

**УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА ПРИВРЕМЕНИМ
СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Јелена Р. Станишић Зиндовић

**ИСПИТИВАЊЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ЕКСПРЕСИЈЕ
БАКТЕРИЈСКОГ ХИТ ШОК ПРОТЕИНА,
ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ И АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ
ЦИТОКИНА И ХИСТОПАТОЛОШКИХ
КАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА**

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2021.

**UNIVERSITY OF PRISTINA TEMPORARY SETTLED IN
KOSOVSKA MITROVICA
FACULTY OF MEDICINE**

Jelena R. Stanišić Zindović

**EXAMINATION OF THE CORRELATION BETWEEN THE
EXPRESSION OF BACTERIAL HEAT SHOCK
PROTEIN, PROINFLAMMATORY AND ANTI-
INFLAMMATORY CYTOKINES
AND HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
PERIAPICAL LESIONS**

Doctoral Dissertation

Kosovska Mitrovica, 2021.

Ментор:

Проф. др Бранко Михаиловић - редовни професор Медицинског Факултета
Универзитета у Приштини

Чланови комисије:

Проф. др Небојша Арсенијевић, председник
Универзитет у Крагујевцу, Медицински факултет

Проф. др Бранко Михаиловић, члан
Универзитет у Приштини, Медицински факултет

Проф. др Зоран Лазић, члан
Универзитет одбране у Београду, Медицински факултет Војномедицинске
академије

Датум одбране докторске дисертације: _____

ИСПИТИВАЊЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКОГ ХИТ ШОК ПРОТЕИНА, ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ И АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА И ХИСТОПАТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА

САЖЕТАК

Периапексне лезије представљају инфламацијску болест периапексног ткива која се јавља услед имунског одговора на микроорганизме присутне у каналу корена зуба и карактерише се локалном инфламацијом која је праћена ресорпцијом кости.

Циљ ове студије је да се утврди експресија бактеријског *heat shock* протеина GroEL у периапексном ткиву добијеном од особа са периапексним лезијама и квантитативно одреди експресија (ниво иРНК) проинфламацијских цитокина које продукују ћелије урођене имуности (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TNF- α), антиинфламацијског цитокина (IL-10), цитокина које продукују Th1 (IFN- γ), и Th2 ћелије (IL-4, IL-5, IL-13) и утврди корелација између експресије бактеријског *heat shock* протеина и одређених група цитокина.

Студија је изведена на 40 узорак периапексних лезија који су узимани приликом екстракције зуба или апексне хирургије. Контролну групу је чинило 10 узорак здравог периапексног ткива које је узимано приликом екстракције здравих зуба из ортодонтских разлога. Сви испитаници су били без системских обољења и без антибиотске терапије у протеклих месец дана. Узорци су прикупљени на Клиници за оралну хирургију Медицинског Факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици. Ову студију одобрио је Етички комитет Медицинског факултета Универзитета у Приштини, Косовска Митровица (бр: 09-537-1). Из ткива периапексних лезија је коришћењем тризола изолована укупна РНК, која је коришћењем *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-a (Thermo Fisher Scientific)* кита преписана у комплементарну ДНК. Експресија гена од интереса је

квантификована методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR), коришћењем *Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix-a* (*Thermo Fisher Scientific*) и *Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf*, Хамбург, Немачка). Релативна експресија гена је израчуната помоћу формуле $2^{-(C_t - C_{tactin})}$, где C_t представља праг циклуса испитиваног гена, а C_{tactin} представља вредност прага циклуса „housekeeping“ гена (GAPDH). Парафински исечци ткива дебљине 5 μ m бојени хематоксилином и еозином, коришћени су за анализу хистолошког типа (циста или гранулом) периапексне лезије.

Добијени резултати показују да је експресија мРНК бактеријских хит шок протеина HSP60 и GroE1, инфламацијских цитокина IL-8 и TNF- α , Th1 цитокина, INF- γ , статистички значајно већа у ткиву периапексних лезија него у здравом периапексном ткиву. Експресија Th2 цитокина, IL-4, и антиинфламацијског цитокина, IL-10, је статистички значајно већа у здравом ткиву него у ткиву периапексних лезија. Показана је позитивна корелација између нивоа експресије HSP60 и IL-1 и статистички значајна позитивна повезаност експресије GroEL и експресије IL-6, TNF- α и IL-1. Већа експресија HSP60 повезана је са већом експресијом INF- γ , док је већа експресија GroEL повезана са већом експресијом IL-5 и IL-13. Већа експресија хит шок протеина и HSP60 и GroEL, инфламацијског цитокина TNF- α , а значајно мања експресија IL-1 и IL-4 детектована је у ткиву гранулома у поређењу са ткивом радикалних циста. Испитаници са малим лезијама имали су значајно мању експресију IL-23, а значајно већу експресију INF- γ и антиинфламацијског цитокина IL-10 у поређењу са групом испитаника са детектованим великим лезијама.

Показана је јака корелација између експресије протеина бактеријског топлотног шока у ткиву периапексних лезија и експресије проинфламацијских цитокина који учествују у развоју периапексних лезија TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-12, и INF- γ цитокина који продукују Th1 лимфоцити, ћелија које играју једну од главних улога у патогенези ове болести. Добијени резултати указују да Crp60 (HSP60, GroE1) вероватно игра улогу стимулатора инфламацијског одговора у периапексном ткиву, тј. да је један од актера у патогенези периапексних лезија.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: периапексне лезије, хит шок протеини, проинфламацијски цитокини, Th1 цитокини, Th2 цитокини, антиинфламацијски цитокини, периапексни грануломи, радикалне цисте.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Стоматолошке науке

УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ: Базичне стоматолошке науке

EXAMINATION OF THE CORRELATION BETWEEN THE EXPRESSION OF BACTERIAL HEAT SHOCK PROTEIN, PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES AND HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PERIAPICAL LESIONS

SUMMARY

Periapical lesion is an inflammatory disease of the periapical tissue that occurs due to an immune response to microorganisms present in the root canal and is characterized by local inflammation accompanied by bone resorption.

The aim of this study is to determine the expression of the bacterial *heat shock* protein GroEL in periapical tissue collected from individuals with periapical lesions, and to quantify the expression (mRNA level) of proinflammatory cytokines produced by innate immune cells (IL-1, IL-6, IL-8), IL-12, IL-23, TNF- α), anti-inflammatory cytokine (IL-10), cytokines that produce Th1 (IFN- γ), and Th2 cells (IL-4, IL-5, IL-13), and determine the correlation between the expression of bacterial heat shock protein and certain cytokine groups.

The study was conducted on 40 samples of periapical lesions collected during tooth extraction or apical surgery. The control group consisted of 10 samples of healthy periapical tissue taken during the extraction of healthy teeth for orthodontic reasons. None of the subjects had any systemic diseases, or antibiotic therapy during the preceding month. Samples were collected at the Oral Surgery Clinic of the Faculty of Medicine in Pristina, based in Kosovska Mitrovica. This study was approved by the Ethics Committee of the University of Pristina - Faculty of Medicine, Kosovska Mitrovica (No: 09-537-1). Trizol was used to isolate the total RNA from the tissue of the periapical lesions, which was transcribed into complementary DNA using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Gene expression of interest was quantified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) method in real time (Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR), using the Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and Mastercycler ep realplex

(Eppendorf, Hamburg, Germany). Relative gene expression was calculated using the formula $2^{-(C_t - C_{tactin})}$, where C_t represents the threshold of the test gene cycle and C_{tactin} represents the threshold value of the “housekeeping” gene cycle (GAPDH). 5 μ m thick paraffin-embedded tissue sections, stained with hematoxylin and eosin, were used for the analysis of the histological type (cyst or granuloma) of the periapical lesion.

The obtained results show that the mRNA expression of bacterial hit shock proteins HSP60 and GroE1, inflammatory cytokines IL-8 and TNF- α , Th1 cytokines, INF- γ , is statistically significantly higher in periapical lesion tissue than in healthy periapical tissue. The expression of the Th2 cytokine, IL-4, and the anti-inflammatory IL-10, is statistically significantly higher in healthy tissue than in periapical lesion tissue. A positive correlation between HSP60 and IL-1 expression levels, and a statistically significant positive correlation between GroEL expression and IL-6, TNF- α and IL-1 expression, were shown. Higher expression of HSP60 is associated with higher expression of INF- γ , while higher expression of GroEL is associated with higher expression of IL-5 and IL-13. Higher expression of heat shock proteins and HSP60 and GroEL, the inflammatory cytokine TNF- α , and significantly lower expression of IL-1 and IL-4 were detected in granuloma tissue compared to radicular cyst tissue. Subjects with small lesions had significantly lower expression of IL-23, significantly higher expression of INF- γ and the anti-inflammatory cytokine IL-10, compared with the group of subjects with large lesions detected.

A strong correlation was shown between the expression of bacterial heat shock proteins in periapical lesion tissue and the expression of proinflammatory cytokines involved in the development of periapical lesions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12, and INF- γ cytokines produced by Th1 lymphocytes, cells that play one of the main roles in the pathogenesis of this disease. The obtained results indicate that Cpn60 (HSP60, GroE1) probably plays the role of stimulator of the inflammatory response in the periapical tissue, i.e., that it is one of the actors in the pathogenesis of periapical lesions.

KEY WORDS: periapical lesions, heat shock proteins, proinflammatory cytokines, Th1 cytokines, Th2 cytokines, anti-inflammatory cytokines, periapical granulomas, radicular cysts.

