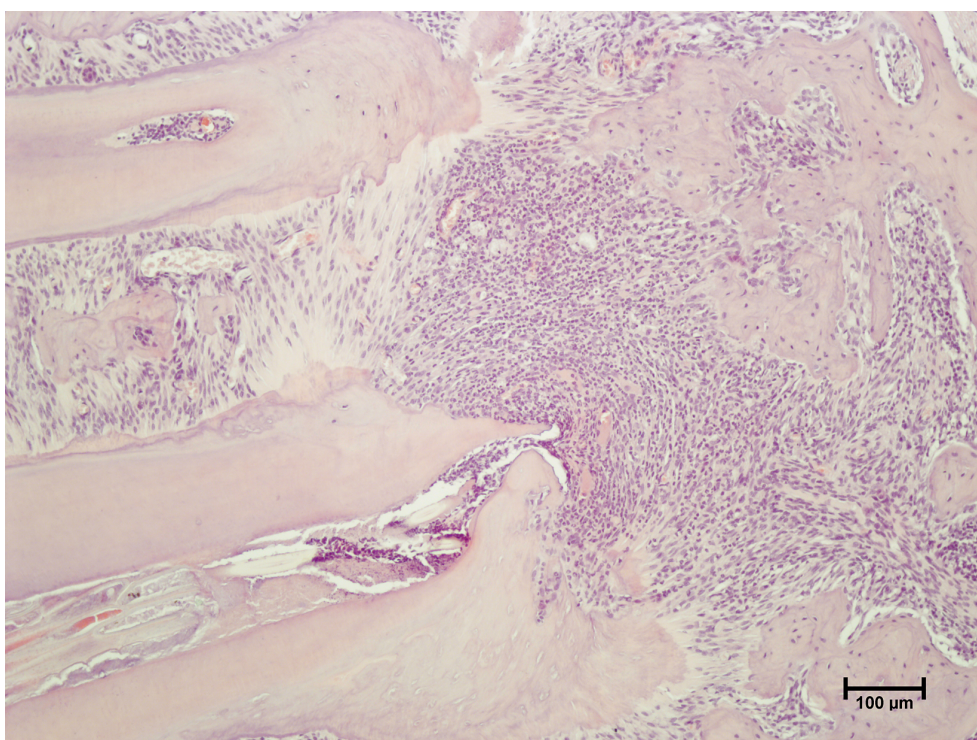
Slika 18. C57BL/6 divlji tip, četvrtog meseca od otvaranja zubne pulpe. U periodontalnom prostoru najbrojnije ćelije su makrofagi različite morfologije, a neutrofilnih granulocita i limfocita je manje. HE 600x

C57BL/6 galektin-3 nokaut miševi

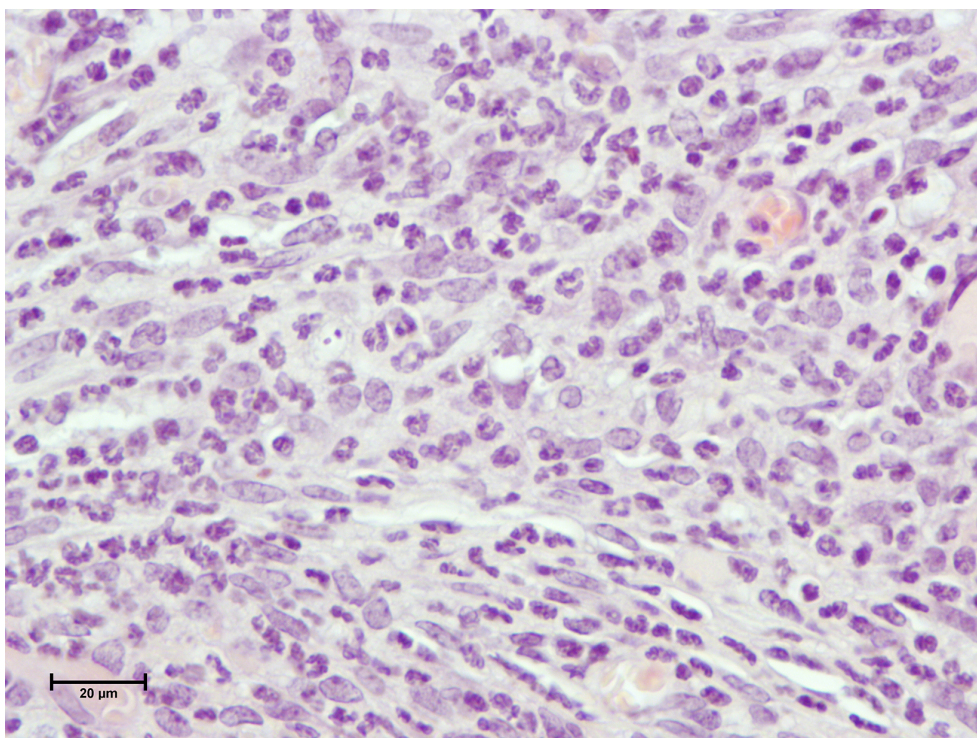
U periodontalnom prostoru molara galektin-3 nokaut C57BL/6 miševa žrtvovanih četiri meseca od otvaranja zubne pulpe uočen je ekstenzivan periapexni inflamatorni proces istog tipa i približnog intenziteta u odnosu na miševе divljeg tipa (*Slike 19 i 20.*). Najbrojnije inflamatorne ćelije bili su makrofagi, neutrofilnih granulocita je bilo nešto manje nego u prethodnim terminima (*Slika 21.*) a limfocita nešto više. Uočeno je i mlado vezivno tkivo u vidu eliptičnih traka, jače izraženo nego kod miševa divljeg tipa u istom terminu i jaka razgradnja i resorpcija alveolarne kosti i zubnog cementa uz proširenje periodontalnog prostora i brojne multijedarne osteoklaste (*Slike 19 i 20.*).



Slika 19. Ekstenzivan inflamatorni proces u periodontalnom prostoru galektin-3 nokaut miša C57BL/6 četvrtog meseca od otvaranja zubne pulpe. Uočava se jako proširen periodontalni ligament
HE 100x



Slika 20. Ekstenzivan inflamatorni proces u periodontalnom prostoru četvrtog meseca od otvaranja zubne pulpe. Uočava se jako proširen periodontalni ligament.
HE 100x

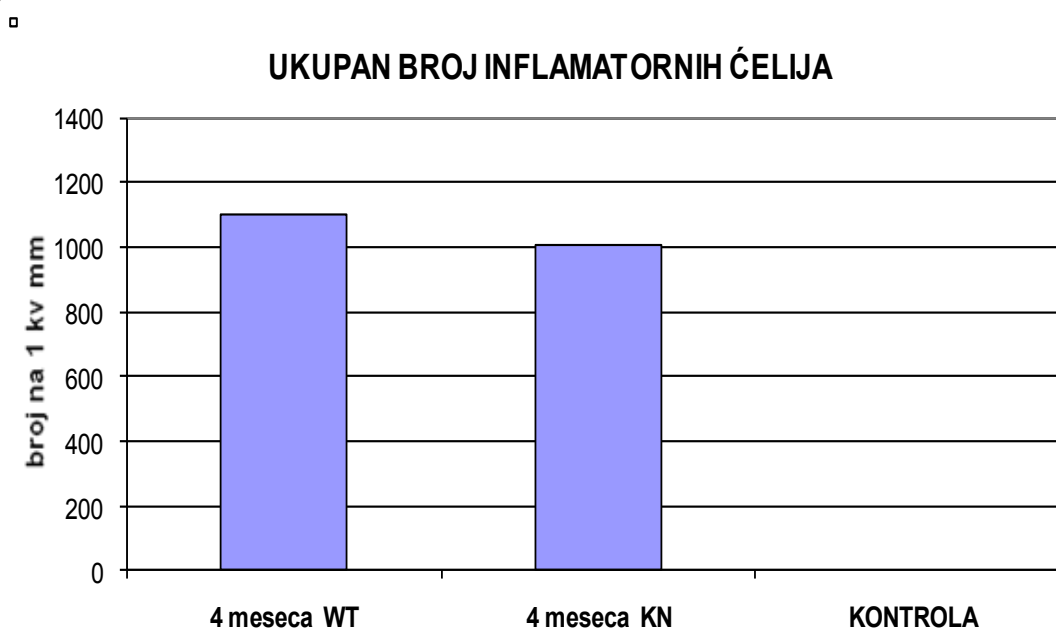


Slika 21. Najbrojnije ćelije su makrofagi a neutrofilnih granulocita ima manje četvrtog meseca od otvaranja zubne pulpe nego u prethodnim terminima HE 600x

Kvantitativna analiza:

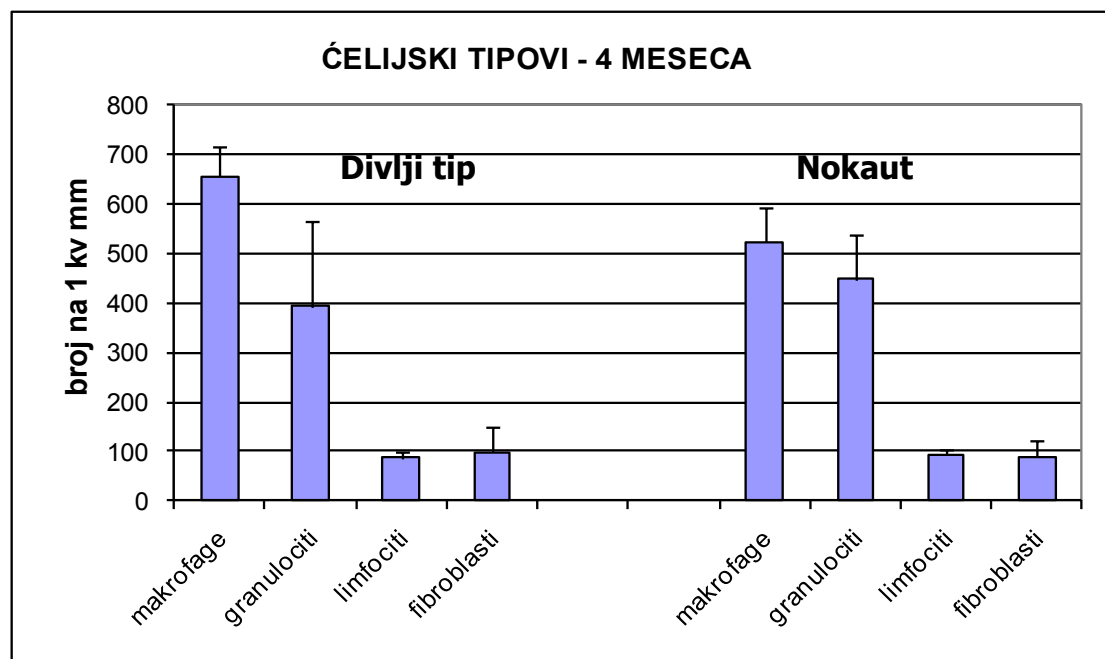
Brojanjem inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm²) periapeksnih inflamatornih lezija, četiri meseca od otvaranja zubne pulpe, utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika između galektin-3 nokaut miševa i miševa divljeg tipa (grafikon br.5).

grafikon br. 5



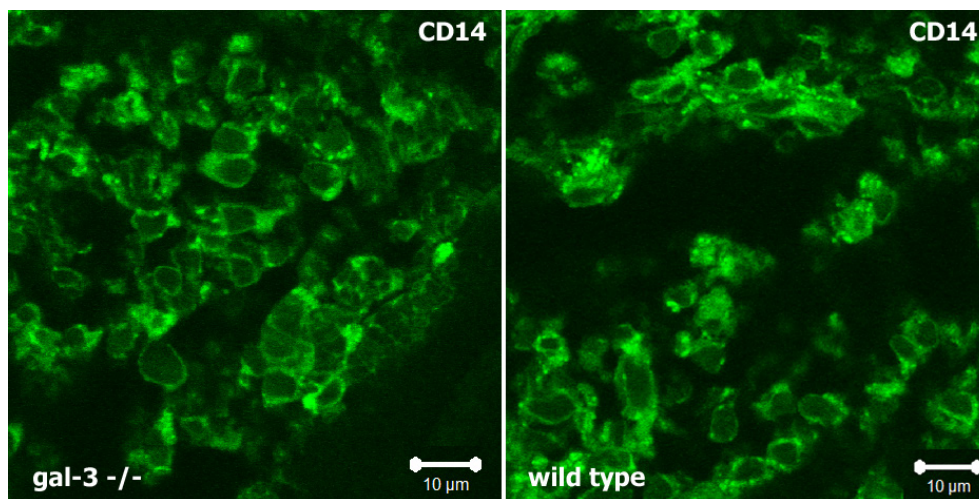
Brojanjem pojedinih tipova inflamatornih ćelija po jedinici površine (1mm^2) periapexnih inflamatornih lezija, četiri meseca od otvaranja zubne pulpe, utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika između galektin-3 nokaut miševa i miševa divljeg tipa. Makrofagi su najbrojnije ćelije i njihov broj nešto je manji kod nokaut miševa dok je granulocita kod ovih miševa nešto više nego kod miševa divljeg tipa (*grafikon br.6*).

grafikon br. 6

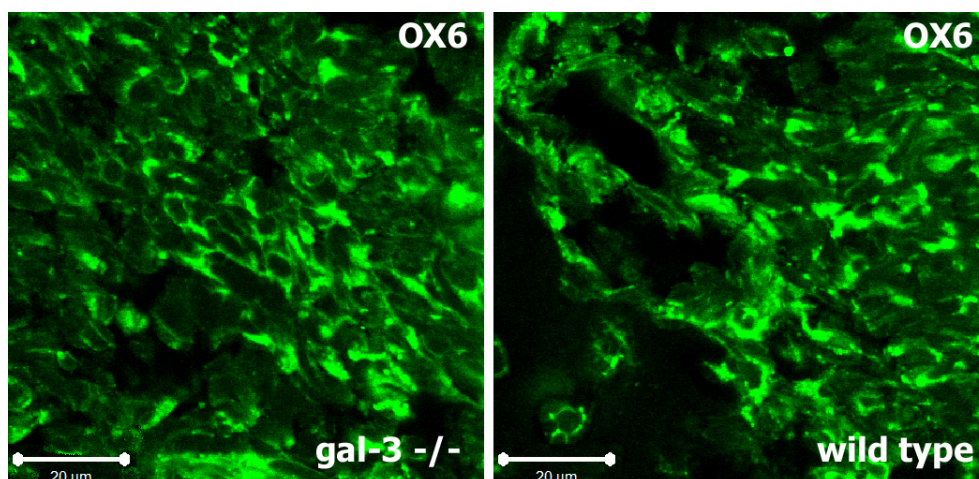


5.2. IMUNOFLUORESCENTNA ANALIZA

Imunofluorescentna analiza tkivnih uzoraka urađena je u terminu mesec dana od indukovanja periapexnih lezija, a praćena je ekspresija CD14 molekula na ćelijama u periapexnim inflamatornim infiltratima (*Slika 22.*) i ekspresija MHC molekula klase II (*Slika 23.*). Nisu uočene razlike u ekspresiji ovih molekula kod galektin-3 deficijentnih C57BL/6 miševa u odnosu na divlji tip.