SCIENTIFIC AREA: Dental Sciences

SPECIFIC SCIENTIFIC AREA: Basic Dental Science

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ.....	9
1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. Етиологија.....	3
2.1.1. Микробини узрочници.....	3
2.1.1.1. Микроорганизми.....	4
2.1.1.2. Антигени микроорганизама.....	5
2.1.1.2.1. Хит шок протеини.....	7
2.1.2. Немикробни узрочници.....	9
2.2. Класификације периапексних лезија.....	10
2.3. Хистопатолошке карактеристике периапексних лезија.....	11
2.4. Патогенеза периапексних лезија.....	15
2.4.1. Ћелије присутне у периапексним лезијама.....	15
2.4.1.1. Неутрофили.....	16
2.4.1.2. Макрофаги.....	16
2.4.1.3. Лимфоцити.....	17
2.4.1.3.1. Т лимфоцити.....	18
2.4.1.3.2. В лимфоцити.....	20
2.4.1.4. Остеокласти.....	21
2.4.1.5. Епителне ћелије.....	23
2.4.2. Медијатори у хроничним периапексним лезијама.....	23
2.4.2.1. Проинфламацијски цитокини.....	24
2.4.2.2. Th1- проинфламацијски цитокини.....	26
2.4.2.3. Th2-citoкини.....	27
2.4.2.4. Th17 - citoкини.....	28
2.4.2.5. Антиинфламацијски цитокини.....	28
3. ЦИЉ РАДА.....	30
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
5. РЕЗУЛТАТИ.....	35

6. ДИСКУСИЈА	78
6.1. Хит шок протеини	78
6.2. Проинфламацијски цитокини.....	81
6.3. Th цитокини.....	86
6.4. Антиинфламацијски цитокини	88
7. ЗАКЉУЧЦИ	90
8. ЛИТЕРАТУРА	92
Изјава о ауторству	116
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	117
Изјава о коришћењу.....	118

1. УВОД

Периапексне лезије представљају инфламацијску болест периапексног ткива која се између осталог јавља и услед имунског одговора на микроорганизме присуте у каналу корена зуба и карактерише се локалном инфламацијом која је праћена ресорпцијом кости.

Молекулски обрасци микроорганизама присутних у каналу корена зуба и оштећење ткива које евентуално могу да проузрокују микроорганизми индукују инфламацију и стимулишу развој имунског одговора. Од интеракције микроорганизама и имунског одговора домаћина зависи ток инфламацијске лезије. Ове лезије могу имати акутни или хронични карактер, и рангирају се од незнатне инфламације до обимне ткивне деструкције.

Ендодонтски простор, посебно у пределу апекса, је погодна средина за раст микроорганизама. Услед смањене одбрамбене способности организма, нарушава се равнотежа између присутних микроорганизама и одбрамбених механизма домаћина, па молекулски обрасци микроорганизама (липополисахарид, егзотксини) активирају ћелије урођене имуности што за резултат има развој запаљењске реакције. Као последица тих реакција активирају се остеокласти који изазивају ресорпцију алвеоларне кости.

Heat shock протеини су група високо конзервираних протеина. Налазе се како у прокариотским тако и у еукариотским ћелијама. Сигнал за њихову већу синтезу и експресију у ћелијама су: повишена температура, ултравиолетно зрачење, хемијски агенси и инфекција. Осим тога што имају заштитну улогу, *heat shock* протеини представљају и снажне антигене, услед чега се висока хомологија између бактеријских и хуманих *heat shock* протеина сматра и фактором ризика за напредовање хроничних процеса и развоја молекуларне мимикрије.

Периапексне лезије се састоје од некротичне, ексудативне, грануломатозне и фиброзне зоне, а гледајући према доминантним зонама, лезије могу бити класификоване на: ексудативне, грануломатозне, грануломатозно-фиброзне,

фиброзне и епителне периапексне лезије. Епително ткиво које може бити присутно у периапексним лезијама води порекло од Маласезових епителних остатака Хертвигове овојнице. Због постојања различитих хистолошких карактеристика периапексних лезија, постоје и различите форме периапексних лезија.

У састав ћелијског инфилтрата у хроничном апексном пародонтитису улазе готово све ћелије неспецифичне и специфичне имуности. У ове ћелије спадају неутрофилни гранулоцити, макрофаги, лимфоцити, плазмоцити и епителне ћелије. Мање заступљене, али функционално значајне, ћелијске популације представљају мастоцити, еозинофилни гранулоцити, дендритске ћелије и *natural killer* (NK) лимфоцити. Поред ових ћелија и ћелије које чине нормалну структуру периапексног ткива (фибробласти, остеобласти и Маласезове епителне ћелије), играју значајну улогу у патогенези периапексних промена.

T- лимфоцити су ћелије целуларне имуности које одговарају на антиген брзом секрецијом различитих цитокина који имају различите активности. На месту запаљења се ослобађају различити медијатори запаљења, укључујући проинфламацијске цитокине. Проинфламацијски цитокини играју значајну улогу у патогенези хроничних периапексних лезија и одговорни су развој значајног оштећења ткива, које се на крају ограничава имунорегулацијским механизмима. Имунорегулацијски механизми су контролисани антиинфламацијским цитокинима, који супримирају инфламацију и подстичу регенерацију оштећеног ткива.

Однос међу овим факторима инфламације је важан за разумевања етиологије и патогенезе периапексних лезија.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Периапексни пародонтитис је инфламацијска болест периапексног ткива која је последица имунског одговора на инфекцију проширену из канала корена зуба, а карактерише је локална инфламација праћена ресорпцијом кости (1, 2).

Периапексне лезије предстаљају процесе који се јављају искључиво око апекса зуба са некротичном пулпом (3). То су патолошке промене које настају на врховима коренова авиталних зуба, када некротични садржај канала корена континуирано иритира периапексно ткиво што резултује хроничним запаљенским процесом комплексне генезе обично посредованом неспецифичним медијаторима запаљења и имунским реакцијама (4, 5).

2.1. Етиологија

Периапексне лезије представљају мултикаузално обољење (4), а етиолошки фактори могу бити биолошки, физички и хемијски (6).

2.1.1. Микробини узрочници

Најважнији предуслов продора етиолошких нокси у периапексни простор је каријес јер се узрапредовали процес оштећења дентина шири на пулпу изазивајући њену некрозу и ширење токсичног материјала у периапекс и то преко главног апексног отвора или системом акцесорних канала када се инфекција шири у латерални пародонцијум (6, 7). Сматра се да бактерије могу доспети у пулпу и другим путевима као што су огољени дентински тубули, пулпо-периодонталне комуникације, латерални и апикални хематогени и лимфогени пут контаминације

(6, 7, 8). Асколијева анахореза се такође помиње као један од начина продора микроорганизама у простор канала корена зуба (9).

Недовољно испуњавање канала током конзервативног лечења пулпитиса оставља празан простор најчешће у апикалној трећини где перзистирају микроорганизми. Знатно ређе, инфекција се у периапексно ткиво може проширити из дубоких пародонталних џепова (4, 6).

2.1.1.1. Микроорганизми

Милер се први бавио присуством микроорганизама у усној дупљи (10). Микроорганизми изоловани из периапексних лезија су нормални становници усне дупље и припадају оралној флори и исти су као они присутни у денталном плаку, пародонталним џеповима или каријесној лезији.

Теоријски, свака микробна врста која колонизује некротичну пулпу може учествовати у патогенези периапексних лезија (11).

Истраживања која су заснована на секвенцирању 16S рибозомске РНК бактерија, потврдила су присуство преко 1.000 различитих бактеријских врста у усној дупљи (12, 13).

Мале концентрације кисеоника у каналима корена зуба са некрозом пулпе, доступност нутритивних материја као и бактеријски међуодноси су важни еколошки фактори који детерминишу колонизацију простора канала корена зуба, фаворизујући бактерије из групе стриктних анаероба (14).

Главни узрочници нетретираних периапексних лезија су најчешће бактерије које припадају родовима *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium* и *Streptococcus* (15).

Резултати истраживања микрофлоре инфицираног канала корена зуба указују да строго анаеробне бактерије доминирају микробном популацијом нетретираних

некротичних коренских канала, са приближно 5–12 родова укључујући: *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* и *Actinomyces* (16).

Бактерије присутне у сложеним заједницама екстраадиксног биофилма имају карактеристике које их разликују од њихових планктонских облика. Те особине су: изражена метаболичка разноликост и ефикасност, отпорност на фагоцитозу, антимикробне агенсе и утицаје околине, и повећана патогеност (17). Све то заједно представља тежак изазов за ендодонтски нехируршки приступ лечењу. Упркос великом одступању у учесталости различитих врста периапексних лезија ипак су грануломи најучесталији (18).

2.1.1.2. Антигени микроорганизама

Интраадиксни микроорганизми су основни етиолошки агенси апексног пародонтитиса (19), а хистопатолошки изглед периапексних лезија зависи највише од динамике апексног пародонтитиса (20). Током апексног пародонтитиса микроорганизми су стационарани углавном у некротичној пулпи и независно од њихове вируленције и ткивне инвазивности узрокују инфламацију ослобађајући антигенске молекуле које надражују периапексна ткива на апексним и маргиналним местима. Бактерије ендодонтске флоре су варијабилне вируленције, а њихове особине као и интраадиксно преживљавање и су под утицајем следећих фактора:

1. Интеракције са другим микороорганизмима у каналу корена са развојем синергистичког/антагонистичког деловања
2. Способности ометања и избегавања одбране домаћина
3. Ослобађања липополисахарида (LPS) и других бактериских продуката
4. Синтезе ензима који оштећују ткива домаћина (20).

Интеракције микроба које утичу на екологију ендодонтске флоре могу бити позитивне или негативне, а резултат су утуцаја одређених организама на респираторну и нутритивну средину канала корена зуба (21, 22).