Slika 22. Ne uočava se razlika u nivou ekspresije CD14 molekula u periodontalnim inflamatornim lezijama kod galektin-3 deficijentnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa mesec dana od izazivanja oboljenja. Konfokalni mikroskop Zeiss Axiovert 200M (objektiv 63x oil).



Slika 23. Ne uočava se razlika u nivou ekspresije MHC molekula II klase u periodontalnim inflamatornim lezijama kod galektin-3 deficijentnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa mesec dana od izazivanja oboljenja. Konfokalni mikroskop Zeiss Axiovert 200M (objektiv 63x oil)

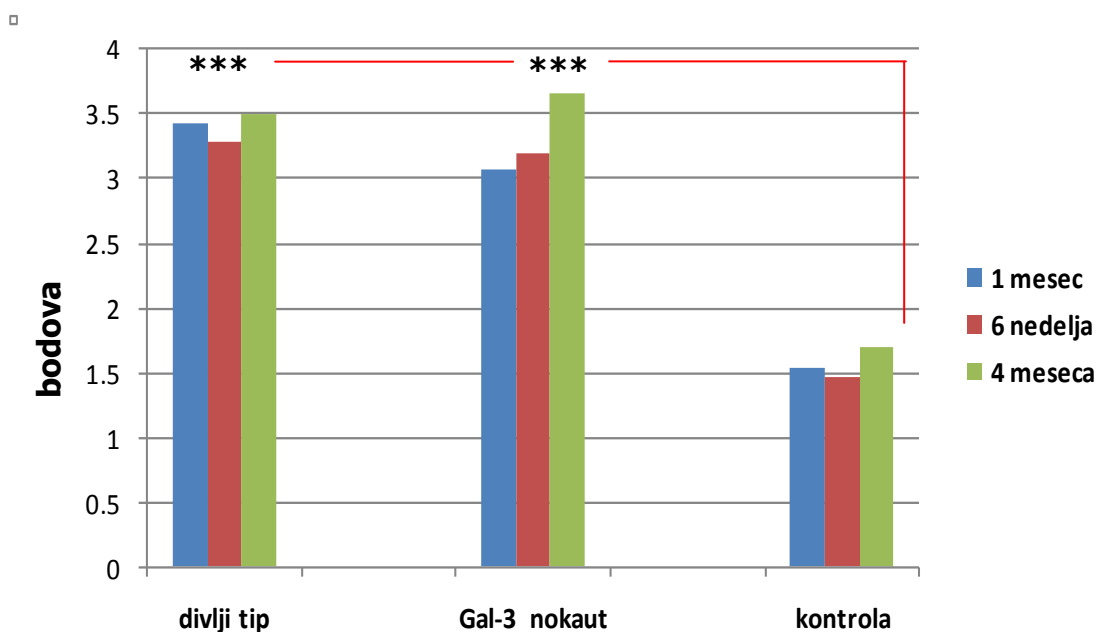
5.3. SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA

Odgovarajućim bodovanjem uočenih promena, kako je to opisano u poglavlju *materijal i metode*, morfometrijski je analizirana debljina periodontalnog ligamenta, ekstenzivnost inflamacije i nivo resorpcije alveolarne kosti i zubnog cementa.

5.3.1. DEBLJINA PERIODONTALNOG LIGAMENTA

Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je statistički veoma značajno ($p < 0.001$) povećanje debljine periodontalnog ligamenta u sva tri termina i kod obe grupe miševa u odnosu na kontrolnu grupu (*grafikon br.7*).

grafikon br. 7

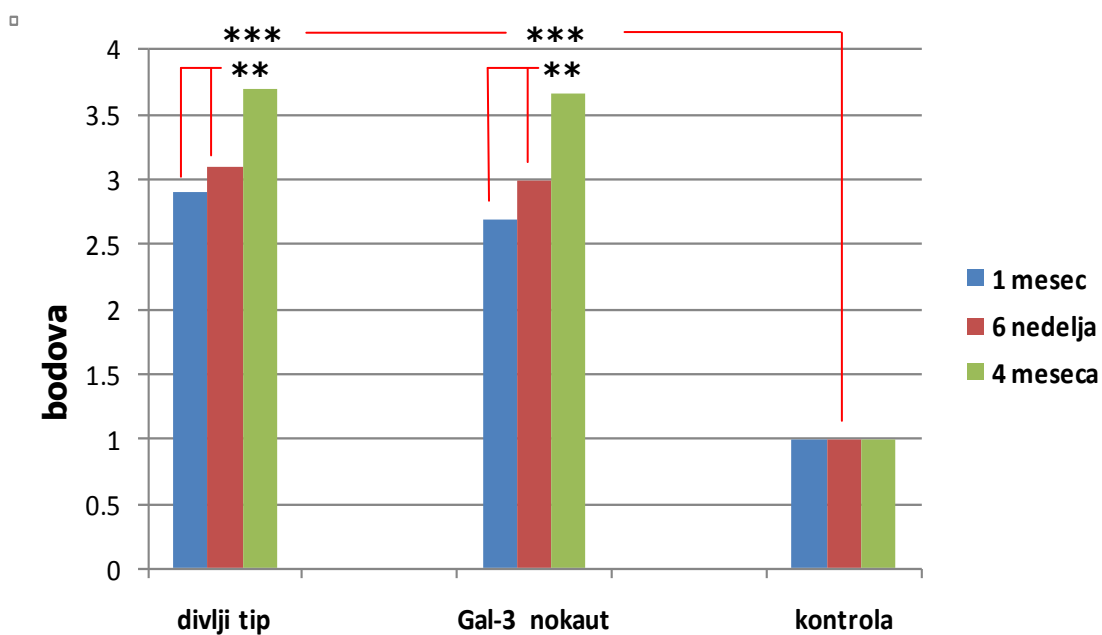


*** $p < 0.001$

5.3.2. EKSTENZIVNOST INFLAMACIJE

Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je statistički veoma značajno ($p < 0.001$) povećanje ekstenzivnosti inflamatornih infiltrata kod životinja žrtvovanih četvrtog meseca i kod obe grupe miševa u odnosu na kontrolnu grupu (*grafikon br.8*). Statistički veoma značajno ($p < 0.01$) povećanje ekstenzivnosti inflamacije uočava se četvrtog meseca u odnosu na prva dva termina u obe eksperimentalne grupe (*grafikon br.8*).

grafikon br. 8

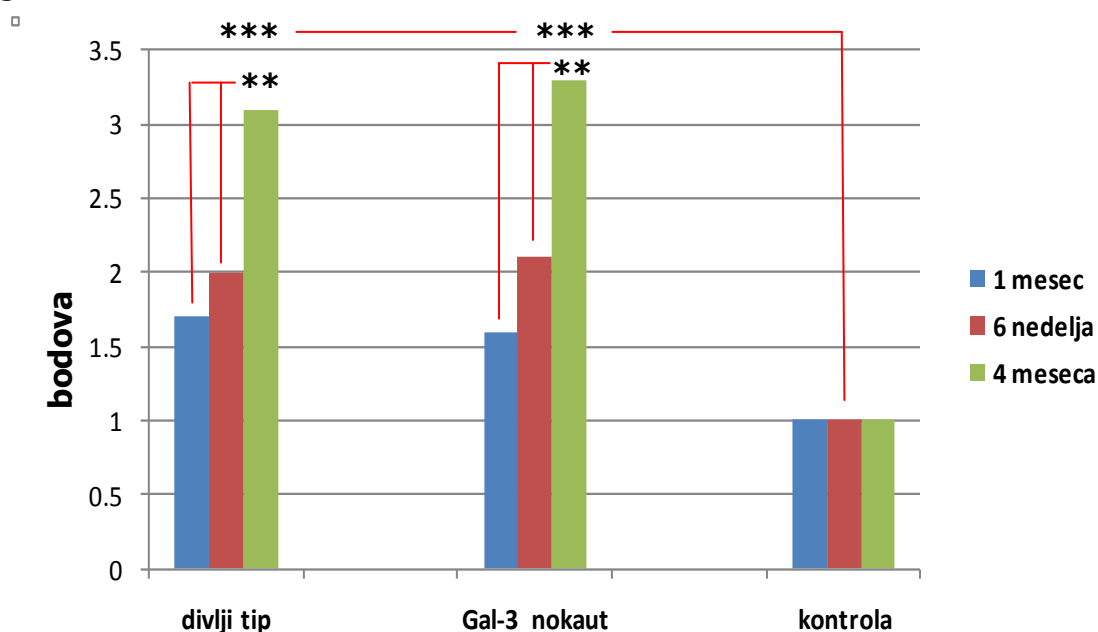


*** p<0.001, ** p<0.01

5.3.3. RESORPCIJA ALVEOLARNE KOSTI

Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je statistički veoma značajno ($p < 0.001$) povećanje nivoa resorpcije alveolarne kosti kod životinja žrtvovanih četvrtog meseca u obe grupe miševa u odnosu na kontrolnu grupu (*grafikon br.9*). Statistički veoma značajno ($p < 0.01$) povećanje uočava se četvrtog meseca u odnosu na prva dva termina u obe eksperimentalne grupe (*grafikon br.9*).

grafikon br. 9

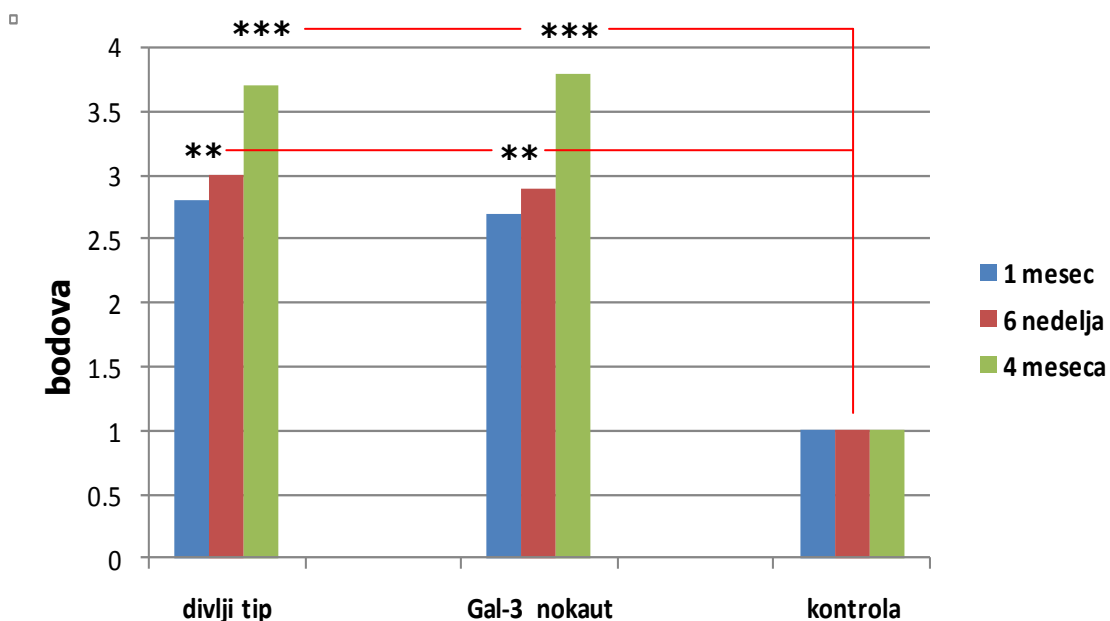


*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

5.3.4. RESORPCIJA ZUBNOG CEMENTA

Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je statistički veoma značajno ($p < 0.001$) povećanje resorpcije zubnog cementa kod životinja žrtvovanih četvrtog meseca u obe grupe miševa u odnosu na kontrolnu grupu (*grafikon br.10*). Statistički veoma značajno ($p < 0.01$) povećanje uočava se i posle mesec dana i šest nedelja u odnosu na kontrolnu grupu (*grafikon br.10*).

grafikon br. 10



*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

5.4. REAL-TIME PCR ANALIZA

Real-time PCR analiza tkivnih uzoraka urađena je mesec dana od izazivanja periapeksnih inflamatornih lezija. Kvantitativno je analizirana ekspresija gena za IFN γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, TNF α , IL-10, IL-12, IL-17, TGF β , TLR2, TLR4, IL-21, IL-23, IL-18, IL-8, IL-4, IL-22 i IL-2.

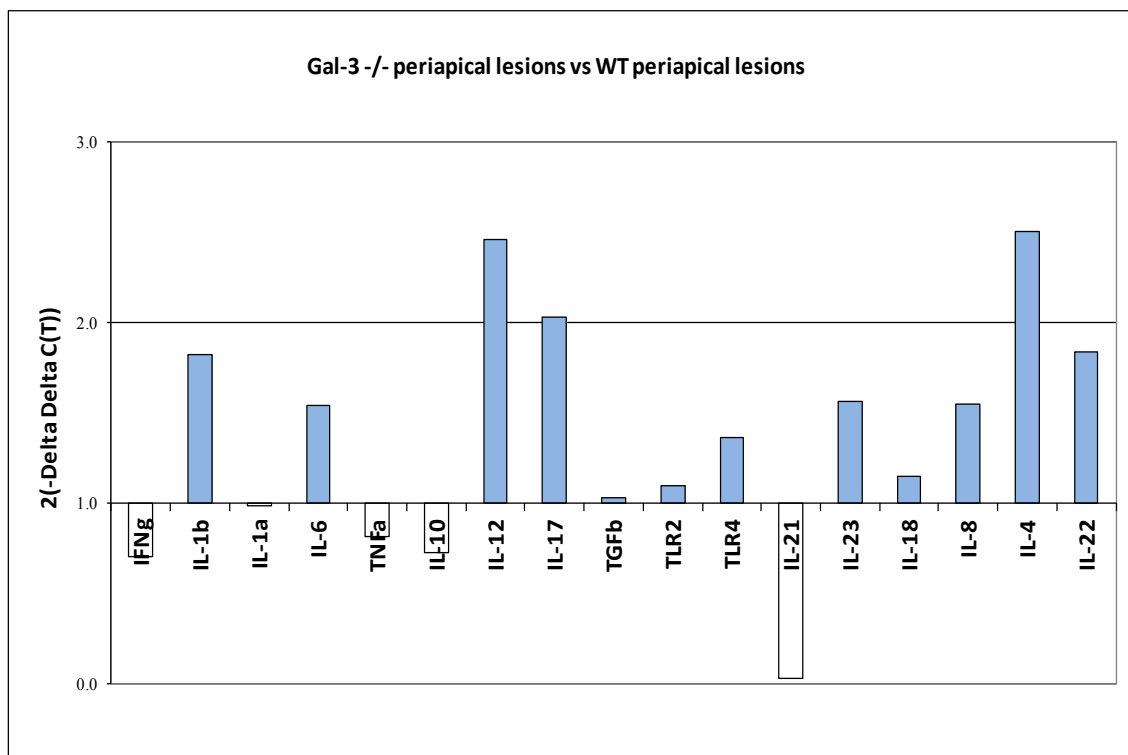
U tabeli 6 prikazan je broj životinja u svakoj ispitivanoj grupi kod kojih je detektovana ekspresija pojedinih gena (grupa n=10). Nije detektovana ekspresija gena za IL-2, a ekspresija gena za IL-21 detektovana je samo u tkivu periapeksnih lezija ali ne i kod intaktnih životinja.

Tabela 6: detektovana ekspresija gena

grupa	IFN γ	IL-1 β	IL-1 α	IL-6	TNF α	IL-10	IL-12	IL-17	TGF β
periapeksni periodontitis (galektin-3 nokaut) 1.mesec	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	TLR2	TLR4	IL-21	IL-23	IL-18	IL-8	IL-4	IL-22	IL-2
	10/10	10/10	7/10	10/10	9/10	10/10	8/10	10/10	0/10
periapeksni periodontitis (divlji tip) 1.mesec	IFN γ	IL-1 β	IL-1 α	IL-6	TNF α	IL-10	IL-12	IL-17	TGF β
	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	TLR2	TLR4	IL-21	IL-23	IL-18	IL-8	IL-4	IL-22	IL-2
	10/10	10/10	6/10	9/10	10/10	10/10	6/10	9/10	0/10
intaktne životinje (galektin-3 nokaut)	IFN γ	IL-1 β	IL-1 α	IL-6	TNF α	IL-10	IL-12	IL-17	TGF β
	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	TLR2	TLR4	IL-21	IL-23	IL-18	IL-8	IL-4	IL-22	IL-2
	10/10	10/10	0/10	8/10	10/10	10/10	9/10	8/10	0/10
intaktne životinje (divlji tip)	IFN γ	IL-1 β	IL-1 α	IL-6	TNF α	IL-10	IL-12	IL-17	TGF β
	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	TLR2	TLR4	IL-21	IL-23	IL-18	IL-8	IL-4	IL-22	IL-2
	10/10	10/10	0/10	8/10	10/10	10/10	5/10	10/10	0/10

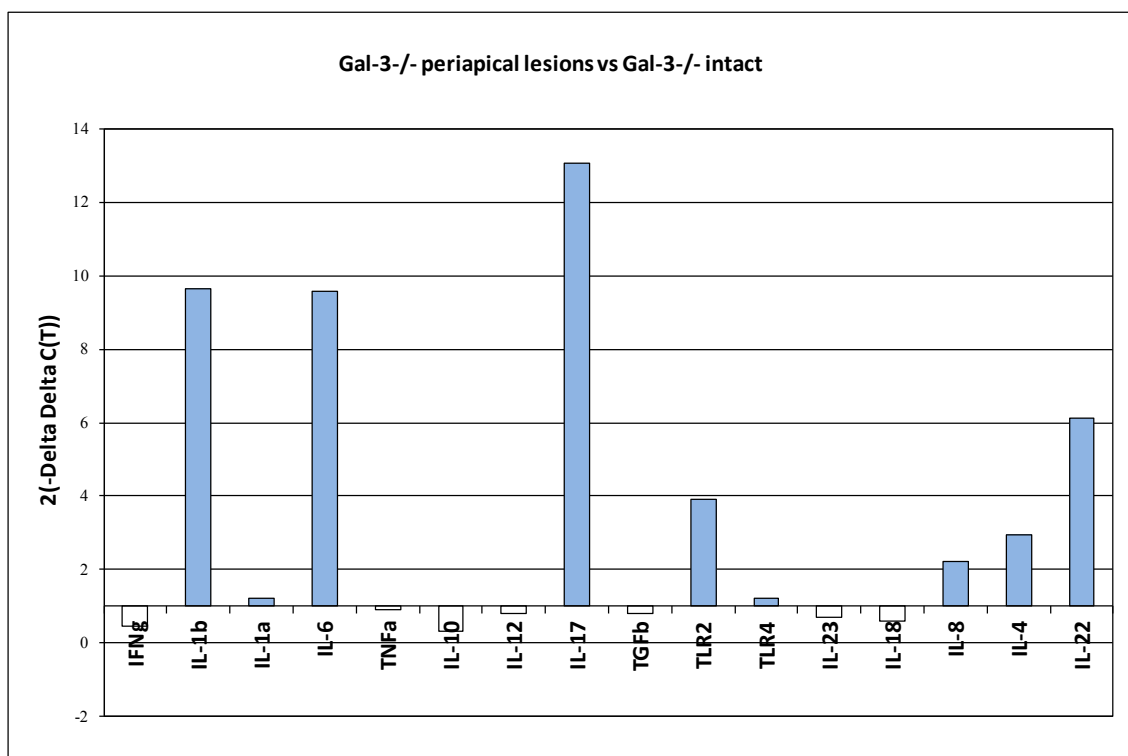
- a. crvena boja – nema ekspresije
- b. zelena boja – ne eksprimira se kod svih životinja

grafikon br. 11



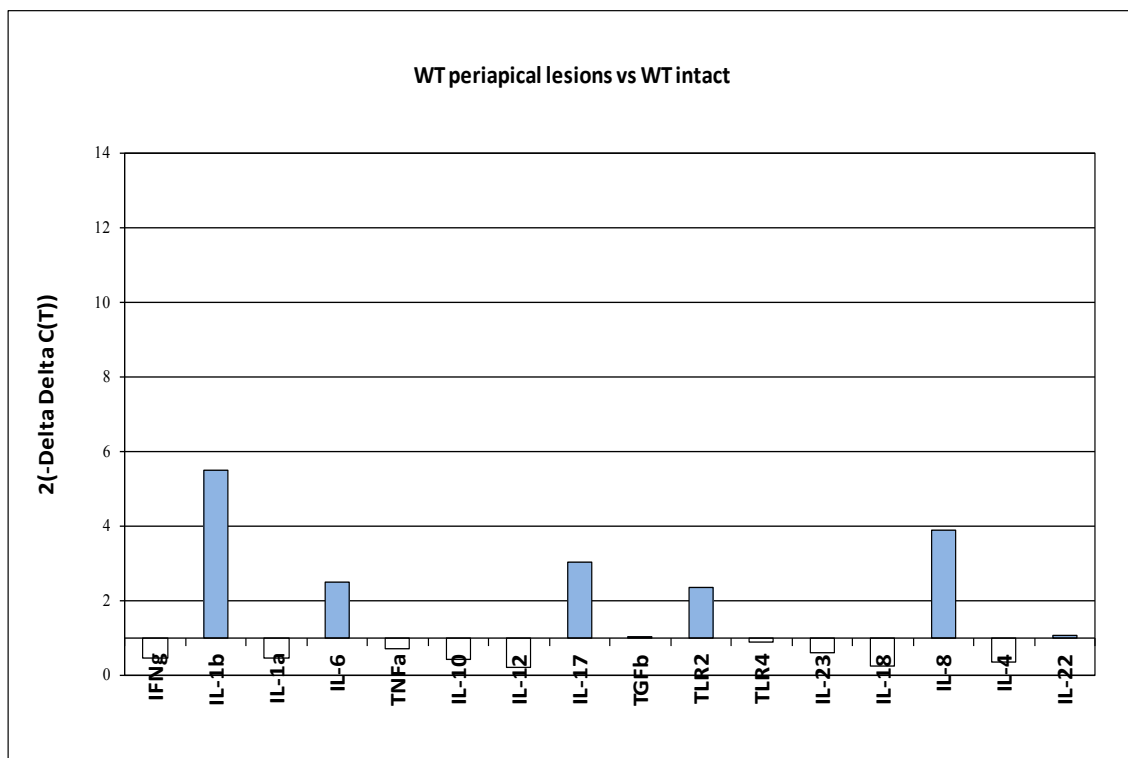
Na grafikonu 11 prikazan je uticaj galektina-3 na ekspresiju gena za citokine u periapikalnim inflamatornim lezijama detektovanjem količine iRNK kod galektin-3 deficijentnih u odnosu na količinu iRNK istih citokina u periapikalnim lezijama miševa divljeg tipa. Mesec dana od bušenja zubne pulpe bila je povećana ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12, IL-17, IL-18, IL-4 i IL-22 i blago povećana ekspresija gena za TGF β u grupi galektin-3 deficijentnih tretiranih životinja u odnosu na tretirane životinje divljeg tipa. Bila je povećana i ekspresija gena za TLR2 i TLR4 i hemokin IL-8. Detektovana je i smanjena količina iRNK za IFN γ , TNF α , IL-10 i IL-21.

grafikon br. 12



Na grafikonu 12 prikazano je delovanje otvaranja zubne pulpe na ekspresiju gena za citokine u periapikalnim inflamatornim lezijama galektin-3 deficijentnih C57BL/6 miševa. Mesec dana od inicijacije oboljenja bila je povećana ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-17, IL-4 i IL-22 kao i TLR2 i TLR4 i hemokin IL-8 a blago smanjena ekspresija gena za ostale citokine. Nije detektovana ekspresija gena za IL-21 kod zdravih intaktnih životinja ali se ovaj gen ekspimirao u obolelom periapikalnom tkivu tretiranih životinja.

grafikon br. 13



Na grafikonu 13 prikazano je dejstvo otvaranja zubne pulpe na ekspresiju gena za citokine u periapikalnim inflamatornim lezijama C57BL/6 miševa divljeg tipa. Meseć dana od otvaranja zubne pulpe bila je povećana ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6 i IL-17 a blago smanjena količina iRNK za ostale citokine sem za TGF β i IL-22 koja je bila blago povećana. Bila je povećana i ekspresija gena za TLR2 i hemokin IL-8, a smanjena ekspresija gena za TLR4. Nije detektovana ekspresija gena za IL-21 u tkivu zdravih životinja ali se ovaj gen ekspimirao u obolelom periapikalnom tkivu.

6. DISKUSIJA

Periapiksni periodontitis je zapaljenje periodoncijuma i karakteriše se fokalnim nekrotičnim promenama oko vrha korena zuba, ćelijskom infiltracijom različitog intenziteta i resorpcijom alveolarne kosti i zubnog cementa. Najbrojnije ćelije u inflamatornim infiltratima su neutrofilni granulociti, makrofagi, dendritske ćelije, limfociti, fibroblasti, a uočavaju se i multijedarni osteoklasti. Proces počinje prodorom bakterija iz usne duplje u zubnu pulpu, razvija se nekrotični pulpitis koji se zatim preko dobro vaskularizovanog korenog kanala širi i u periodontalni prostor. Hronični periodontitis najčešće prate destruktivne promene mekog i mineralizovanog tkiva u čemu učestvuje niz proinflamatornih citokina promotera T_h1 i T_h17 tipa imunološkog odgovora, koji narušavaju delikatnu ravnotežu između nastajanja koštanog tkiva alveolarne kosti delovanjem osteoblasta i njegove razgradnje putem osteoklasta delujući na RANK/RANKL i OPG sistem. Ovi citokini uključeni su i u procese remodelovanja mekog tkiva periodontalnog ligamenta menjajući odnos MMP/TIMP povećanjem nivoa destruktivnih MMP. Antiinflamatorni citokini, kao npr. IL-10 koji luče T_{reg} ćelije i IL-4, promoter T_h2 odgovora, deluju protektivno i štite tkivo od destrukcije.