Фактори вируленције бактерија које насељавају инфициране канале корена зуба са хроничним периапексним лезијама могу бити структурни и екстрацелуларни. У структурне компоненте спадају: ендотоксин (липополисахарид), пептидогликан, липотеихоична киселина, протеини спољашње мембране, фимбрије, флагеле и бактеријска ДНК. Екстрацелуларни продукти су: ензими (протеиназе, хијалуронидазе), егзотоксини (пр. леукотоксин), хит шок протеини, крајњи продукти метаболизма. Фактори вируленције подразумевају структурне ћелијске компоненте као и ослобођене бактеријске производе. Ови фактори у периапексном подручју подстичу развој имунских реакција домаћина, које се заснивају, између осталог, и на производњи проинфламацијских цитокина, што је од посебног значаја за индукцију ресорпције кости (23).

Липополисахариди (LPS), познати и као ендотоксини, су термостабилни пирогени макромолекули који улазе у састав ћелиског зида Gram– микроорганизама. Ослобађају се после смрти бактерија њиховом дезинтеграцијом (20). LPS је важан фактор вируленције и игра улогу у ендодонтским и пародонтским инфекцијама и његово присуство је повезано са ресорпцијом кости и клиничком симптоматологијом пулпитиса и периапексних лезија (24, 25).

LPS нису једини продукти бактеријске деградације који стимулише ћелије сисара на продукцију цитокина. Многи протеини, угљени хидрати и липиди бактеријског порекла се сматрају припадницима нове класе „модулина“ који утичу на формирање мреже цитокина и изазивају патолошка стања у ткивима домаћина (26).

Динамични процеси између микроорганизама и фактора одбране домаћина у пределу периапекса имају за последицу развој различитих категорија апексних пародонталних лезија. Равнотежа у пределу апекса, у корист или против одбране домаћина, одређује хистолошку слику лезије (4).

У ткиву апексног пародонцијума развија се неспецифична запаљенска реакција којом организам покушава да елиминише штетно дејство узрочника и ограничи ширење настале запаљењске реакције. Интензитет, форма и ток запаљенске реакције у апексном пародонцијуму зависе од дужине трајања надражаја, врсте и броја микроорганизама, степена њихове вирулентности, као и способности организма да се одбрани од истих (27).

2.1.1.2.1. Хит шок протеини

Протеини топлотног шока (енгл. *Heat Shock Proteins*, HSPs) представљају групу протеина стреса који су пронађени 1974. године у винској мушици (*Drosophila melanogaster*) а присутни су у прокариотским и у еукариотским ћелијама (28, 29). Ови протеини чине око 5-10 % укупних ћелијских протеина, а у стресним ситуацијама могу бити заступљени и до 15 % (30).

Када су изложене широком спектру стреса прокариотске и еукариотске ћелије започињу убрзану синтезу хит шок протеина укључујући и хит шок протеине са високим степеном хомологије. Стресови који могу довести до повећане производње HSPs су: повишена температура, запаљење ткива, исхемија, хипоксија, вирусне и бактеријске инфекције, малигне трансформације. Осим тога и фактори околине (ултраљубичасто зрачење, радиоактивно зрачење, тешки метали) као и физиолошка стања (раст и диференцијација ћелија) али и лекови (цитостатици) могу такође утицати на стварање ових протеина у ћелијама (31, 32). HSPs се на основу молекулске тежине сврставају у пет великих фамилија: HSP-110, HSP-90, HSP- 70, HSP- 60 и мале HSP фамилије (32).

Основне функције хит шок протеина су да:

- 1) стабилизују основне структурне протеине,
- 2) помажу трансфер протеина кроз мембрану тако што мењају њихову конформацију,
- 3) помажу поновно савијање и заузимање исправне конформације денатурисаних протеина и

4) помажу деградацију аберантних протеина (33, 34).

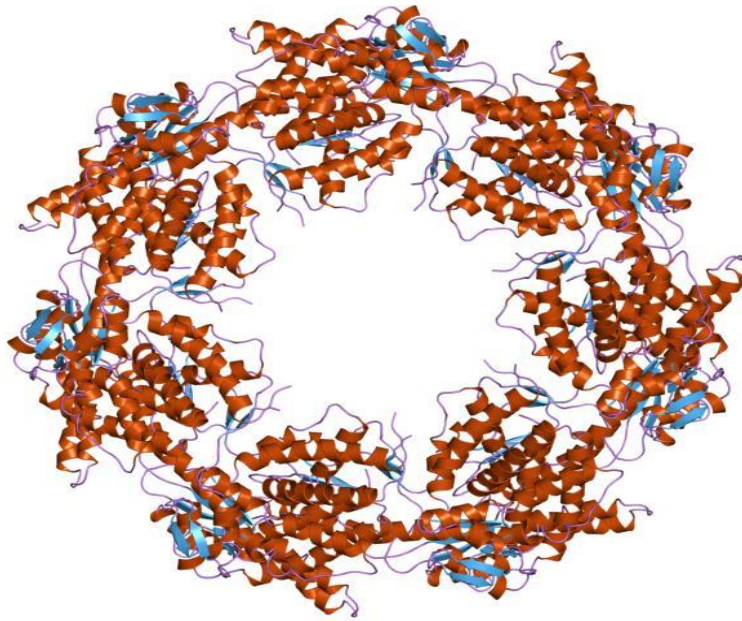
HSPs су важан део заштитног механизма ћелија који им помаже да преживе (35). Њихова синтеза се вишеструко увећава у ситуацијама када су ћелије изложене стресу, а сматра се да постоји повезаност између хит шок протеина и апоптозе (36).

Ови протеини имају улогу молекулских шаперона када се везују за друге протеине и спречавају погрешно савијање (енгл. *fold*ing) и агрегацију ново синтетисаних протеина и омогућавају исправно савијање и формирање функционалних тродимензионалних структура протеина (37). Такође, могу учествовати и у транспорту протеина до циљаног одредишта у ћелији (38).

Најважнији стимулус за продукцију HSPs је присуство оштећених протеина и протеинских агрегата у ћелији (39).

Осим тога што имају заштитну улогу, хит шок протеини представљају и снажне антигене, услед чега се висока хомологија између бактеријских и хуманих хит шок протеина сматра и фактором ризика за напредовање хроничних процеса и развоја молекулске мимикрије (40, 41).

Бактеријски шаперонин GroEL (синоним: Cpn60 и Hsp60) је широко распрострањен међу бактеријама. Овај шаперонин помаже у правилном савијању протеина у бактеријским ћелијама (44). Ген Cpn60 је означен као ДНК бар код за бактерије (45). Показано је да GroEL протеини, изоловани из различитих бактерија, стимулишу одговор имунског система и доприносе активацији лимфоцита (46). Такође, у неколико различитих студија показано је да GroEL протеини стимулишу производњу цитокина, који играју главну улогу у деструкцији ткива и ресорпцији кости код пародонталне болести (47,48).



Слика 1. Кристална структура бактеријског хит шок протеина GroEL (42)

2.1.2. Немикробни узрочници

Етиолошки фактори могу бити и хемијска средства која се користе за испирање и медијацију канала корена и непажљива примена средстава за девитализацију зуба као и механичке трауме пародонцијума.

Краткотрајна интензивна траума као што је ударац у зуб или фрактура зуба може прекинути циркулацију у апексу што има за последицу некрозу пулпе. Сама стерилна некроза пулпе није довољна за развој периапексне лезије, али познато је да је свако некротично ткиво у организму добра подлога за насељавање и развој микроорганизама. Транзиторном бактеријемијом некротично ткиво бива насељено микроорганизмима и тако настају услови за развој периапексних лезија и код оваквих зуба (6).

2.2. Класификације периапексних лезија

Класификација периапикалних лезија има за циљ њихово лакше препознавање, дијагностику и избор најбоље методе лечења. Основи за класификацију могу бити етиолошки, клинички, радиолошки и хистолошки.

Најпрецизнија класификација је свакако она заснована на патохистолошким критеријумима (49).

Wein-ова класификација је једна од најшире прихваћених (50):

- А. Периапексна остеосклероза (*Osteitis condensans*)
- Б. Почетни хронични апексни пародонтитис (*Incipient chronic apical parodontitis*)
- В. Узнапредовали хронични апексни пародонтитис (*Advanced chronic apical parodontitis*)
- Г. Периапексни гранулом (*Periapical granulom*)
- Д. Хронични периапексни апсцес (*Chronic periapical abscess*)
- Ђ. Периапексна циста (*Periapical cyst*)

Sratafore и сарадници (1990) деле периапексне лезије нешто другачије:

- Периапексни грануломи
- Радиксне цисте
- Периапексни ожиљци и
- Остале лезије (51).

2.3. Хистопатолошке карактеристике периапексних лезија

Грануломи, као најфреквентнија творевина продуктивног запаљења периапексног подручја, чине 45-93% апексних пародонтитиса, представљају позитивну одбрамбену реакцију организма на сталну иритацију штетним ноксама из канала корена и знак су да је успостављена равнотежа између организма и проинфламацијских материја пореклом из канала зуба (52).

У већини случајева настанак гранулома је последица удруженог дејства више фактора, али без обзира који је етиолошки фактор у питању периапексно ткиво реагује на исти начин-ресорпцијом кости и њеним замењивањем гранулационим ткивом. Гранулом у патолошко-анатомском смислу представља хроничну продуктивну инфламацију, без етиолошке и патогенетске специфичности, са ексудативном компонентом у средишту (53).

Ово хронично пролиферативно или продуктивно запаљење карактерише запаљенски инфилтрат, гранулације и фиброплазија. Запаљенски инфилтрат гранулома чине ћелије храничног запаљења: лимфоцити, плазмоцити, макрофаги, гранулоцити, а нешто ређе се сусрећу мастоцити и еозинофили (7). Основни ћелијски елементи који учествују у процесима пролиферације су локалне ћелије везивног ткива: фибробласти и фиброцити као и ендотелне ћелије. Пролиферисане локалне ћелије везивног ткива прво стварају ретикулинска влакна која сазревају у колагена и еластична влакна.