Eksperimentalni periapiksni periodontitis može se izazvati otvaranjem zubne pulpe korišćenjem stomatološke burgije i dobar je model za proučavanje dinamike i karakteristika lokalnog hroničnog zapaljenja. Odavno je poznato da ovaj proces bez prisustva bakterija nije moguć jer su Kakehashi i saradnici ([Kakehashi S. et al 1965.](#)) utvrdili da se periapiksne inflamatorne lezije ne mogu javiti kod *germ-free* laboratorijskih životinja koje se rađaju i čuvaju u sterilnim uslovima a da se relativno lako izazivaju kod konvencionalno gajenih otvaranjem zubne pulpe. Najčešći uzročnici periodontitisa su patogeni anaerobi usne duplje i dentalnog plaka *P.gingivalis*, *F.nucleatum*, *A.actinomycescomitans*, *P.intermedia* i drugi. Sojevi bakterija koje inficiraju zubnu pulpu i periodoncijum uslovljavaju tip imunološkog odgovora i citokine koji će se sekretovati u različitim fazama inflamatorne reakcije, a posledično i stepen oštećenja tkiva. Zbog toga rezultati analize citokinskog miljea mogu da ukažu na fazu infekcije i mikroorganizme koji su je izazvali. *Porfiromonas gingivalis*, gramnegativni anaerob, najčešće je prisutan u hroničnim destruktivnim periapiksnim lezijama i preko

svog karakterističnog LPS i drugih komponenata stimuliše sekreciju T_h17 promovišućih citokina inhibirajući istovremeno sekreciju T_h1 promovišućeg citokina IL-12.

Galektini, koji pripadaju evolutivno veoma staroj familiji lektina, imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru i inflamatornoj reakciji regulisanjem homeostaze i funkcije ćelija imunološkog sistema (*Liu F.T. and Rabinovich G.A. 2010.*). Ekspimiraju se uglavnom na ćelijama urođenog imuniteta ali i na mnogim drugim ćelijama i imaju važnu ulogu u razvoju akutne i hronične inflamacije pre svega zbog svoje PRR funkcije.

Galektin-3, 31-kDa himerični član familije galektina, karakteriše se C-terminalnim domenom (CRD), kojim se vezuje za ugljene hidrate i prepoznaje, ih i N-terminalnim domenom koji omogućava formiranje oligomera u vidu latica (*Ho M.K. and Springer T.A. 1982., Brewer C.F. et al 2002.*). Galektin-3 prisutan je intraćelijski, u nukleusu i citoplazmi, na površini ćelije ali i u ekstraćelijskoj tečnosti i njegova funkcija u velikoj meri zavisi od lokalizacije. On je potentni imunoregulator (*Rabinovich G.A. and Toscano M.A. 2009.*) koji aktivira različite tipove imunokompetentnih ćelija uključujući neutrofile, monocite, makrofage, dendritske ćelije i mastocite (*Sato S. et al 2002., Sano H. et al 2000.*). Ispitivanjem uticaja galektina-3 na mnogobrojnim eksperimentalnim modelima, a posebno korišćenjem galektin-3 deficijentnih nokaut miševa, utvrđeno je da ovaj molekul deluje proinflamatorno ali ispoljava i niz suptilnih regulatornih efekata koji za cilj imaju uklanjanje patogena uz minimalno oštećenje tkiva domaćina. U nedostatku galektina-3 u inflamatorno područje dospeva manje neutrofila a skraćen je životni vek makrofaga (*Jeon Sae-Bom et al 2010.*). Način delovanja galektina još uvek nije dovoljno razjašnjen pa se korišćenjem nokaut miševa deficijentnih na pojedine galektine može doći do novih saznanja o funkcionisanju i dejstvu ovih molekula.

U ovom istraživanju korišćeni su galektin-3 deficijentni nokaut miševi kod kojih su izazvane periapeksne inflamatorne lezije. Rezultati patohistološke analize ukazali su da se posle otvaranja zubne pulpe kod galektin-3 deficijentnih miševa javlja periapeksni periodontitis srednjeg intenziteta, a jak kod miševa divljeg tipa. U inflamatornim infiltratima oko vrha korena zuba uočeni su brojni neutrofilni granulociti, makrofagi, dendritske ćelije i limfociti i postepeno širenje procesa na okolno tkivo. Najmarkantnije ćelije u inflamatornim infiltratima bili su krupni penušavi makrofagi sa centralno postavljenim jedrom a oko njih uočeni su i drugi tipovi makrofaga, neutrofilni, limfociti i fibroblasti. Imunofluorescentnom analizom utvrđeno

je da je veliki broj monocita/makrofaga i dendritskih ćelija u periapikalnim infiltratima CD14⁺ i MHC class II⁺ i da se nivo ekspresije ovih molekula ne razlikuje u periapikalnim lezijama galektin-3 deficijentnih miševa i miševa divljeg tipa. Propadanje alveolarne kosti i zubnog cementa intenziviralo se trajanjem procesa i dovelo je do širenja periodontalnog prostora. Uočeni su brojni multijedarni osteoklasti koji razgrađuju delove alveolarne kosti, a u fazi reparacije i novonastalo vezivno tkivo sa trakama kolagena, fibroblastima i fibrocitima.

Kvantitativnom analizom utvrđeno je da je broj neutrofilnih granulocita po mm² inflamatornih infiltrata kod C57BL/6 galektin-3 deficijentnih miševa značajno manji u odnosu na divlji tip i to u terminima mesec dana i šest nedelja od otvaranja zubne pulpe. Zbog toga je intenzitet inflamacije (broj inflamatornih ćelija po mm²) značajno niži kod galektin-3 deficijentnih miševa u ova dva termina.

Utvrđeno je i da su kod galektin-3 deficijentnih miševa makrofagi najbrojnije ćelije, drugi po brojnosti su neutrofilni granulociti, a zatim limfociti, dok su kod miševa divljeg tipa najbrojniji neutrofilni granulociti.

Mesec dana od otvaranja zubne pulpe razlike su bile statistički značajne pošto je broj neutrofilnih granulocita ($p < 0.01$) i ukupan broj inflamatornih ćelija ($p < 0.05$) po mm² značajno niži kod galektin-3 deficijentnih miševa u odnosu na divlji tip ali je broj makrofaga nešto veći.

Šest nedelja od otvaranja zubne pulpe situacija je slična jer su i dalje najbrojnije ćelije kod miševa divljeg tipa bili neutrofilni granulociti a kod galektin-3 deficijentnih miševa makrofagi. Statistička značajnost u ovom terminu bila je nešto veća za manji broj neutrofila ($p < 0.001$) i manji ukupan broj inflamatornih ćelija na mm² ($p < 0.01$) kod galektin-3 deficijentnih miševa.

Četiri meseca od otvaranja zubne pulpe kod oba tipa miševa dominirali su makrofagi a nisu uočene statistički značajne razlike između grupa u ukupnom broju inflamatornih ćelija, broju makrofaga i neutrofilnih granulocita po mm², a broj limfocita nije se mnogo promenio u sva tri termina i kod obe eksperimentalne grupe. Broj fibroblasta i kolagenih vlakana povećao se posle četiri meseca kao i ekstenzivnost inflamacije, odnosno površina tkiva pod inflamatornim infiltratima, u odnosu na prethodne termine.

Dobijeni rezultati mogu se tumačiti u skladu sa dostupnom literaturom o galektinu-3 i njegovom značaju za funkciju neutrofilnih granulocita. Ovaj molekul uključen je u mnoge procese tokom akutnog inflamatornog odgovora pre svega u proces aktivacije i adhezije neutrofila (*Kuwabara I. and Liu F.T. 1996.*), hemoatrakcije monocita/makrofaga (*Sano H. et al 2000.*), opsonizacije apoptotičnih neutrofila (*Karlsson A. et al 2009.*) što omogućava njihovo neškodljivo uklanjanje (i uklanjanje njihovih destruktivnih enzima) delovanjem makrofaga. Takođe galektin-3 se jako eksprimira i sekretuje od strane aktivisanih makrofaga (*Liu F.T. et al 1995.*) i ostvaruje svoje funkcije u ekstraćelijskom prostoru. Galektin-3 deficitarni makrofagi ga ne sekretuju tako da kod ovih životinja funkcije ovog molekula izostaju ali se neke druge pojačavaju kao npr. lučenje proinflamatornih citokina pod delovanjem LPS.

Neutrofilni granulociti, kao efektorske ćelije urođenog imunološkog odgovora, značajni su u ranoj fazi infekcije jer prvi stižu na mesto prodora mikroorganizama, fagocituju bakterije i sekretuju citotoksične medijatore a zatim umiru procesom apoptoze u roku od nekoliko sati ili dana. Zbog toga je stimulacija antibakterijske aktivnosti ovih ćelija od suštinske važnosti kao i njihovo uklanjanje sa mesta infekcije što sprečava veće oštećenje ćelija i tkiva domaćina, pa je apoptoza neutrofila deo normalnog procesa rezolucije. Tada neutrofili postaju neosetljivi na stimulse, a tkivni makrofagi takve apoptotične granulocite prepoznaju i neškodljivo uklanjaju.

Mišiji neutrofili, za razliku od ljudskih, ne ekspimiraju galektin-3 (*Sato S. et al 2002.*) ili ga ekspimiraju veoma slabo (*Farnwort S.L. et al 2008.*) ali i pored toga do njihove aktivacije može doći delovanjem ekstraćelijskog galektina-3 čiji nivo raste u okolnom tkivu tokom infekcije jer ga u velikoj količini sekretuju makrofagi (*Liu F.T. et al 1995., Sato S. et al 2002.*) i on efekat ostvaruje oligomerizacijom na površini ćelija (*Farnwort S.L. et al 2008.*). Kod galektin-3 deficitarnih miševa makrofagi ga ne sekretuju i zbog toga je broj neutrofila u inflamatornim fokusima manji a niži je i nivo aktivacije i smanjena fagocitna sposobnost ovih ćelija što su Farnwort i saradnici uočili i na modelu pneumokokne pneumonije.

Već je rečeno da intraćelijski, endogeni galektin-3 štiti ćelije od apoptoze, dok ekstraćelijski stimuliše ovaj proces pa se može pretpostaviti da u mišijem modelu neutrofilni granulociti lakše podležu procesu apoptoze jer ne poseduju endogeni galektin-3.

U ovom istraživanju u hroničnim periapeksnim inflamatornim lezijama uočen je veoma veliki broj neutrofilnih granulocita i makrofaga a manji broj limfocita što ukazuje na egzacerbaciju i akutizaciju inflamatornog procesa. Slični rezultati dobijeni su i u nekim drugim eksperimentima na mišijim modelima periapeksnih inflamatornih lezija. Kod miševa sojeva BALB/c i C3H/HeJ u periapeksnim inflamatornim lezijama starim 6-8 nedelja uočena je ekstenzivna resorpcija alveolarne kosti, jaki inflamatorni infiltrati u kojima su najbrojniji bili neutrofilni granulociti a broj limfocita bio je mali (*Fouad A.F. and Acosta A.W. 2001.*). I kod pacijenata sa simptomatskim i asimptomatskim periapeksnim lezijama utvrđena je egzacerbacija hroničnog asimptomatskog procesa u simptomatski, sa znatno većim brojem neutrofilnih granulocita (*Colic M. et al 2007.*), ukazujući na reinfekciju. Ovaj nalaz doveden je u korelaciju sa produkcijom IL-17 od strane subpopulacije CD4⁺ T ćelija (T_h17 ćelije). U našem modelu eksperimentalnih periapeksnih lezija na miševima veliki broj neutrofilnih granulocita korelira sa kontinuiranom reinfekcijom, a real-time PCR analizom na nivou informacione RNK (iRNK) utvrđena je povećana ekspresija gena za proinflamatorne citokine, pre svega IL-1 β , IL-6 i IL-17. Zanimljiva je uloga *P.gingivalis*, gramnegativnog anaeroba sveprisutnog u periapeksnim lezijama ljudi i životinja. Ovaj mikroorganizam eksprimira više faktora virulencije pre svih atipični LPS, koji se razlikuje od LPS enterobakterija (*Zhang D. et al 2008.*) i koji aktivira imunološki odgovor preko TLR2 i TLR4, zatim cistein proteinaze, hemaglutinine i bakterijske fimbrije (*Hajishengallis G. 2009.*). Virulentniji sojevi *P.gingivalis* dovode do invazivnog periodontitisa koji se širi dok manje virulentni najčešće indukuju nastanak lokalnih apscesa. Interakcija *P.gingivalis* sa antigen prezentujućim ćelijama (APĆ), pre svih monocitima/makrofagima i dendritskim ćelijama dovodi do sinteze proinflamatornih medijatora koji promovišu imunološki odgovor tipa T_h17 (*Moutsopoulos N.M. et al 2012.*). U mnogim studijama utvrđeno je da se kod svih ovih tipova ćelija povećava ekspresija gena za IL-1 β i IL-6 što je detektovano na nivou iRNK. Na nivou produkcije proteina utvrđeno je da monociti i dendritske ćelije luče veliku količinu IL-1 β , a makrofagi mnogo manju količinu ovog citokina dok istovremeno sve ove APĆ jako sekretuju IL-6 (*Moutsopoulos N.M. et al 2012.*). Već prvo izlaganje APĆ *P.gingivalis* vodi stvaranju Th17 promovišućih citokina IL-1 β , IL-6 i IL-23 ali ne i Th1 promovišućeg

citokina IL-12 ([Moutsopoulos N.M. et al 2012.](#)). Interleukin-21, član IL-2 familije citokina ne indukuje samo diferencijaciju IL-17 sekretnih T-ćelija (sa TNF β i IL-6) već mehanizmom pozitivne povratne sprege stimuliše ekspanziju B-limfocita i sinteze različitih antitela ([Ettinger R. et al 2005.](#)).