Ово везивно ткиво, богато капиларима и инфилтровано хроничним запаљењским елементима, означава се као гранулационо ткиво, због зрнастог изгледа површине настале као резултат пупљења крвних судова.

У зависности од доминације појединих компонената запаљења грануломи се деле на грануломатозне, фиброзне и ексудативне (54).

Хистолошки изглед типичне периапексне лезије представља у сваком тренутку перирадиксни инфламацијски процес од акутног примарног одговора до завршне фазе.

Периапексни грануломи се састоје од некротичне, ексудативне, грануломатозне и фиброзне зоне (50).

Зона некрозе (зона инфекције), представља простор који се налази око апексног форамена, испуњен некротичним садржајем. У овој зони су присутни неутрофилни леукоцити, лимфоцити и плазмоцити, мртве ћелије, распаднути фагоцити и продукти протеолизе. Уколико има и живих микроорганизама, онда се у овој зони налазе и егзотоксини, ендотоксини, антигени, бактеријски ензими и фактори хемотаксе.

Зона контаминације (зона ексудативне инфламације) је зона где токсични материјал пореклом из канала корена изазива дилатације капилара, а тиме и ексудацију и инфилтрацију ћелијама. Стимулацијом недиферентованих везивних ћелија настају вишеједарни остеокласти.

Зона иритације (зона пролиферативне инфламације) је зона богата младим гранулационим ткивом којег прожимају капилари и млади фибробласти, али и велики број одбрамбених ћелија. У овој зони су присутни плазмоцити што указује на то да се у овој зони стварају антитела, а запажају се и *Rassell*-ова телашца-увећани плазмоцити испуњени имуноглобулинима. Овде се налазе и лимфоцити, макрофаги, недиферентоване ћелије и хистиоцити. У овој зони нема микроорганизама, а многи грануломи могу садржати и острвца епитела.

Зона стимулације (зона продуктивне фиброзе– инкапсулације) је зона где активирани фибробласти продукују колаген у виду трака, формира се колагена капсула која цео запаљенски процес одваја од околне кости (50).

Гледајући према доминантним зонама лезија може бити класификована као: ексудативни, грануломатозни, грануломатозно-фиброзни и фиброзни гранулом. Ексудативне лезије карактерише изражена некроза и ексудација са интерстицијским едемом, што одговара акутној примарној лезији или периодима акутне егзацербације хроничног апексног пародонтитиса. Постоји велики полиморфизам основних хистолошких карактеристика периапексних гранулома који је последица различите дужине развоја процеса, специфичности одбрамбене

реакције домаћина и појаве акутне егзацербације процеса као последице накнадног деловања ноксе (56).

Око 50% хроничних лезија је епителизовано. Тада говоримо о епителним грануломима. Када је реч о пореклу епителних ћелија у периапексним грануломима сматра се да потичу од успаваних Маласезових (*Louis-Charles Malassez*) оштраца пореклом од остатака *Hertvig*-ове овојнице, која могу да мирују дуги низ година, док их инфламација у њиховом најближем суседству не подстакне на пролиферацију (57).

Ређе, епител у гранулому потиче од зида фистуле, или се уместо плочасто-слојевитог јавља трепљасте епител који води порекло из максиларног синуса (58).

Све компоненте периапексног гранулома потопљене су у међућелијску супстанцу. Она једним делом потиче од ткивне течности настале филтрацијом крвне плазме, а са друге стране настаје на рачун секретованих продуката везивних ћелија. Основна супстанца састављена је од мукополисахарида (гликозоаминогликани, протеогликани) чији главни део чини хијалуронска киселина и хондроитин сулфат (59).

Једна од првих патохистолошких промена које се уочавају током развоја периапексних лезија је деструкција екстрацелуларног матрикса услед деловања протеолитичких ензима. У патогенези хроничних периапексних лезија присутна су најмање четири механизма деструкције: остеокластни, фагоцитни, плазминоген-зависни и матрикс металопротеиназа-зависни механизам. Металопротеиназе су углавном одговорне за деструкцију највећег дела екстрацелуларног матрикса, а пре свега колагена, фибронектина, ламинина и протеогликана. Утврђено је присуство матрикс металопротеиназа-1 и -2 у зиду радикалне цисте (53,60).

Радиксне цисте су патолошке творевине које се развијају у коштаном ткиву око врха корена зуба са инфицираном пулпом (61). Инциденца радикалних цисти могла би бити испод 20% у односу на све периапексне лезије (62).

Настају под утицајем различитих патолошких нокси услед имунских реакција које покрећу пролиферацију ћелија. Наиме, сматра се да проинфламацијски цитокини и фактори раста могу да индукују пролиферацију Маласезових епителних остатака (63). Стимулуси за ову пролиферацију могу бити различити антигени пореклом од бактерија. У првој фази развоја радикалних циста пролиферишу епителне ћелија, при чему се ствара ирегуларна епителна маса. Исхрана централно постављених епителних ћелија је отежана па оне изумиру при чему настаје микропукотина обложена епителом (64). То представља другу фазу у развоју цисте и критичан моменат који води у трећу фазу развоја, а она представља раст микроцистичне пукотине и њен прелазак у радикалну цисту (65).

Радикалне цисте се састоје од омотача и течног садржаја. Омотач виличних циста састоји се од два слоја: унутрашњег, изграђеног од епителног ткива и спољашњег, изграђеног од везивног ткива.

Епителне ћелије формирају непрекидан низ који комплетно обухвата патолошку творевину сачињену од плочасто-слојевитог епитела без орожавања. Спољашњи зид је изграђен од везивног ткива. У субепителној зони присутни су плазмоцити, лимфоцити, макрофаги и гранулоцити. Код праве цисте, лумен је окружен фиброзним везивним ткивом које садржи инфилтрат инфламацијских ћелија карактеристичних за хроничну инфламацију (20).

Периапексне цисте се деле на праве цисте и цисте периапексног џепа (џепне цисте). Код праве цисте не постоји комуникација између лумена апексног отвора јер је лумен цисте потпуно затворен. Код џепне цисте лумен цисте је широко отворен према апикалном форамену (52).

Периапексни ожиљак је асимптоматска лезија у кости која је последица бикортикалних дефеката. Изграђен је од колагенизованог, хипоцелуларног фиброзног ткива (66).

Остале лезије које се могу јавити као периапексне промене су и различите бенигне и малигне лезије као што су: цемента-осеална дисплазија, осифицирајући фибром, остеобластом, плазмоцитом, одонтогени миксом, интракоштани лимфом, остеосарком и друге промене (66).

2.4. Патогенеза периапексних лезија

Иританси који потичу из инфицираног канала корена индукују инфламацију и стимулишу развој имунског одговора. У зависности од интензитета и трајања иритације и одговора домаћина, инфламацијске лезије могу имати акутни или хронични карактер, и рангирају се од незнатне инфламације до обимне ткивне деструкције (67).

2.4.1. Ћелије присутне у периапексним лезијама

У састав периапексног ћелијског инфилтрата у хроничном апексном пародонтитису улазе готово све ћелије урођене и стечене имуности (6). У ове ћелије спадају неутрофилни полиморфонуклеари (PMN), макрофаги, лимфоцити, плазмоцити и епителне ћелије (7). Мање заступљене, али функционално значајне, ћелијске популације представљају: мастоцити, еозинофилни гранулоцити, дендритске ћелије и *Natural Killer* (NK) лимфоцити (68). Поред ових ћелија и ћелије које чине нормалну структуру периапексног ткива (фибробласти, остеобласти и Маласезове епителне ћелије), играју значајну улогу у патогенези периапексних промена (4).

Ендодонтски простор, посебно у пределу апекса, је погодна средина за развој микроорганизама. Биолошки механизми деловања микроорганизама су вишеструки: покретање имунске реакције, митогени и хемотаксни ефекат, вазодилатација, хистолиза изазвана деловањем протеолитичких ензима. Као последица тих процеса, у периапексном ткиву се јавља хиперемија, венска стаза, едем, екстравазација неутрофилних PMN, моноцита и ограничена ресорпција кости (56).

2.4.1.1. Неутрофили

У периапексним лезијама PMN остварују своју заштитну функцију фагоцитозом и уништавањем микроорганизама. На овај начин већина микроорганизама бива убијена и елиминисана, чиме се спречава њихово даље ширење кроз ткиво. Међутим, цитоплазматске грануле неутрофила садрже и лизозомске ензиме који деградирају структурне елементе ткива и екстраћелиског матрикса, тако да полиморфонуклеарни леукоцити озбиљно оштећују ткиво домаћина (69). Активирани полиморфонуклеарни леукоцити продукују и многе инфламацијске медијаторе, као што су кисеонични радикали, простагландини, леукотриени, киселе и алкалне фосфатазе, катепсин, цитокине (2). PMN на месту акутне инфламације умиру у великом броју, тако да се сматра да је нагомилавање одумрлих неутрофила главни узрок ткивног оштећења у акутној фази апексних пародонтитиса (70).