Rezultati real-time PCR analize, urađene mesec dana po otvaranju zubne pulpe, u skladu su sa navedenim rezultatima Moutsopoulosa i saradnika ukazujući da infekcija zubne pulpe i periapexnog prostora dovodi do značajno povećane ekspresije gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6 i IL-17 kod galektin-3 negativnih i C57BL/6 miševa divljeg tipa u odnosu na intaktne kontrole. U tkivu zdravih životinja ne može se detektovati ekspresija gena za IL-21 ali se detektuje u obolelom tkivu dok je iRNK za IL-23 prisutna i u zdravom tkivu a po indukciji periapexnih lezija njena količina u tkivu blago opada i kod galektin-3 deficijentnih miševa i kod miševa divljeg tipa. Ni kod jedne grupe životinja ne detektuje se ekspresija gena za IL-2. U periapexnim lezijama galektin-3 negativnih miševa povećana je ekspresija gena za IL-4 i IL-22 a blago za IL-1 α u odnosu na tkivo intaktnih galektin-3 negativnih miševa, a ekspresija ostalih ispitivanih gena i to za IFN γ , TNF α , IL-10, IL-12 i TGF β je smanjena. Kod miševa divljeg tipa situacija je slična i u ovoj grupi tretiranih životinja povećana je ekspresija gena za IL-1 β , IL-6 i IL-17 a uočena je blago povećana ekspresije gena za TGF β u odnosu na intaktne životinje uz blago smanjenu ekspresiju gena za IL-4 i IL-1 α i nešto veće smanjenje ekspresije gena za IL-12 i IL-10. Kod galektin-3 negativnih i miševa divljeg tipa razvoj inflamatornih periapexnih lezija smanjuje, kao i kod IL-12, tkivnu ekspresiju gena za proinflamatorni citokin urođenog imuniteta IL-18 a povećava količinu iRNK za hemokin IL-8 koji je potentni stimulator dolaska neutrofila u inflamirano područje.

Količina iRNK za TLR2 povećana je u periapexnim lezijama u odnosu na zdravo tkivo intaktnih galektin-3 nokaut miševa i miševa divljeg tipa ukazujući na prisustvo *P.gingivalis* i njegovog karakterističnog LPS koji imunološku reakciju indukuje preko TLR4 kao i LPS *E.coli* ali i preko TLR2. Ekspresija gena za TLR4 smanjena je sasvim blago u obolelom tkivu C57BL/6 miševa divljeg tipa u odnosu na zdravo tkivo dok je u tkivu periapexnih lezija galektin-3 nokaut miševa ekspresija ovog gena blago povećana.

Poređenjem ekspresije ispitivanih gena u periapexnim inflamatornim lezijama galektin-3 negativnih miševa u odnosu na ekspresiju ovih gena u periapexnim lezijama

miševa divljeg tipa utvrđeno je da nedostatak galektina-3 utiče na povećanu ekspresiju gena za IL-1 β , IL-6 i IL-17 i na smanjeni pad nivoa ekspresije gena za IL-12 pošto je utvrđeno da infekcija i kod jednog i drugog tipa miševa smanjuje ekspresiju gena za ovaj citokin, snažni T_h1 promoter. To je utvrđeno i u istraživanjima na humanim periapeksnim lezijama gde je koncentracija IL-12 niža u obolelim nego u zdravim tkivima desni (*Johnson R.B. and Serio F.G. 2005.*). Smatralo se da galektin-3 stimuliše T_h2 odgovor pa su rezultati Hsu-a i saradnika iz 2009. godine donekle kontroverzni jer su utvrdili da antigenom stimulisani galektin-3 deficijentni mišiji splenociti u *in vitro* modelu proizvode veću količinu T_h1 promovišućeg IL-12 od splenocita miševa divljeg tipa (*Hsu K.D. et al 2009.*).

Utvrđeno je i povećanje ekspresije gena za IL-4 u tkivu periapeksnih lezija galektin-3 negativnih u odnosu na tkivo periapeksnih lezija miševa divljeg tipa. Pošto je IL-4 jak promoter T_h2 subpopulacije T-pomoćničkih ćelija može se reći da nedostatak galektina-3 na neki način usmerava imunološki odgovor ka manje destruktivnom T_h2 tipu što se ne slaže sa rezultatima Hsu-a i saradnika. Ekspresija gena ovog citokina smanjuje se u periapeksnim lezijama miševa divljeg tipa u odnosu na zdravo tkivo dok je značajno povećana u periapeksnim lezijama galektin-3 deficijentnih miševa.

Korišćenjem galektin-3 nokaut miševa u mnogim modelima utvrđeno je da ovi miševi proizvode veću količinu inflamatornih citokina kao odgovor na bakterijski LPS (*Li Y. et al 2008.*), a efekat je slabiji ako je galektin-3 preinkubiran LPS-om pre ubrizgavanja u miša. Izgleda da su galektin-3 negativni makrofagi senzitivniji na LPS pri čemu stvaraju veću količinu citokina u odnosu na makrofage miševa divljeg tipa (*Li Y. et al 2008.*) što odgovara i rezultatima istraživanja na periapeksnim lezijama gde je ekspresija gena za IL-1 β , IL-6, IL-17 i IL-12 (čija ekspresija je inače smanjena u inflamiranom tkivu) značajno povećana u odnosu na miševa divljeg tipa. Galektin-3 je deo urođenog imuniteta i funkcioniše kao PRR, receptor za prepoznavanje ponavljajućih molekularnih obrazaca mikroorganizama i prepoznaje bakterije, parazite i gljivice. Vezuje se za LPS mnogih bakterija i negativni je regulator njegove funkcije a ove interakcije se odvijaju i preko CRD i preko N-terminalnog domena (*Mey A. et al 1996.*). Makrofagi spontano ekspimiraju galektin-3 koji se specifično vezuje za LPS a makrofagi galektin-3 negativnih miševa pojačavaju produkciju inflamatornih citokina kao odgovor na LPS i lipid A u odnosu na makrofage miševa divljeg tipa (*Li Y. et al*

2008.). Ovo se odvija uz pojačanu fosforilaciju JNK, p38, ERK i NF-kBp65 i pojačano lučenje citokina od strane galektin-3 nokaut ćelija, a normalizuje se dodavanjem galektin-3 rekombinantnog proteina. U *in vivo* eksperimentima galektin-3 negativni miševi pojačano proizvode citokine i azot oksid (NO) i osetljiviji su na endotoksični šok. Tanamoto i saradnici uočili su da LPS *P.gingivalis* ispoljava mnogo slabiji efekat u stimulaciji sekrecije TNF α od strane murinih makrofaga od LPS-a *Salmonella minnesota* ali je situacija obrnuta na humanim monocitima (Tanamoto K. et al 1997.), što bi moglo eventualno da ukaže na razlog niskog nivoa ekspresije gena za TNF α u modelu periapikalnih lezija kod miša.

Poređenjem ekspresije gena u periapikalnim lezijama galektin-3 negativnih miševa u odnosu na ekspresiju gena u periapikalnim lezijama miševa divljeg tipa takođe je utvrđeno povećanje količine iRNK za proinflamatorne citokine IL-18, IL-22 i IL-23 i smanjenje ekspresije gena za IL-21 a i povećana količina iRNK za TLR2, TLR4 i hemokin IL-8.

Bakterije zubnog plaka, a pre svih *P.gingivalis*, stimulišući sekreciju proinflamatornih citokina od strane monocita/makrofaga, DC i drugih ćelijskih tipova istovremeno inhibiraju produkciju IL-12 (Moutsopoulos N.M. et al 2012.) a jedan od mehanizama inhibicije mogao bi da bude delovanjem velike fimbrije. U interakciji FimA sa receptorom-3 komplementa aktiviraju se intraćelijski signalni putevi koji inhibiraju produkciju IL-12 preko TLR-2 (Hajshengallis G. et al 2007.). IL-12 koji sekretuju aktivisani makrofagi aktivira NK ćelije i citotoksične CD8⁺ T-ćelije, proces važan za eliminaciju inficiranih ćelija i njegova inhibicija produžava opstanak *P.gingivalis in vitro* i *in vivo* (Hajshengallis G. et al 2008.). Ovaj mikroorganizam takođe suprimira ćelijski imunološki odgovor snižavajući nivo IFN γ (Hajshengallis G. 2009.) i na taj način se brani od imunološkog sistema domaćina.

IL-1 β važan je i za nastajanje CD4⁺ T-limfocita koji luče IL-17 a i za produkciju IL-23 koji stimuliše lučenje IL-17 od strane navedenih ćelija (Harris K.M. et al 2008.). IL-1 β i IL-17 deluju sinergistički i stimulišu dalju produkciju IL-1 β čime funkcionišu po principu pozitivne povratne sprege. IL-17 pojačava sekreciju IL-1 β i TNF α (indukovana preko TLR) u kulturi gingivalnih epitelih ćelija (Beklen A. et al 2009.), a ispoljava proinflamatorni potencijal i tokom periodontitisa indukujući lučenje IL-6 i IL-8

hemokina od strane fibroblasta i delujući sinergistički sa IFN γ indukuje sekreciju niza medijatora.

Utvrđeno je i da kod galektin-3 nokaut miševa ekspresija gena za TGF β pri indukciji periapeksnih lezija blago opada u odnosu na intaktne životinje dok je kod divljeg tipa blago povećana. I pored toga ekspresija ovog gena nešto je povećana kod nokaut miševa mesec dana od indukcije bolesti ukazujući da je kod galektin-3 negativnih miševa konstitutivno povećana ekspresija ovog gena. Blago povećana ekspresija gena za TGF β sa povećanom ekspresijom gena za IL-1 β , IL-6 i IL-17 ukazuje da se tokom eksperimentalno indukovanih periapeksnih lezija razvija T_h17 tip stečenog imunološkog odgovora u kome dominira subpopulacija CD4⁺ pomoćničkih ćelija koje sekretuju IL-17. Ovaj imunološki odgovor nešto je izraženiji kod galektin-3 nokaut miševa što bi se moglo objasniti povećanom produkcijom citokina od strane galektin-3 negativnih makrofaga jer je galektin-3 negativni regulator funkcije LPS. Interleukin-17 dovodi se u vezu sa povećanom ekspresijom gena za hemokin IL-8 u periapeksnim lezijama, mobilizacijom neutrofila tokom infekcije *P.gingivalis* (Yu J.J. et al 2007., Colic M. et al 2007.) i egzacerbacijom hroničnog inflamatornog procesa koja je uočena i u ovom istraživanju. Broj neutrofilnih granulocita značajno je niži u periapeksnim lezijama galektin-3 negativnih miševa ukazujući na to da mehanizmi pojačanog lučenja citokina nisu jedini odgovorni za dolazak granulocita na mesto inflamacije. Delovanje galektina-3 u aktivaciji leukocita i direktnoj adheziji neutrofila za endotelne ćelije verovatno igra važnu ulogu tokom inflamatornog procesa što bi moglo biti objašnjenje prisustva većeg broja neutrofilnih granulocita u periapeksnim infiltratima miševa divljeg tipa a smanjeni broj ovih ćelija kod galektin-3 nokaut miševa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva istraživanja i dobijenih rezultata doneti su sledeći zaključci:

1. Nedostatak galektina-3 smanjuje intenzitet inflamacije u periapexnim inflamatornim lezijama značajnim smanjenjem broja neutrofilnih granulocita mesec dana i šest nedelja od otvaranja zubne pulpe.
2. Najbrojnije ćelije u periapexnim inflamatornim infiltratima u prva dva termina žrtvovanja su neutrofilni granulociti kod miševa divljeg tipa dok su makrofagi najbrojniji kod galektin-3 nokaut miševa.
3. Limfocita ima znatno manje od neutrofilnih granulocita i makrofaga u svim terminima, što ukazuje na kontinuiranu egzacerbaciju i akutizaciju hroničnog zapaljenja.
4. Četiri meseca od otvaranja zubne pulpe najbrojnije ćelije u inflamatornim infiltratima su makrofagi kod miševa oba tipa među kojima nema značajnih razlika u sastavu inflamatornih infiltrata.
5. Mesec dana od otvaranja zubne pulpe mogu se uočiti destruktivne promene u periodoncijumu: resorpcija alveolarne kosti sa prisustvom velikog broja multijedarnih osteoklasta, resorpcija zubnog cementa i nekroza mekog tkiva. Ove promene se intenziviraju posle šest nedelja, a naročito posle četiri meseca od izazivanja oboljenja. Nije uočena razlika u vrsti i stepenu destrukcije tkiva između galektin-3 deficijentnih i miševa divljeg tipa.
6. Real-time PCR analizom mesec dana od otvaranja zubne pulpe utvrđeno je da periapexna infekcija kod miševa oba tipa dovodi do povećane tkivne ekspresije gena za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6, IL-17 i hemokin IL-8, što, uz

detektovanu ekspresiju gena za TGF β , ukazuje na dominaciju stečenog imunološkog odgovora tipa T_h17, pri čemu je ekspresija ovih gena veća kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na miševe divljeg tipa.

7. Ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-12 i IL-18, snažne stimulatore T_h1 odgovora, smanjena je u tkivu periapeksnih lezija u odnosu na intaktno tkivo zdravih životinja. Smanjenje ekspresije gena za ova dva citokina slabije je izraženo kod galektin-3 nokaut životinja, odnosno, ova ekspresija je povećana u odnosu na miševe divljeg tipa.
8. Real-time PCR analizom posle mesec dana, u tkivu periapeksnih lezija galektin-3 nokaut miševa utvrđena je povećana ekspresija gena za IL-4, glavnog promotora T_h2 odgovora, u odnosu na tkivo intaktnih galektin-3 nokaut miševa i u odnosu na tkivo periapeksnih lezija miševa divljeg tipa.
9. Ekspresija gena za proinflamatorne citokine TNF α i IFN γ smanjena je u obolelom periodontalnom tkivu u odnosu na zdravo tkivo intaktnih miševa, a smanjena je i u tkivu periapeksnih lezija galektin-3 nokaut miševa u odnosu na tkivo miševa divljeg tipa.
10. Ekspresija gena za antiinflamatorni citokin IL-10 smanjena je u tkivu periapeksnih inflamatornih lezija u odnosu na intaktno tkivo kod oba tipa životinja, a smanjena je i u periapeksnim lezijama galektin-3 nokaut miševa u odnosu na periapeksne lezije miševa divljeg tipa. Ekspresija gena za antiinflamatorni citokin TGF β blago je povećana u tkivu periapeksnih lezija galektin-3 nokaut miševa u odnosu na tkivo periapeksnih lezija miševa divljeg tipa.
11. Ekspresija gena za TLR2 i TLR4 povećana je posle mesec dana u tkivu periapeksnih lezija u odnosu na tkivo intaktnih zdravih životinja a blago je povećana kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na miševe divljeg tipa.

12. Ekspresija gena za IL-2 ne detektuje se ni u jednoj eksperimentalnoj grupi dok je gen za IL-21 detektovan u obolelom tkivu oba tipa miševa i njegova ekspresija je smanjena kod galektin-3 nokaut miševa u odnosu na divlji tip.

13. Ekspresija gena za IL-22 povećana je a gena za IL-23 smanjena u obolelom tkivu oba tipa miševa u odnosu na intaktno tkivo, sa povećanom ekspresijom oba gena u tkivu periapeksnih lezija galektin-3 nokaut miševa u odnosu na tkivo periapeksnih lezija miševa divljeg tipa.

POPIS LITERATURE:

1. Angelraud R. **Gingivitis and periodontitis. The gingival lesion: histopathology.** Rev Stomatodontol Nord Fr 25(100): 235-241. 1970b.
2. Angelraud R. **Histological study of inflammation during periodontolysis.** Rev Fr Odontostomatol. 17(4): 549-556. Apr; 1970a.
3. Angleraud R. **Anatomy and histology of the periodontium.** Cah Odontostomatol Touraine 5(4): 41-45. Oct-Dec 1973.
4. Appay V., van Lier R.A., Sallusto F., Roederer M. **Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues.** *Cytometry A* 73: 975-983. 2008.
5. Asai Y., Ohyama Y., Gen K., Ogawa T. **Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2.** *Infect Immun* 69: 7387–7395. 2001.
6. Baker P.J., Dixon M., Evans R.T., Dufour L., Johnson E., Roopenian DC. **CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice.** *Infect Immun* 67: 2804–2809. 1999.
7. Barboni E.A., Bawumia S., Henrick K., Hughes R.C. **Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding.** *Glycobiology* 10: 1201–1208. 2000.
8. Barksby H.E., Lea S.R., Preshaw P.M., Taylor J.J. **The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders.** *Clin Exp Immunol*. 149: 217–225. 2007.
9. Barondes S.H., Castronovo V., Cooper D.N., Cummings R.D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M.A., Hirabayashi J., Hughes C., Kasai K., Leffler H., Liu F.-T., Lotan R., Mercurio A.M., Monsigny M., Pillai S., Poirer F., Raz A., Rigby P.W.J., Rini J.M., Wang J.L. **Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.** *Cell* 76: 597–598. 1994.
10. Beklen A., Ainola M., Hukkanen M., Gurgan C., Sorsa T., Konttinen Y.T. **MMPs, IL-1, and TNF are Regulated by IL-17 in Periodontitis.** *J Dent Res* 86: 347–351. 2007.
11. Beklen A., Sorsa T., Konttinen Y.T. **Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17.** *Oral Microbiol Immunol* 24: 38–42. 2009.
12. Ben-Sasson S.Z., Hu-Li J., Quiel J., Cauchetaux S., Ratner M., Shapira I., Dinarello C.A., Paul W.E. **IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7119–7124. 2009.
13. Bernardes E.S., Silva N.M., Ruas L.P., Mineo J.R., Loyola A.M., Hsu D.K., Liu F.T., Chammas R. & Roque-Barreira M.C. **Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity.** *American Journal of Pathology* 168: 1910–1920. 2006.

14. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 441: 235–238. 2006.
15. Beutler B., and Cerami A. **The biology of cachectin/TNF ± a primary mediator of the host response.** *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625-655. 1989.
16. Breuilh L., Vanhoutte F., Fontaine J., van Stijn C.M., Tillie-Leblond I., Capron M., Faveeuw C., Jouault T., van Die I., Gosset P. **Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells.** *Infection and Immunity* 75: 5148–5157. 2007.
17. Brewer C. F., Miceli M. C., and Baum L. G.. **Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 616–623. 2002.
18. Calkins C.C., Platt K., Potempa J., Travis J. **Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion.** *J Biol Chem* 273: 6611–6614. 1998.
19. Cardoso C.R., Garlett G.P., Crippa G.E., Rosa A.L., Martins W. Jr, Rossi M.A., Silva J.S. **Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease.** *Oral Microbiol Immunol* 24: 1-6. 2009.
20. Carlsson J. **Microbiology of plaque associated periodontal disease.** In: *Textbook of clinical periodontology.* Lindhe J, editor. Copenhagen: Munksgaard, pp. 129-152. 1990.
21. Cerra R.F., Gitt M.A., Barondes S.H. **Three soluble rat beta-galactosidebinding lectins.** *J. Biol. Chem.* 260: 10474–10477. 1985.
22. Chen G.Y., Nunez G. **Sterile inflammation: sensing and reacting to damage.** *Nat.Rev. Immunol.* 10: 826–837. 2010.
23. Chen H.Y., Sharma B.B., Yu L., Zuberi R., Weng I.C., Kawakami Y. et al. **Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression.** *J Immunol* 177(8): 4991–7. Oct 15, 2006.
24. Cherayil B.J., Weiner S.J., Pillai S. **The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE.** *J. Exp. Med.* 170: 1959–1972. 1989.
25. Coleman B., Rickard A.N., de Silva G.M., Shepherd K.R. **A protocol for cryoembedding the adult guinea pig cochlea for fluorescence immunohistology.** *Journal of Neuroscience Methods*: 176: 144-151. 2009.
26. Colic, M., Vasilijic, S., Gazivoda, D., Vucevic, D., Marjanovic, M., Lukic, A., **Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions.** *Eur. J. Oral. Sci.* 115(4): 315–320. 2007.
27. Colnot C., Fowles D., Ripoche M.A., Bouchaert I. & Poirier F. **Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice.** *Developmental Dynamics* 211: 306–313. 1998a.

28. Colnot C., Ripoche M.A., Milon G., Montagutelli X., Crocker P.R. & Poirier F. **Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice.** *Immunology* 94: 290–296. 1998b.
29. Commins S., Steinke J.W., Borish L. **The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29.** *J Allergy Clin Immunol* 121: 1108–1111. 2008.
30. Cortegano I., del Pozo V., Cardaba B., de Andres B., Gallardo S., del Amo A., Arrieta I., Jurado A., Palomino P., Liu F.T. **Galectin-3 downregulates IL-5 gene expression on different cell types.** *Journal of Immunology* 161: 385–389. 1998.
31. Costalonga M., Batas L., Reich B.J. **Effects of Toll-like receptor 4 on *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in mice.** *J Periodontol Res* 44: 537-542. 2009.
32. Cowdery J.S., Chace J.H., Yi A.K., Krieg A.M. **Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides.** *J Immunol* 156: 4570–4575. 1996.
33. Cronstein B.N. **Interleukin-6—a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis.** *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65(Suppl 1): 11-15. 2007.
34. Cutler C.W., Jotwani R. **Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis.** *Periodontol 2000* 35: 135-157. 2004.
35. Čolić M., Gazivoda D., Vučević D., Vasilijić S., Rudolf R., Lukić A. **Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions.** *Molecular Immunology* 47: 101-113. 2009.
36. Dagher S.F., Wang J.L., Patterson R.J. **Identification of galectin-3 as a factor in pre-iRNK splicing.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 1213–1217. 1995.
37. Darveau R.P., Pham T.T., Lemley K., Reife R.A., Bainbridge B.W., Coats S.R., Howald W.N., Way S.S., Hajjar A.M. ***Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4.** *Infect Immun* 72: 5041–5051. 2004.
38. de Jong E.C., Smits H.H., Kapsenberg, M.L. **Dendritic cell-mediated T cell polarization.** *Springer Semin. Immunopathol.* 26: 289–307. 2005.
39. Dhirapong A., Lleo A., Leung P., Gershwin M.E., Liu Fu-Tong. **The immunological potential of galectin-1 and -3.** *Autoimmunity Reviews* 8: 360-363. 2009.
40. Dinarello C.A. **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.** *Annu Rev Immunol* 27: 519–550. 2009.
41. Dinarello CA. **Interleukin-1 beta, interleukin-18 and the interleukin-1 beta converting enzyme.** *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 856: 1-11. 1998.
42. Dixon D.R., Bainbridge B.W., Darveau R.P. **Modulation of the innate immune response within the periodontium.** *Periodontol 2000* 35: 53–74. 2004.
43. Dixon D.R., Darveau R.P. **Lipopolysaccharide heterogeneity:innate host responses to bacterial modification of lipid a structure.** *J Dent Res* 84: 584–595. 2005.

44. Donati M., Liljenberg B., Zitzmann N.U., **Berglundh T. B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions.** *J Periodontal Res* 44: 683-688. 2009.
45. Dorhoi A., Kaufmann S.H. **Fine-tuning of T cell responses during infection.** *Curr Opin Immunol* 21: 367–377. 2009.
46. Dunic J., Dabelic S., Flögel M. **Galectin-3: An open-ended story.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 616-635. 2006.
47. Duncan L., Yoshioka M., Chandad F., Grenier D. **Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles.** *Microb Pathog* 36: 319–325. 2004.
48. Eskan M.A., Hajishengallis G., Kinane D.F. **Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae.** *Infect Immun* 75: 892–898. 2007.
49. Ettinger R., Sims G.P., Fairhurst A.M., Robbins R., da Silva Y.S., Spolski R., Leonard W.J., Lipsky P.E. **IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells.** *J Immunol* 175: 7867–7879. 2005.
50. Fajka-Boja R., Blasko A., Kovacs-Solyom F., Szebeni G.J., Toth G.K. & Monostori E. **Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 2586–2593. 2008.
51. Farnworth S.L., Henderson N.C., Mackinnon A.C., Atkinson K.M., Wilkinson T., Dhaliwal K., Hayashi K., Simpson A.J., Rossi A.G., Haslett C. et al. **Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function.** *American Journal of Pathology* 172: 395–405. 2008.
52. Feldmann Marc and Saklatvala Jeremy. **Proinflammatory cytokines.** DOI: 10.1006/rwcy.2000.02004.
53. Fernandez G.C., Ilarregui J.M., Rubel C.J., Toscano M.A., Gomez S.A., Beigier Bompadre M., Isturiz M.A., Rabinovich G.A. & Palermo M.S. **Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways.** *Glycobiology* 15: 519–527. 2005.
54. Foster N., Lea S.R., Preshaw P.M., Taylor J.J. **Pivotal advance: vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages.** *J Leuk Biol* 81: 893–903. 2007.
55. Fouad A.F. and Acosta A.W. **Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model.** *International Endodontic Journal* 34: 506-513. 2001.
56. Fukumori T., Takenaka Y., Oka N., Yoshii T., Hogan V., Inohara H., Kanayama H.O., Kim H.R., Raz A. **Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways.** *Cancer Res.* 64: 3376–3379. 2004.
57. Fukumori T., Takenaka Y., Yoshii T., Kim H.R., Hogan V., Inohara H. et al. **CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis.** *Cancer Res* Dec 1; 63(23): 8302–11. 2003.