2.4.1.2. Макрофаги

Макрофаги спадају у ћелије мононуклеарног фагоцитног система и воде порекло од моноцита који се, када напусте крвоток и доспеју у ткиво, диферентују у макрофаге. Када доспеју на место инфекције они остварују своју најзначајнију улогу а то је фагоцитоза микроорганизама. Поред фагоцитозе, макрофаги посредством проинфламацијских медијатора, различитих фактора раста, стимулишу миграцију лимфоцита, олакшавају адхезију леукоцита за ендотел капилара, стимулишу лимфоците и неутрофилне гранулоците, подстичу синтезу простагландина и протеолитичких ензима, стимулишу ресорпцију и инхибишу синтезу коштаног ткива. Поред тога, у периапексном ткиву макрофаги заједно са дендритским ћелијама спадају у антиген презентујуће ћелије (енгл. *Antigen Presenting Cells*, APC) (71) и играју веома важну улогу у развоју апексног пародонтитиса (72).

Макрофаги се могу поларизовати, у односу на стимулусе из окружења, у субпопулације М1 макрофага и М2 макрофага (73,74). Микробна компонента липополисахарид (LPS) доводи до активације макрофага у фенотип М1 док интерлеукин 4 (IL-4) може да индукује поларизацију макрофага у М2 макрофаге. М1 макрофаги су способни да производе проинфламацијске цитокине као што су IL-6, IL-12 и TNF. Супротно томе, М2 макрофаги су способни за антиинфламацијски одговор. У инфицираном ткиву макрофаги се прво поларизују на проинфламацијски М1 фенотип да би помогли домаћину у борби против патогена. Касније се макрофаги поларизују, како би створили антиинфламацијски одговор, на М2 фенотип и репарирали оштећено ткиво (75).

Макрофаге могу да активирају микроорганизми, њихови продукти (LPS), хемијски медијатори и стране партикуле. Они такође презентују антигене Т-лимфоцитима што је праћено активацијом Т лимфоцита (76). Преко проинфламацијских медијатора, различитих фактора раста, стимулишу миграцију лимфоцита. Активисани макрофаги представљају извор цитокина одговорних за ресорпцију кости (77). У оквиру ових медијатора, претпоставља се да IL-1 и IL-8 играју значајну улогу у патогенези периапексних лезија (78).

Поред LPS-а, и хит шок протеини могу активирати макрофаге на продукцију цитокина (79, 80).

Lukic и сар. су у својој студији нашли значајно већи број макрофага у лезијама у којима су доминирали Т лимфоцити у односу на В лимфоците. Такође, нису забележили значајну разлику у броју макрофага код симптоматских и асимптоматских лезија (81).

2.4.1.3. Лимфоцити

Постоји три основне врсте лимфоцита: Т лимфоцити, В лимфоцити и урођено убилачке ћелије (енг. *Natural Killer cells*, NK). Т и В лимфоцити су једине ћелије са високо специфичним рецепторима за антиген и из тог разлога су главни медијатори стечене имуности (82).

Т и В лимфоцити су важни у развоју периапексних лезија. У периапексним лезијама постоји висок степен хетерогености запаљенских инфилтрата, као и стална склоност ка промени њиховог састава и структуре, што се доводи у везу са прогресијом болести. Т и В лимфоцити представљају доминантне ћелијске компоненте у периапексним лезијама (83).

Gazivoda и сар. су у својим истраживањима нашли да лимфоцити и плазмоцити чине око 60% инфилтришућих ћелија, затим следе неутрофили са 20%, мононуклеарни моноцити (око 10%), док су мастоцити присутни у веома малом проценту (испод 5%) (84).

Akamine и сар. у својим студијама доказују да у почетним фазама развоја периапексних лезија доминирају Т лимфоцити, док су В лимфоцити доминантни у манифестним фазама развоја периапексних лезија. Тиме су указали да реакције хуморалне имуности имају значајну улогу у каснијим фазама развоја болести (85).

Lukić и сар. су имунохистохемијском анализом показали да Т лимфоцити предоминирају у дифузним мононуклеусним инфилтратима, док су В лимфоцити бројнији у фокалним. Квантитативном анализом ћелија методом индиректне флуоресценције показано је да су CD8⁺ Т лимфоцити заступљенији у дифузним инфилтратима, нарочито у грануломима са пролиферишућим епителом, док су CD4⁺ Т лимфоцити бројнији у фокалним. Уочена је доминација CD4⁺ у односу на CD8⁺ лимфоците у раним стадијумима болести, као и обрнута пропорција ових ћелија у касним фазама (82, 86).

2.4.1.3.1. Т лимфоцити

Т лимфоцити су ћелије целуларне имуности које одговарају на антиген.

Деле се у две велике групе, то су помагачки Т лимфоцити (CD4⁺) и цитотоксички Т лимфоцити (CD8⁺).

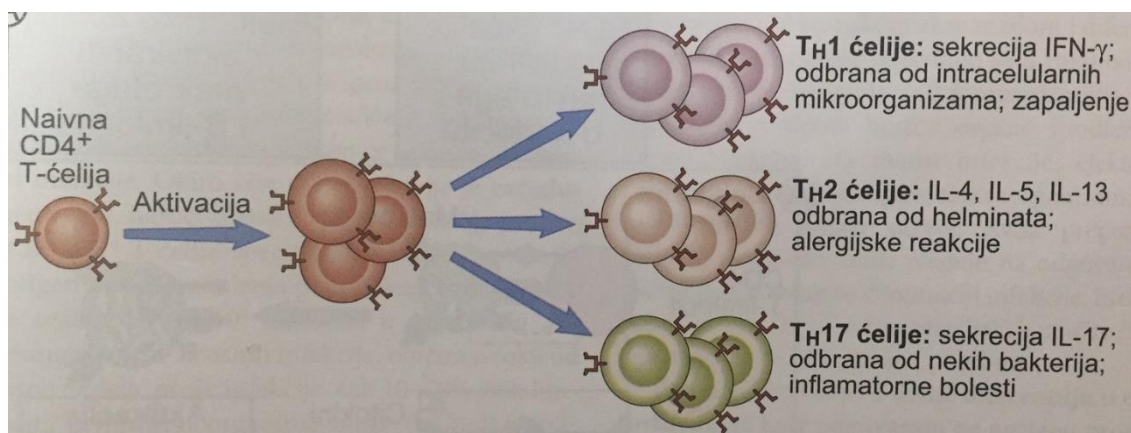
T лимфоцити чине најбројнију популацију инфламацијских ћелија у периапексним лезијама. T лимфоцити су најчешће дифузно распоређени по читавом пресеку ткива, ређе у облику лимфних агрегата. Број T лимфоцита је знатно већи у фокалним него у дифузним инфилтратима (87). Нема значајне разлике у броју T лимфоцита код симптоматских и асимптоматских лезија (68,87).

У раним фазама развоја периапексних лезија постоји доминација CD4⁺ у односу на CD8⁺ лимфоците, а током развоја болести долази до инверзије овог односа. То значи да на почетку болести, када је присутна прогресија инфламације и деструкција кости имамо повећано присуство CD4⁺ лимфоцита, док CD8⁺ лимфоцити доминирају у каснијој фази где испољавају своје ефекте и повезани су са стабилизацијом периапексне лезије (88).

Rodini и Lara повезују индекс CD4/CD8 са типом хроничне периапексне лезије. Они су у својој студији показали разлику у структури запаљенског инфилтрата између радикалних циста и периапексних гранулома, и указали на значајно већи број CD4⁺ ћелија у цистама него у грануломима (89).

2.4.1.3.1.1. Th- лимфоцити

Помагачки CD4⁺ T лимфоцити (Th) током активације могу да диферентују у субпопулације ефекторских ћелија које производе различите цитокине и обављају различите функције. То су Th1, Th2, Th17 и Treg (регулаторни T лимфоцити).



Слика 2. Th- лимфоцити (преузето из Abbas и Lichtman, 2006-2007).

Th1 лимфоцити стимулишу фагоците да појачано уносе и убијају патогене што представља кључну компоненту целуларне имуности током инфламацијске реакције. Најважнији цитокин који производе Th1 ћелије су IL-2 и интерферон- γ .

Th2 лимфоцити стимулишу имунски одговор посредован еозинофилима. У контакту са антигеном ови лимфоцити секретују IL-4, IL-5 и IL-13 који стимулишу продукцију антитела IgE класе (4). Такође, смањују штетне последице које на ткиво остављају активирани макрофаги.

Th17 лимфоцити секретују цитокине IL-17 и IL-22 и представљају кључне медијаторе запаљења у многим инфламацијским реакцијама.

Развој Th1, Th2 и Th17 популације стимулишу сигнали које наивне Th лимфоцити добијају у контакту са APC. Када дођу у контакт са антигеном, макрофаги и дендриске ћелије продукују цитокин IL-12, а NK ћелије продукују IFN- γ . Т-ћелије су сада изложене цитокинима IL-12 и IFN- γ што подстиче диференцијацију у Th-1 субпопулацију.

2.4.1.3.2. В лимфоцити

В лимфоцити су носиоци хуморалне имуности. Након примања сигнала од стране антигена и Th₂ ћелија, неки од В лимфоцита се трансформишу у плазмоците који производе и секретују антитела. У организму постоји пет класа антитела тј. имуноглобулина и то: IgA, IgG, IgM, IgE и IgD. Међусобно се разликују по структури и функцијама.

Хуморална имунска реакција је од великог значаја за развој периапексних лезија (93).

У периапексним грануломима се могу наћи *Russell*-ова телашца. Она представљају сиво бела или црвена телашца округлог или овалног облика, нађена најчешће у подручјима богатим плазмоцитима. Она су углавном смештена у зони

зрелог гранулационог ткива и колагених влакана, док су у младом гранулационом ткиву веома ретка (94).

У грануломима је најзаступљенија класа IgG имуноглобулина, затим IgA, а знатно мање IgM у плазмоцитима и екстрацелуларно (95).

Имуноглобулини су доказани и у плазмоцитима пореклом из зида периапексних циста (93, 97) и у цистичној течности при чему је концентрација IgG у цистичној течности неколико пута већа него у серуму (98).

Уколико су у периапексним лезијама присутни мастоцити и плазмоцити који продукују имуноглобулин Е (IgE), реакције посредоване IgE могле би играју важну улогу у покретању и напретку периапексне лезије (9).

Када се антиген (бактерија или њен продукт) веже за IgG или IgM настаје комплекс антиген-антитело који се везује за тромбиците и индукује ослобађање вазоактивних амина, повећава се пермеабилноста крвних судова и стимулише хемотакса неутрофиних гранулоцита (99).

Иако је специфичност антитела присутних у апексном пародонтитису мала, специфична моноклонска компонента може учествовати у антимикробном одговору и чак интензивирати патогени процес формирањем комплекса антиген-антитело (100).

2.4.1.4. Остеокласти

Једна од основних патолошких промена која се дешава у периапексним лезијама јесте деструкција кости. Она је последица активације остеокласта. Остеокласти су мултинуклеарне гигантске ћелије, које воде порекло од плурипотентне матичне ћелије хематопоезе и припадају моноцит/макрофагној линији (101). Проостеокласти као моноцити мигрирају кроз крв до перирадиксних ткива и везују се за матрикс кости. Они остају у фази мировања све док од одонтобласта не добију сигнал за пролиферацију (101).

Њихова диференцијација, као и њихова функција је под контролом различитих фактора. Два таква фактора су RANK (енгл. *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B*, RANK) и његов лиганд (RANKL). Они стимулишу формирање остеокласта као и остеопротегерин (OPG) који делује као „рецептор-мамац“ за RANKL који негативно регулише остеокластогенезу (102). Рецептор за RANKL је RANK, локализован је на површини остеокласта (103).

Када преостеокласти добију сигнал, спаја се више ћерки ћелија, при чему се формирају мултиједарни остеокласти који се фиксирају за коштани матрикс и стварају таласасту или назубљену структуру (енгл. *ruffled border*), која се назива заптивна зона (енгл. *sealing zone*) (104). Цитоплазматска граница остеокласта у контакту са коштаном површином постаје наборана, а ресорпција кости настаје испод ове границе које се назива суб-остеокластна област ресорпције. На површинском контакту остеокласта и матрикса, екстрацелуларно, се дешава деструкција кости. Тада се раствара минерална фазе тј. јавља се деминерализација која је резултат киселе микросредине и ензимског растварања органског матрикса (105).

Како би процес ремоделовања кости био у физиолошким границама, мора постојати баланс између остеобласта и остеокласта. До дисбаланса може доћи под утицајем различитих бактеријских компоненти, деривата арахидонске киселине, проинфламацијских цитокина, комплекса антиген-антитело (106).

У деривате арахидонске киселине спадају простагландини, леукотриени и тромбосани. Простагландини имају врло важну улогу у процесу запаљења у периапексним лезијама јер повећавају вазодилатацију и пропустљивост крвних судова, учествују у ресорпцији кости, повећавају хемотаксу и бол. Сматра се да простагландин E_2 активира остеокласте и индукује масивну ресорпцију кости, а леукотриени B_4 и C_4 стимулишу снажну хемотаксу неутрофила у акутним фазама периапексних лезија (107).

Када у апексном пародонцијуму постоји континуирано присуство штетне ноксе, изражени су ефекти многих медијатора запаљења, пре свега проинфламацијских

цитокина, који активацијом RANKL-а за резултат имају интензивну остеокластогенезу.

У току развоја периапексних лезија, поред ресорпције кости, може доћи и до деструкције тврдых зубних ткива. Ресорпцију цемена и дентина у периапексним лезијама врше одонтокласти, који припадају истој ћелиској популацији као остеокласти (108).

2.4.1.5. Епителне ћелије

У периапексним лезијама се налазе епителне ћелије које настају пролиферацијом *Malessez*-ових епителних острваца пореклом од *Hertwig*-ове овојнице. Ове епителне ћелије пролиферишу под утицајем цитокина и фактора раста. Сматра се да је код око 30-52% периапексних лезија присутна епителна пролиферација (20).

2.4.2. Медијатори у хроничним периапексним лезијама

Цитокини су полипептиди мале молекулске масе (обично испод 30 kDa) које секретују различите ћелије. Они укључују велики број једињења: интерлеукине, интерфероне, цитотоксичне факторе и факторе раста. Интерлеукини су функционални цитокини за које се сматра да су главни посредници у запаљенском одговору. Њихови локални ефекти укључују појачану адхезију леукоцита на ендотелне зидове, стимулацију лимфоцита, потенцијацију неутрофила, производњу простагландина и протеолитичких ензима, појачану ресорпцију кости и инхибицију формирања костију (109).

2.4.2.1. Проинфламацијски цитокини

На месту запаљења се ослобађају различити медијатори запаљења, укључујући проинфламацијске цитокине. Проинфламацијски цитокини имају значајну улогу у патогенези хроничних периапексних лезија (110). У проинфламацијске цитокине спадају IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и TNF- α .

Интерлеукин-1 је проинфламацијски цитокин који у периапексним лезијама у највећој мери продукују макрофаги. Осим макрофага, продукују га полиморфонуклеарни леукоцити и фибробласти (111). Макрофаги продукују IL-1 након контакта са бактеријама и бактеријским липополисахаридима. Постоје две форме IL-1, то су IL-1 α и IL-1 β , оба облика имају сличне биолошке активности али се сматра да је IL-1 β много ефикаснији у подстицању ресорпције кости (57). IL-1 β је доминантна форма доказана у хуманим периапексним лезијама и њиховим ексудатима (112), док је IL-1 α примарно укључен у настанак апексних пародонтитиса код пацова (113).

INF- γ , кога продукују Th1 ћелије, представља снажан активатор макрофага и регулише експресију IL-1 и TNF- α . IL-1 може да индукује сопствену продукцију, али и продукцију других цитокина (IL-2, IL-6), као и да изазове бол и инфламацијске реакције (117). TNF- α такође индукује продукцију IL-1 (4).

IL-1 повећава ресорпцију кости и инхибише стварање нове кости (114,115,116), активира и продукцију простагландина и протеолитичких ензима (111). Инхибицијом и IL-1 и TNF- α заједно, постиже се знатно смањење прогресије запаљења кости, остеокластогенеза и деструкција пародонталног ткива (116, 119).

IL-1 повећава адхезију леукоцита за зидове ендотела, и стимулише лимфоците и неутрофиле (117).

Истраживања Wang-а и сар. указују да IL-1 стимулише пролиферацију фибробласта и индукују стварање гранулома (118).

Интерлеукин-6 (IL-6) је цитокин који утиче на антиген-специфичне имунске одговоре и инфламацијске реакције и игра улогу и проинфламацијског и

антиинфламацијског цитокина (120). Заједно са TNF- α и IL-1, припада групи главних проинфламацијских цитокина. Истраживања показују да IL-6 продукују моноцити, макрофаги, Th-2 лимфоцити, активирани В лимфоцити и полиморфонуклеарне ћелије (121).

Ћелије продукују IL-6 под утицајем IL-1, TNF- α и INF- γ , али, он истовремено регулише секрецију IL-1 и супроставља се неким његовим ефектима. Сматра се да управо инхибицијом ефеката цитокина TNF- α и IL-1 он испољава своју антиинфламацијску активност (122). Улога IL-6 у развоју хроничних периапексних лезија може бити повезана са његовим антиинфламацијским својствима (123).

IL-6 повећава коштану ресорпцију јер стимулише формирање остеокластних прекурсора и повећава број остеокласта *in vivo* (124), а делујући синергистички са IL-1 повећава и секрецију простагландина (125).

Интерлеукин 8 (IL-8) је хемокин који је један од главних посредника инфламаторног процеса. Имају улогу у миграцији ћелија на место инфекције. Ослобађају их макрофаги при контакту са антигеном, чиме дају сигнал неутрофилима да дођу на место инфекције. Могу га секретовати макрофаги и фибробласти под утицајем IL-1 β и TNF- α , као и епителијалне ћелије. Има улогу проинфламацијског цитокина (126).

Интерлеукин 12 (IL-12) производе дендритске ћелије, макрофаге и В-лимфоцити услед антигенске стимулације. IL-12 учествује у диференцијацији наивних Т ћелија у Th ћелије које се даље развијају у Th1 ћелије или Th2 ћелије. Он је познат као стимулишући фактор Т ћелија, који може да стимулише њихов раст и функцију (127).

Интерлеукин 23 (IL-23) је члан IL-12 породице цитокина са проинфламацијским својствима. Истраживања показују да је IL-23 кључни учесник у регулацији ћелијских механизма укључених у инфламацију (128).

Фактор некрозе тумора (TNF) је проинфламацијски цитокин са директним цитотоксичним ефектом на одређене ћелије. TNF- α представља моћан цитокин кога стварају макрофаги, фибробласти, моноцити, Т и В лимфоцити. Велике

количине овог цитокина се ослобађају под утицајем бакатеријских продуката и IL-1(122,129).

TNF- α обавља мноштво функција, а већина ћелија у организму реагује неким одговором на стимулацију овим цитокином. На макрофаге делује тако што стимулише фагоцитозу и продукцију IL-1 и простагландина E₂. Он активира и Т и В лимфоците, НК ћелије и индукује ослобађање протеина, цитикина и хемокина (130).