58. Garlet G.P. **Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints.** *J Dent Res* 89(12): 1349-1363. 2010.
59. Garlet G.P., Cardoso C.R., Campanelli A.P., Garlet T.P., Avila-Campos M.J., Cunha F.Q., *et al.* **The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice.** *Microbes Infect* 10: 489-496. 2008.
60. Garlet G.P., Martins W. Jr, Ferreira B.R., Milanezi C.M., Silva J.S. **Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease.** *J Periodontol Res* 38: 210-217. 2003.
61. Garlet G.P., Martins W. Jr, Fonseca B.A., Ferreira B.R., Silva J.S. **Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease.** *J Clin Periodontol* 31: 671-679. 2004.
62. Gemmell E., Seymour G.J. **Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease.** *Periodontol* 2000 35: 21-41. 2004.
63. Gemmell E., Yamasaki K., Seymour G.J. **Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response.** *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 17-34. 2002.
64. Gemmell E., Yamazaki K., Seymour G.J. **The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity.** *Periodontol* 2000 43: 14-40. 2007.
65. Gilroy D.W., Lawrence T., Perretti M. & Rossi A.G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.** *Nature Reviews. Drug Discovery* 3: 401-416. 2004.
66. Goletz S., Hanisch F.G., Karsten U. **Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains.** *J. Cell Sci.* 110: 1585-1596. 1997.
67. Gor D.O., Rose N.R., Greenspan N.S. **TH1-TH2: a procrustean paradigm.** *Nat Immunol* 4: 503-505. 2003.
68. Graves D.T., Cochran D. **The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction.** *J Periodontol* 74: 391-401. 2003.
69. Graves D.T., Fine D., Teng Y.T., Van Dyke T.E., Hajishengallis G. **The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases.** *J Clin Periodontol* 35: 89-105. 2008.
70. Hajishengallis G. ***Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics?** *Microbes Infect* 11: 637-645. 2009.
71. Hajishengallis G., Martin M., Schifferle R.E., Genco R.J. **Counteracting interactions between lipopolysaccharide molecules with differential activation of toll-like receptors.** *Infect Immun* 70: 6658-6664. 2002.

72. Hajishengallis G., Shakhatreh M.A., Wang M., Liang S. **Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo.** *J Immunol* 179: 2359–2367. 2007.
73. Hajishengallis G., Tapping R.I., Harokopakis E., Nishiyama S., Ratti P., Schifferle R.E., Lyle E.A., Triantafilou M., Triantafilou K., Yoshimura F. **Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus.** *Cell Microbiol* 8: 1557–1570. 2006.
74. Hajishengallis G., Wang M., Liang S., Triantafilou M., Triantafilou K. **Pathogen induction of CXCR4 / TLR2 crosstalk impairs host defense function.** *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13532–13537. 2008.
75. Han X., Lin X., Seliger A.R., Eastcott J., Kawai T., Taubman M.A. **Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria.** *Oral Microbiol Immunol* 24: 190-196. 2009.
76. Handfield M., Baker H.V., Lamont R.J. **Beyond good and evil in the oral cavity: insights into host–microbe relationships derived from transcriptional profiling of gingival cells.** *J Dent Res* 87: 203–223. 2008.
77. Handfield M., Mans J.J., Zheng G., Lopez M.C., Mao S., Progulske-Fox A., Narasimhan G., Baker H.V., Lamont R.J. **Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium–microbiotainteractions.** *Cell Microbiol* 7: 811–823. 2005.
78. Hannas A.R., Pereira J.C., Granjeiro J.M., Tjaderhane L. **The role of matrix metalloproteinases in the oral environment.** *Acta Odontol Scand* 65: 1-13. 2007.
79. Harris J.I., Russell R.R., Curtis M.A., Aduse-Opoku J., Taylor J.J. **Molecular mediators of *Porphyromonas gingivalis* induced T-cell apoptosis.** *Oral Microbiol Immunol* 17: 224–230. 2002.
80. Harris K.M., Fasano A., Mann D.L. **Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease.** *J Immunol* 181: 4457–4460. 2008.
81. He J. & Baum L.G. **Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration.** *Laboratory Investigation* 86: 578–590. 2006.
82. Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Muller-Newen G., Schaper F. **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.** *Biochem J* 374: 1–20. 2003.
83. Henderson B., Poole S., Wilson M. **Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis.** *Microbiol Rev* 60: 316-341. 1996.
84. Hernandez J.D. & Baum L.G. **Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate.** *Glycobiology* 12: 127R–136R. 2002.
85. Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashima M., Urashima T., Oka T., Futai M., Muller W.G.E., Yagi F., Kasai K. **Oligosaccharide specificity of**

- galectins: a search by frontal affinity chromatography.** *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 232–254. 2002.
86. Ho M.K. & Springer T.A. **Mac-2, a novel 32 000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.** *Journal of Immunology* 128: 1221–1228. 1982.
87. Houzelstein D., Goncalves I.R., Fadden A.J., Sidhu S.S., Cooper D.N., Drickamer K., Leffler H., Poirier F. **Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family.** *Mol. Biol. Evol.* 21: 1177–1187. 2004.
88. Hsu D.K., Yang R.Y., Pan Z., Yu L., Salomon D.R., Fung-Leung W.P., Liu F.T. **Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses.** *Am J Pathol.* 156(3): 1073-1083. Mar 2000.
89. Hsu K.D., Chen H.Y., Liu F.T. **Galectin-3 regulates T-cell function.** *Immunological Reviews* Vol. 230: 114–127. 2009.
90. Jankovic D., Liu Z., Gause W.C. **Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways.** *Trends Immunol* 22: 450-457. 2001.
91. Jeng K.C., Frigeri L.G. & Liu F.T. **An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes.** *Immunology Letters* 42: 113–116. 1994.
92. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. **Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway.** *J Immunol.* 1; 185(11): 7037-46. 2010.
93. Jiang H.R., Al Rasebi Z., Mensah-Brown E., Shahin A., Xu D., Goodyear C.S., Fukada S.Y., Liu F.T., Liew F.Y., Lukic M.L. **Galectin-3 Deficiency Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** *J Immunol* 15; 182(2): 1167-73. Jan 2009.
94. Johnson R.B., Serio F.G. **Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease.** *J Periodontol* 76: 785-790. 2005.
95. Jotwani R., Cutler C.W. **Fimbriated Porphyromonas gingivalis is more efficient than fimbria-deficient P. gingivalis in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response.** *Infect Immun* 72: 1725–1732. 2004.
96. Kakehashi S., Stanley H.R., Fitzgerald R.J. **The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol;* 20: 340–9. 1965.
97. Kaplanski G., Farnarier C., Kaplanski S., Porat R., Shapiro L., Bongrand P., Dinarello C.A. **Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism.** *Blood* 84: 4242–4248. 1994.
98. Karlsson A., Christenson K., Matlak M., Björstad A., Brown K.L., Telemo E., Salomonsson E., Leffler H., Bylund J. **Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils.** *Glycobiology.* 19(1): 16-20. 2009.

99. Kawai T, Akira S. **The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.** *Int Immunol.* 21(4): 317-37. 2009.
100. Kawai T., Matsuyama T., Hosokawa Y., Makihiro S., Seki M., Karimbux N.Y. **B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease.** *Am J Pathol* 169: 987-998. 2006.
101. Kikkert R., Laine M.L., Aarden L.A., van Winkelhoff A.J. **Activation of Toll-like receptors 2 and 4 by Gram-negative periodontal bacteria.** *Oral Microbiol Immunol* 22: 145-151. 2007.
102. Kishimoto T. **Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology.** *Annu Rev Immunol* 23: 1–21. 2005.
103. Kishimoto T., Akira S., and Taga T. **Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines.** *Science* 258: 22-26. 1992.
104. Koide M., Suda S., Saitoh S., Ofuji Y., Suzuki T., Yoshie H., Takai M., Ono Y., Taniguchi Y., Hara K. **In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats.** *J Oral Pathol Med* 24: 420–434. 1995.
105. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. **IL-17 and Th17 cells.** *Annu Rev Immunol* 27: 485–517. 2009.
106. Kunkel SL., Lukacs N., Kasama T. and Strieter RM. **The role of chemokines in inflammatory joint disease.** *J. Leukoc. Biol.* 59: 6-12. 1996.
107. Kuwabara I. & Liu F.T. **Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.** *Journal of Immunology* 156: 3939–3944. 1996.
108. Laing J.G., Robertson M.W., Gritzmacher C.A., Wang J.L., Liu F.-T. **Biochemical and immunological comparisons of carbohydrate-binding protein 35 and an IgE-binding protein.** *J. Biol. Chem.* 264: 1097–1100. 1989.
109. Laing J.G., Wang J.L. **Identification of carbohydrate binding protein.** *Biochemistry* 27: 5329–5334. 1988.
110. Lamont R.J., Jenkinson H.F. **Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244–1263. 1998.
111. Lee H.J., Kang I.K., Chung C.P., Choi S.M. **The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis.** *J Clin Periodontol* 22: 885–890. 1995.
112. Leibbrandt A., Penninger J.M. **RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology.** *Ann NY Acad Sci* 1143: 123-150. 2008.
113. Lerner U.H. **Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and acute phase reactions.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 481-493. 1994.

114. Li Y., Komai-Koma M., Gilchrist D.S., Hsu D.K., Liu F.T., Springall T. & Xu D. **Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation.** *Journal of Immunology* 181(4): 2781–2789. Aug 15, 2008.
115. Lin H.M., Pestell R.G., Raz A., Kim H.R. **Galectin-3 enhances cyclin D (1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells.** *Oncogene* 21: 8001–8010. 2002.
116. Liu F.T., Hsu D.K., Zuberi R.I., Kuwabara I., Chi E.Y. & Henderson W.R. Jr **Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages.** *American Journal of Pathology* 147: 1016–1028. 1995.
117. Liu F.T., Orida N. **Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of iRNK from rat basophilic leukemia cells.** *J. Biol. Chem.* 259: 10649–10652. 1984.
118. Liu F.T., Patterson R.J., Wang J.L. **Intracellular functions of galectins.** *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 263–273. 2002.
119. Liu L., Sakai T., Sano N., Fukui K. **Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling.** *Biochem. J.* 380: 31–41. 2004.
120. Liu FT, Rabinovich GA. **Galectins: regulators of acute and chronic inflammation.** *Ann N Y Acad Sci.*1183: 158-82. 2010.
121. Loubakos A., Potempa J., Travis J., D_Andrea M.R., Andrade-Gordon P., Santulli R., Mackie E.J., Pike R.N. **Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion.** *Infect Immun* 69: 5121–5130. 2001.
122. Lukić A., Danilović V., Petrović R. **Imunopatogenetski mehanizmi nastanka i razvoja hroničnih zubnih periapeksnih lezija.** *Vojnosanit. Pregl.* 62(3): 219-226. 2005.
123. Marsh P.D., Martin M.V., Lewis M.A.O., Williams D.W. **Oral Microbiology.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009.
124. Matarrese P., Tinari N., Semeraro M.L., Natoli C., Iacobelli S., Malorni W. **Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis.** *FEBS Lett* 473(3): 311–5. May 19 2000.
125. Matsuki Y., Yamamoto T., Hara K. **Localization of interleukin-1 (IL-1) iRNK-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid.** *J Periodontal Res:* 28: 35–42. 1993.
126. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P. **Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation.** *Science* 330: 362–366. 2010.
127. Menon R.P., Hughes R.C. **Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum–Golgi complex,** *Eur. J. Biochem.* 264: 569–576. 1999.

128. Mey A., Leffler H., Hmama Z., Normier G. & Revillard J.P. **The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites.** *Journal of Immunology* 156: 1572–1577. 1996.
129. Miller W.D. **The microorganisms of the human mouth.** Philadelphia: White dental MFG Co; 1890.
130. Mims C.A. **The pathogenesis of infectious disease.** London: Academic Press 1988.
131. Mok S.W., Riemer C., Madela K., Hsu D.K., Liu F.T., Gultner S., Heise I. & Baier M. **Role of galectin-3 in prion infections of the CNS.** *Biochemical and Biophysical Research Communication* 359: 672–678. 2007.
132. Moon B.K., Lee Y.J., Battle P., Jessup J.M., Raz A. & Kim H.R. **Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis.** *American Journal of Pathology* 159: 1055–1060. 2001.
133. Moutsopoulos N.M., Kling H.M., Angelov N., Jin W., Palmer R.J., Nares S., Osorio M., Wahl S.M. ***Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis.** *Journal of Autoimmunity* 39(4): 294-303. 2012.
134. Nair P.N.R. **Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures.** *Crit Rev Oral Biol Med* 15(6): 348-381. 2004.
135. Nakajima T., Ueki-Maruyama K., Oda T., Ohsawa Y., Ito H, Seymour G.J. **Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues.** *J Dent Res* 84: 639-643. 2005.
136. Nakamura H., Fukusaki Y., Yoshimura A., Shiraishi C., Kishimoto M., Kaneko T. **Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice *in vivo*.** *Oral Microbiol Immunol* 23: 190-195. 2008.
137. Nassar H., Chou H.H., Khlgatian M., Gibson F.C. III, Van Dyke T.E., Genco C.A. **Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells.** *Infect Immun* 70: 268–276. 2002.
138. Nieminen J., St-Pierre C. & Sato S. **Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses.** *Journal of Leukocyte Biology* 78: 1127–1135. 2005.
139. Nieminen J., St-Pierre C., Bhaumik P., Poirier F. & Sato S. **Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*.** *Journal of Immunology* 180: 2466–2473. 2008.
140. Nomoto K., Tsuneyama K., Abdel Aziz H.O., Takahashi H., Murai Y., Cui Z.G., Fujimoto M., Kato I., Hiraga K., Hsu D.K. **Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice.** *Journal of Pathology* 210: 469–477. 2006.
141. Norling L.V., Perretti M. and Cooper D. **Endogenous galectins and the control of host inflammatory response.** *Journal of Endocrinology*: 201: 169-174. 2009.

142. Nussbaum G., Ben-Adi S., Genzler T., Sela M., Rosen G. **Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components.** *Infect Immun* 77: 3939-3947. 2009.
143. Ochieng J., Platt D., Tait L., Hogan V., Raz T., Carmi P., Raz A. **Structure–function relationship of a recombinant human galactosidebinding protein.** *Biochemistry* 32: 4455–4460. 1993.
144. Ogawa T. **Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide.** *FEBS Lett* 332: 197–201. 1993.
145. Ogawa T., Asai Y., Hashimoto M., Takeuchi O., Kurita T., Yoshikai Y., Miyake K., Akira S. **Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway.** *Int Immunol* 14: 1325–1332. 2002.
146. Oka N., Nakahara S., Takenaka Y., Fukumori T., Hogan V., Kanayama H.O., Yanagawa T., Raz A. **Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells.** *Cancer Res* 65: 7546–7553. 2005.
147. Okada H., Murakami S. **Cytokine expression in periodontal health and disease.** *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 248-266. 1998.
148. Ozeki Y., Matsui T., Yamamoto Y., Funahashi M., Hamako J. & Titani K. **Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1.** *Glycobiology* 5: 255–261. 1995.
149. Pace K.E., Hahn H.P., Pang M., Nguyen J.T. & Baum L.G. **CD7, delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death.** *Journal of Immunology* 165: 2331–2334. 2000.
150. Park J.W., Voss P.G., Grabski S., Wang J.L., Patterson R.J. **Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein.** *Nucleic Acids Res* 29: 3595–3602. 2001.
151. Park S.J., Nakagawa T., Kitamura H., Atsumi T., Kamon H., Sawa S., Kamimura D., Ueda N., Iwakura Y., Ishihara K., Murakami M., Hirano T. **IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation.** *J Immunol* 173: 3844–3854. 2004.
152. Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J. & Baum L.G. **Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.** *Nature* 378: 736–739. 1995.
153. Pugliese G., Pricci F., Iacobini C., Leto G., Amadio L., Barsotti P., Frigeri L., Hsu D.K., Vlassara H., Liu F.T. **Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice.** *FASEB Journal* 15: 2471–2479. 2001.
154. Rabinovich G.A., Toscano M.A. **Turning sweet on immunity: galectin-glucan interactions in immune tolerance and inflammation.** *Nat.Rev.Immunol.* 9: 338-352. 2009.
155. Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I., Milovanovic M., Pejnovic N., Arsenijevic N., Hsu D.K., Lukic M.L. **The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression.** *Immunol Res.* 52(1-2): 100-110. Apr 2012.

156. Raz A., Pazerini G., Carmi P. **Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein.** *Cancer Res* 49: 3489–3493. 1989.
157. Riggs M.G., Whittaker R.G., Neumann J.R., Ingram V.M. **n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells.** *Nature* 268: 462–464. 1977.
158. Roff C.F., Wang J.L. **Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts.** *J. Biol. Chem.* 258: 10657–10663. 1983.
159. Sallusto F., Lanzavecchia A. **Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity.** *Eur J Immunol* 39: 2076-2082. 2009.
160. Sano H., Hsu D.K., Apgar J.R., Yu L., Sharma B.B., Kuwabara I. et al. **Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages.** *J Clin Invest* 112(3): 389–97. Aug 2003.
161. Sano H., Hsu D.K., Yu L., Apgar J.R., Kuwabara I., Yamanaka T., Hirashima M., Liu F.T. **Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.** *J Immunol* 165(4): 2156-64. 2000.
162. Sarvetnick N., Liggitt D., Pitts SL., Hansen SE. and Stewart TA. **Insulin dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma.** *Cell* 52: 773-782. 1988.
163. Sasaki H., Okamoto Y., Kawai T., Kent R., Taubman M., Stashenko P. **The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss.** *J Periodontal Res* 39: 432-441. 2004.
164. Sasaki H., Suzuki N., Kent R. Jr., Kawashima N., Takeda J., Stashenko P. **T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis* induced periodontitis in IL-10-deficient mice.** *J Immunol* 180: 6193–6198. 2008.
165. Sato K., Suematsu A., Okamoto K., Yamaguchi A., Morishita Y., Kadono Y. **Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.** *J Exp Med* 203: 2673-2682. 2006.
166. Sato S., Burdett I., Hughes R.C. **Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum–Golgi complex.** *Exp Cell Res* 207: 8–18. 1993.
167. Sato S., Ouellet N., Pelletier I., Simard M., Rancourt A. & Bergeron M.G. **Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia.** *Journal of Immunology* 168: 1813–1822. 2002.
168. Schäfer C. **Nobel Prize in medicine. Knockout mice revolutionize genetics.** *Unfallchirurg* 110(12): 1082-1084. Dec 2007.
169. Schmitz M. L., Weber A., Roxlau T., Gaestel M., Kracht M. **Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(12): 2165-2175. 2011.

170. Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M. **X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution.** *J. Biol. Chem.* 273: 13047–13052. 1998.
171. Serhan C.N., Brain S.D., Buckley C.D., Gilroy D.W., Haslett C., O'Neill L.A., Perretti M., Rossi A.G. & Wallace J.L. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB Journal* 21: 325–332. 2007.
172. Seymour G.J., Gemmell E. **Cytokines in periodontal disease: where to from here?** *Acta Odontol Scand* 59: 167–173. 2001.
173. Shalom-Feuerstein R., Cooks T., Raz A., Kloog Y. **Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells.** *Cancer Res* 65: 7292–7300. 2005.
174. Silva M.T. **Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens.** *J Leukoc Biol* 87: 805-813. 2010.
175. Silva T.A., Garlet G.P., Fukada S.Y., Silva J.S., Cunha F.Q. **Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease.** *J Dent Res* 86: 306–319. 2007.
176. Smith CA., Farrah T. and Goodwin RG. **The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.** *Cell* 76: 959-962. 1994.
177. Smith KA. **Interleukin-2: inception, impact and implications.** *Science* 240: 1169-1176. 1988.
178. Sparrow C.P., Leffler H., Barondes S.H. **Multiple soluble b-galactosidebinding lectins from human lung.** *J. Biol. Chem.* 262: 7383–7390. 1987.
179. Stashenko P., Dewhirst F.E., Peros W.J., Kent R.L., Ago J.M. **Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption.** *J Immunol* 138: 1464–1468. 1987.
180. Steinsvoll S., Halstensen T.S., Schenck K. **Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue.** *J Clin Periodontol* 26: 366-373. 1999.
181. Stillman B.N., Hsu D.K., Pang M., Brewer C.F., Johnson P., Liu F.T. et al. **Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.** *J Immunol* 176(2): 778–89. Jan 15, 2006.
182. Stowell S.R., Qian Y., Karmakar S., Koyama N.S., Dias-Baruffi M., Leffler H., McEver R.P. & Cummings R.D. **Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion.** *J Immunol* 180: 3091–3102. 2008.
183. Streuli C. **Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation.** *Curr Opin Cell Biol* 11: 634–640. 1999.
184. Sugawara S., Nemoto E., Tada H., Miyake K., Imamura T., Takada H. **Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas***

- gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness.** J Immunol 165: 411–418. 2000.
185. Suzuki Y., Inoue T., Yoshimaru T., Ra C. **Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition.** Biochemica and Biophysica Acta 1783: 924–934. 2008.
186. Taga T., Kishimoto T. **Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines.** Annu Rev Immunol 15: 797–819. 1997.
187. Taipale J. & Keski-Oja J. **Growth factors in the extracellular matrix.** FASEB Journal 11: 51–59. 1997.
188. Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K. **T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma.** Nature 408: 600-605. 2000.
189. Takeuchi O., Akira S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** Cell 140: 805–820. 2010.
190. Tanabe N., Maeno M., Suzuki N., Fujisaki K., Tanaka H., Ogiso B., Ito K. **IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts.** Life Sci 77: 615–626. 2005.
191. Tanamoto K., Azumi S., Haishima Y., Kumada H., Umemoto T. **Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*.** Microbiol 143: 63–71. 1997.
192. Tanomaru J.M.G., Leonardo R.M., Silva L.A.B., Poliselino Neto A., Tanomaru-Filho M. **Histopathological evaluation of different methods of experimental induction of periapical periodontitis.** Braz Dent J 19(3): 238-244. 2008.
193. Taubman M.A., Han X., Larosa K.B., Socransky S.S., Smith D.J. **Periodontal bacterial DNA suppresses the immune response to mutans streptococcal glucosyltransferase.** Infect Immun 75: 4088-4096. 2007.
194. Taylor J.J. **Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*.** Periodontology 2000 Vol. 54: 160–194. 2010.
195. Tonetti M.S. **Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration.** J Periodontal Res 32: 104–109. 1997.
196. Tsay Y.G., Lin N.Y., Voss P.G., Patterson R.J., Wang J.L. **Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts.** Exp. Cell Res. 252: 250–261. 1999.
197. Uehara A., Imamura T., Potempa J., Travis J., Takada H. **Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells.** Cell Microbiol 10: 1181–1189. 2008.
198. Van den Brule F., Califice S., Castronovo V. **Expression of galectins in cancer: a critical review.** Glycoconj. J. 19: 537–542. 2004.

199. Verstappen J., Von den Hoff J.W. **Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease.** *J Dent Res* 85: 1074-1084. 2006.
200. Vlassara H., Li Y.M., Imani F., Wojciechowicz D., Yang Z., Liu F.-T., Cerami A., **Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex.** *Mol. Med.* 1: 634-646. 1995.
201. Waldmann H., Cobbold S. **Regulatory T cells: context matters.** *Immunity* 30: 613-615. 2009.
202. Wang J.L., Gray R.M., Haudek K.C., Patterson R.J. **Nucleocytoplasmic lectins.** *Biochim. Biophys. Acta* 1673: 75-93. 2004.
203. Wang P.L., Ohura K., Fujii T., Oido-Mori M., Kowashi Y., Kikuchi M., Suetsugu Y., Tanaka J. **DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues.** *Biochem Biophys Res Commun* 305: 970-973. 2003.
204. Ware C.F. **The TNF superfamily.** *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 181-184. 2003.
205. Weaver C.T., Hatton R.D. **Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective.** *Nat Rev Immunol* 9: 883-889. 2009.
206. Wesa A., Galy A. **Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand.** *BMC Immunol* 3: 14. 2002.
207. Woo H.J., Shaw L.M., Messier J.M., Mercurio A.M. **The major nonintegrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2).** *J. Biol. Chem.* 265: 7097-7099. 1990.
208. Yago T., Nanke Y., Ichikawa N., Kobashigawa T., Mogi M., Kamatani N. **IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNFalpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17.** *J Cell Biochem* 108: 947-955. 2009.
209. Yang R.Y., Hill P.N., Hsu D.K., Liu F.-T. **Role of the carboxylterminal lectin domain in self-association of galectin-3.** *Biochemistry* 37: 4086-4092. 1998.
210. Yang R.Y., Hsu D.K., Liu F.T. **Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6737-42. Jun 25 1996.
211. Yoshimura A., Mori H., Ohishi M., Aki D., Hanada T. **Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation.** *Curr Opin Immunol* 15: 704-708. 2003.
212. Yoshimura A., Naka T., Kubo M. **SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation.** *Nat Rev Immunol* 7: 454-465. 2007.
213. Yu F., Finley R.L.Jr., Raz A., Kim H.R. **Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.** *J. Biol. Chem.* 277: 15819-15827. 2002.

214. Yu J.J., Ruddy M.J., Conti H.R., Boonnanantanasarn K., Gaffen S.L. **The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis* induced periodontal bone loss.** *Infect Immun* 76: 4206–4213. 2008.
215. Yu J.J., Ruddy M.J., Wong G.C., Sfintescu C., Baker P.J., Smith J.B., Evans R.T., Gaffen S.L. **An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals.** *Blood* 109: 3794–3802. 2007.
216. Zhang D., Chen L., Li S., Gu Z., Yan J. **Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS.** *Innate Immun* 14(2): 99-107. 2008.
217. Zhou Q. & Cummings R.D. **L-14, lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion.** *Arch Biochem Biophys* 300: 6–17. 1993.
218. Zuberi R.I., Hsu D.K., Kalayci O., Chen H.Y., Sheldon H.K., Yu L., Apgar J.R., Kawakami T., Lilly C.M. & Liu F.T. **Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma.** *American Journal of Pathology* 165: 2045–2053. 2004.

BIOGRAFIJA

Magistar Petar Milosavljević rođen je 23. marta 1961. godine u Beogradu gde je pohađao osnovnu školu i gimnaziju. Fakultet veterinarske medicine završio je 1993. godine sa prosečnom ocenom 8.03. Od 1994. godine radi na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Specijalističke studije iz oblasti patologije domaćih i laboratorijskih životinja završio je u novembru 1995. godine odbranom specijalističkog rada pod naslovom **Morfološke promene na jetri nastale pri autotransplantaciji jetre svinja**. Magistarske studije završio je odbranom magistarskog rada pod naslovom **Patohistološke i imunohistohemijske karakteristike eksperimentalnog autoimunog miokarditisa kod DA pacova**, u junu 2004. godine. Do sada je objavio 11 radova u domaćim i stranim časopisima i veći broj apstrakata sa simpozijuma i kongresa. Učestvovao je na nizu projekata u okviru naučno istraživačkog rada na VMA.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Милосављевић Петар _____

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога Галектина-3 у развоју периапексних инфламаторних лезија код миша

- 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, _____ 25.04.2013. _____

Милосављевић Петар

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора _____Милосављевић Петар_____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада __ Улога Галектина-3 у развоју периапексних инфламаторних лезија
код миша _____

Ментор _____проф др Милијан Јовановић_____

Потписани/а _____Милосављевић_Петар_____

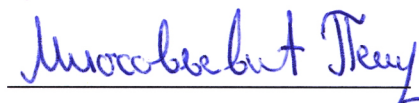
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, _____ 25.04.2013. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога Галектина-3 у развоју периапексних инфламаторних лезија код миша

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, __25.04.2013._____