Поред тога што стимулише стварање осталих цитокина (IL-1, IL-6, IL-8), посредује у каскади цитокина који узрокују упалу и деструкцију кости, преко рецептора који су локализовани на макрофагима или у ћелијама синовијалне мембране (130). TNF- α пореклом из макрофага и TNF- β пореклом од лимфоцита (лимфотоксин) испољавају бројне системске и локалне ефекте, сличне онима које испољава IL-1 (4). TNF је једини молекул, поред IL-1 који поседује функцију остеокластне активације. Он индукује ослобађање калцијума из кости *in vitro* и може играти значајну улогу у различитим стадијумима инфламацијских обољења укључујући ресорпцију кости. Раније студије су показале да су проинфламацијски цитокини као рецептор активатор NF- κ B (RANKL) лиганда и TNF- α чланови TNF супер фамилије кључни медијатори у патогенези хроничне запаљенске болести, укључујући пулпитис и апексне пародонтитисе. TNF- α заједно са RANKL-ом олакшава ресорпцију кости посредством активације остеокласта (131,132).

TNF- α има одређени значај у развоју хроничних периапексних лезија. Присуство TNF- α је доказано у хуманим апексним пародонтитисима и ексудатима из канала корена зуба са апексним пародонтитисима (130).

2.4.2.2. Th1- проинфламацијски цитокини

Интерферони су протеини који имају антимикуробну, имуномодулаторну, антипролиферативну функцију. То су цитокини који бране организам и повећавају отпорност ћелија на вирусну инфекцију. За стварање интерферона

потребан је индуктор који је најчешће вирус, а произвођач је хумана ћелија. IFN утичу на регулацију ћелијске функције као што је фагоцитоза, али и повећавају цитотоксичност Т лимфоцита, као и активност макрофага и НК- ћелија (4).

Код човека постоје три изоформе IFN, а то су: алфа, бета и гама. У зависности која га ћелија производи IFN делимо на IFN- α којег стварају леукоцити, IFN- β којег стварају фибробласти, IFN- γ којег стварају ћелије имунског система.

С обзиром да IFN- γ игра главну улогу у активацији макрофага (135), овај цитокин може имати значајну улогу у првој линији одбране од бактеријске инфекције у периапексном ткиву. Они имају улогу у регулацији продукције проинфламацијских цитокина, IL-1 и TNF- α , и у активацији ефекторских Т лимфоцита у периапексним лезијама (134).

Овај цитокин је укључен у позитивну повратну спрегу активације моноцитно-макрофагног система. Наиме, макрофаги и дендритске ћелије презентују антигене CD4⁺ Т лимфоцитима, који продукују IFN- γ и на тај начин додатно стимулишу и активирају моноцитно-макрофагне ћелије.

2.4.2.3. Th2-цитокени

Th2 лимфоцити стимулишу имунски одговор посредован еозинофилима. Ове ћелије синтетишу IL-4, IL-5 и IL-13 који супримирају имунски одговор посредован Th1 лимфоцитима.

Интерлеукин 4 (IL-4) има улогу у покретању диференцијације Th2 лимфоцита од наивних CD4⁺ прекурсора, стимулише В лимфоците да продукују IgE и супримира функције макрофага које зависе од IFN- γ (136).

Интерлеукин 5 (IL-5) продукују Th2 лимфоцити и активирани мастоцити. Овај цитокин стимулише раст и диференцијацију еозинофила и активира зреле еозинофиле.

Интерлеукин 13 (IL-13) делује на фибробласте тако што подстиче синтезу колагена и фиброзу.

2.4.2.4. Th17 - цитокини

Th17 лимфоцити продукују медијаторе који привлаче неутрофиле и моноците, на тај начин се повећава број инфламацијских ћелија у жаришту инфекције и поспешује се запаљенски одговор. Сматра се да Th17 лимфоцити могу бити укључени у одбрану од неких бактеријских и гљивичних инфекција. Ефекторске Th17 ћелије су доминантно локализоване у инфламираном ткиву (135).

IL-17 је цитокин који углавном ствара Th17 субпопулација CD4⁺ помагачких Т лимфоцита. IL-17 је проинфламацијски цитокин и сматра се да може имати важну улогу у егзацербацији периапексних лезија. У свом истраживању Gazivoda и сар. су детектовали IL-17 у свим културама ћелија изолованих из периапексних лезија, а знатно већа концентрација је уочена у симптоматским лезијама што је у складу са повећаним присуством неутрофила. Такође су показали да је продукција IL-17 значајно већа у културама полиморфонуклеарних ћелија (PMN) него у културама мононуклеарних ћелија изолованих из периферне крви (136).

2.4.2.5. Антиинфламацијски цитокини

IL-10 је цитокин који стварају активирани макрофаги и неки помагачки Т-лимфоцити. Главна функција овог цитокина је да инхибира активирани макрофаге и тиме одржи контролу урођене и ћелијске имуности (109).

Проинфламацијски механизми који су присутни у периапексним лезијама за резултат имају значајно оштећење ткива, због чега је неопходно да буду

контролисани имунорегулацијским механизмима. Најважнији имунорегулацијски цитокини су TGF- β и IL-10 (137). То су цитокини који супресијом имунског одговора такође подстичу оздрављење ткива (138). Проинфламацијски механизми доминирају у симптоматским периапексним лезијама, док је доминација продукције имунорегулацијских цитокина карактеристична за асимптоматске периапексне лезије. Истраживања бројних аутора указују на њихово присуство у периапексним лезијама (139).

Ћелије које у највећој мери у периапексним лезијама продукују IL-10 су В и Т лимфоцити, фибробласти и макрофаги (140).

3. ЦИЉ РАДА

Циљ ове студије је да се утврди експресија бактеријског *heat shock* протеина GroEL (HSP60 или Crp60) у периапексном ткиву добијеном од особа са периапексним лезијама и квантитативно одреди ниво проинфламацијских цитокина које продукују ћелије урођене имуности (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α), антиинфламацијског цитокина (IL-10), цитокина које продукују Th1 (IFN- γ) и Th2 лимфоцити (IL-4, IL-5, IL-13) и утврди корелација између експресије бактеријског *heat shock* протеина и нивоа одређених група цитокина.

У складу са основним циљем дефинисани су и конкретни експериментални задаци:

1. Утврдити експресију бактеријског *heat shock* протеина GroEL у ткиву периапексних лезија.
2. Утврдити експресију цитокина у ткиву периапексних лезија.
3. Испитати корелацију између експресије проинфламацијских цитокина урођене имуности (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) и хит шок протеина.
4. Испитати корелацију између експресије Th1 цитокина (IFN- γ) и хит шок протеина.
5. Испитати корелацију између експресије Th2 (IL-4, IL-5 и IL-13) и антиинфламацијског цитокина IL-10 и бактеријског хит шок протеина.
6. Испитати повезаност између присуства бактеријског GroEL експримираних цитокина и хистопатолошких карактеристика периапексних лезија.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Популација која се истражује. Узорци периапикалих лезија (n=40) узети су од особа старости од 18 до 65 година код којих је на основу анамнестичких података, клиничке слике и анализе рендгенског снимка дијагностикована периапексна лезија. Узорци ткива су узимани приликом екстракције зуба или апексне хирургије. Контролни узорак (n=10) је чинило здраво периапексно ткиво које је узето приликом екстракције здравих зуба из ортодонтских разлога. Сви испитаници били су без системских обољења и без антибиотске терапије у протеклих месец дана.

Узорковање. Испитаници са периапексним лезијама су у студију укључени из укупне популације пацијената који се лече на Оралној хирургији, Медицинског факултета у Косовској Митровици, након прегледа оралног хирурга. Контролна група је селектована након прегледа ортодонта и постављања индикације за екстракцију зуба. Укључивање свих узорака је спроведено сукцесивно, према принципу природног узорка.

Након екстракције зуба периапексне лезије су стерилним скалпелом одстрањене са врха корена зуба, док је приликом апексне хирургије узорак периапексне лезије узиман уклањањем периапексне лезије киретом. Узорци су испрани стерилним физиолошким раствором, просушени на стерилној вати. Ткиво је подељено на два једнака дела (141). Први део који је чуван у стерилној пластичној посуди у раствору RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) на -20°C коришћен је за изолацију РНК. Трећи део је потапан у 10% формалин, калушљен и коришћен за хистопатолошку анализу.

Хистопатолошка анализа периапексног ткива. За хистопатолошку анализу коришћени су формалином фиксирани и парафином укалушљени узорци периапексног ткива. Од парафинских калупа прављени су пресеци дебљине 5 μ m

који су обојени хематоксилином и еозином и коришћени за идентификацију типа лезије (циста или гранулом).

Изолација РНК из ткива. Укупна РНК из ткива периапексних лезија изолована је употребом тризол реагенса. Изоловано ткиво је механички хомогенизовано у 1 ml тризола помоћу ручног хомогенизатора. Хомогенат је затим инкубиран 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. На супернатант је затим додато 100 µl бромхлорпропана, узорци су вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања јасно су се раздвојила три слоја, горњи провидни слој, у којем се налази РНК који је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изопропил алкохола чиме се преципитира РНК. Након инкубације 15 минута на собној температури узорци су центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на +4°C. Талог из епрувета је опран два пута са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола и потом је сушен 2 до 5 минута на собној температури. Талог је на крају растворен у води која не садржи нуклеазе.

Реверзна транскрипција РНК у комплементарну ДНК. Укупна РНК (~2µg) је уз помоћ реверзне транскриптазе преписана у комплементарну ДНК и то коришћењем *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-a* (*Thermo Fisher Scientific*).

Квантификација експресије гена. Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија гена од интереса. Реакција qRT-PCR је обављена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у 96-коморним плочама коришћењем *Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*). Специфични прајмери приказани су у Табели 1. Компаративном СТ методом (ΔΔСТ) одређена је релативна квантификација експресије циљног гена (citoкина и бактеријског GroEL) у односу на експресију референте контроле, GAPDH. За детекцију бактеријског протеина топлотног стреса, GroEL (који се означава и као HSP60 и Cpn60) коришћена су два прајмера која се користе за детекцију бактеријске

контаминације и у материјалу хуманог порекла и у окружењу (142. 143) од којих је један у даљем тексту означен као GroEL, а други као HSP60.

Табела 1. Прајмери коришћени за *Real-Time* qRT-PCR

циљни ген	Секвенце
IL-1 β	5'-AAGCTGATGGCCCTAAACAG -3' 5'-AGGTGCATCGTGCACATAAG -3'
IL-6	5'-CCAGCTATGAACTCCTTCTC - 3' 5'-GCTTGTTCCCTCACATCTCTC - 3'
IL-12 p40	5'-CCAAGAACTTGCAGCTGAAG- 3' 5'-TGGGTCTATTCCGTTGTGTC- 3'
IL-23 p35	5'-GATGAGCTGATGCAGGCC- 3' 5'-AGTCCTCCACCTCGTTGTCCGTGA- 3'
TNF- α	5'-CCAGGCAGTCAGATCATCTTC- 3' 5'-GTTATCTCTCAGCTCCACGC- 3'
IL-13	5'-GAG TGT GTT TGT CAC CGT TG-3' 5'-TAC TCG TTG GTC GAG AGC TG-3'
IL-4	5'-ATT TCT CTC TCA TGA TCG TC-3' 5'-GGA CAC AAG TGC GAT ATC ACC-3'
IL-10	5'-ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCA-3' 5'-TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA-3'
IL-5	5'-GCTTCTGCATTTGAG-TTTGCTAGCT-3', 5'-TGGCCGTCA-ATGTATTTCTTTATTAAG-3';
IFN- γ	5'-CTTTAAAGATGACCAGAGCATCCA-3', 5'-ATCTCGTTTCTTTTTGTTGCTATTGA-3',

bacterial cpn60 (GroEL)	<i>H279: GAIIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC</i> <i>H280: YKIYKITCICCRAAICCIGGIGCYTT</i>
bacterial cpn60 (HSP60)	<i>[6-FAM]CCTTCTTTACCGACTTTITCCATCGCTT[TAMRA]</i> <i>[6-FAM]CCTTCTTTRCCMACTTTMTCCATCGCTT[TAMRA]</i>
GAPDH	<i>5'-TGGAAGGACTCATGACCACA-3'</i> <i>5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'</i>

СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Зависно од типа варијабли дескрипција података приказана је као n (%) или медијана (опсег, мин-мах). Од метода за тестирање статистичких хипотеза коришћен је Mann-Whitney test. Од метода за анализу повезаности примењен је Spearmanов коефицијент корелације рангова.

Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности (алфа ниво) од 0,05.

Резултати су приказани табеларно и графички. Сви подаци су обрађени у IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) софтверском пакету.

5. РЕЗУЛТАТИ

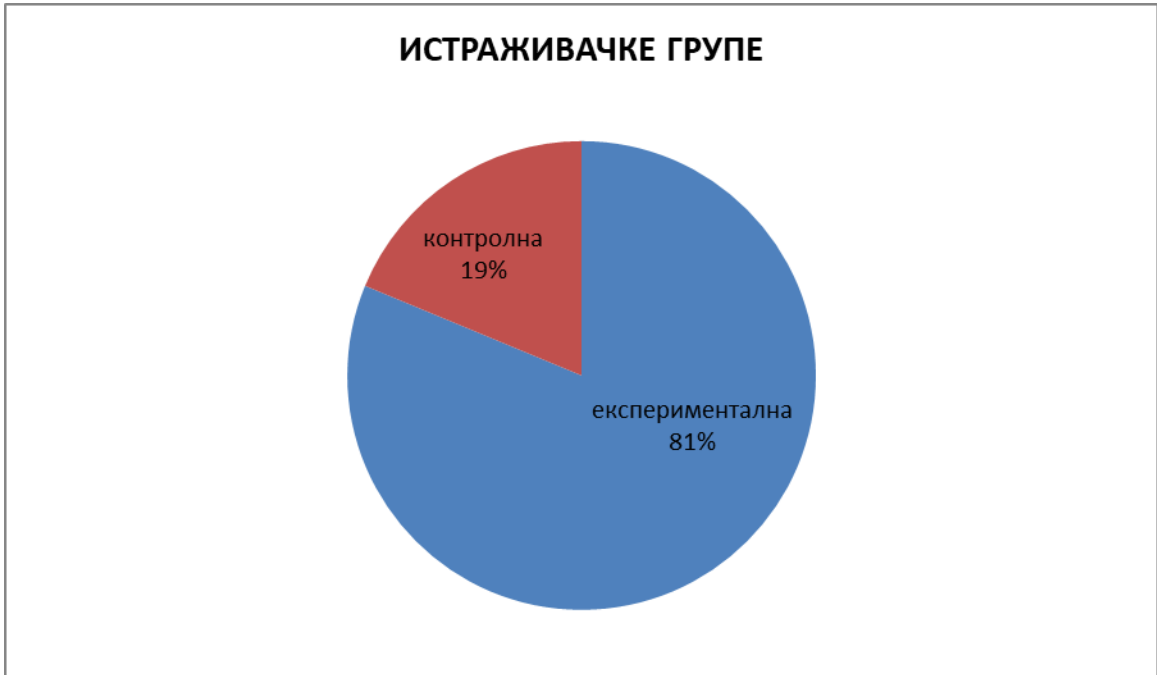
ИСТРАЖИВАЧКЕ ГРУПЕ

Табела 2. – Структура испитаника у истраживању

Истраживачка група	N	%
Експериментална	39	81,25
Контролна	9	18,75
Укупно	48	100,0

У истраживање је укључено 40 испитаника који су подвргнути третману (експериментална група) и 10 контролних испитаника (контролна група).

По један испитаник из сваке групе је изгубљен током трајања истраживања па у анализу улази 39 (81,25%) експерименталних и 9 (18,75%) контролних испитаника.



Графикон 1. – Структура испитаника у истраживању

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА - ПОЛНА СТРУКТУРА

Табела 3. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према полу

Полна структура	n	%
Мушки	17	43,6
Женски	22	56,4
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање, мушког пола било је 43,6%, а женског 56,4%.



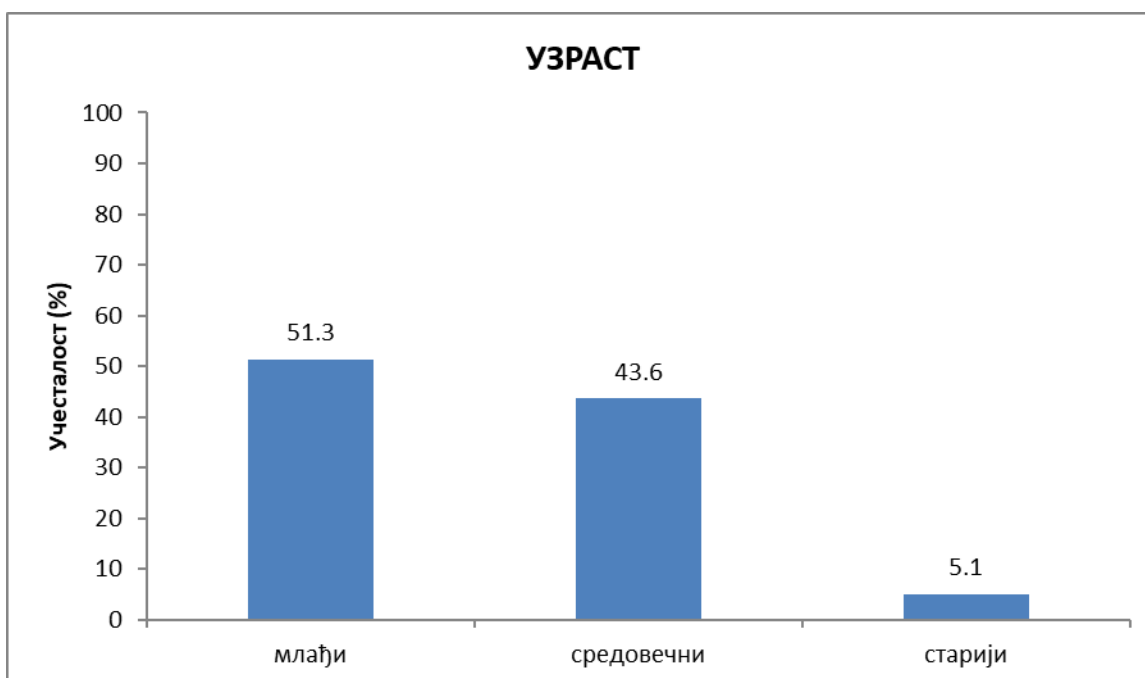
Графикон 2. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према полу

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – УЗРАСТ

Табела 4. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према узрасту

Узраст	n	%
млађи	20	51,3
средовечни	17	43,6
старији	2	5,1
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање према узрасту, млађих је било 51,3%, средовечних 43,6%, а старијих је било 5,1%.



Графикон 3. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према узрасту

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – ЕНДОДОНТСКИ ТРЕТМАН

Табела 5. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према ендодонтском третману зуба

Ендодонтски третман	n	%
Да	10	25,6
Не	29	74,4
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање, ендодонтском третману је било подвргнуто 10 (25,6%) испитаника.



Графикон 4. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према ендодонтском третману зуба

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – ЛОКАЛИЗАЦИЈА ЛЕЗИЈЕ

Табела 6. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према локализацији лезије

Локализација лезије	n	%
Фронтални	16	41,0
Премолари	7	17,9
Молари	16	41,0
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање према локализацији лезије, локализација лезије је подједнако била заступљена код фронталних и молара (по 41,0%), док је 17,9% испитаника локализацију лезије имало на премоларима.



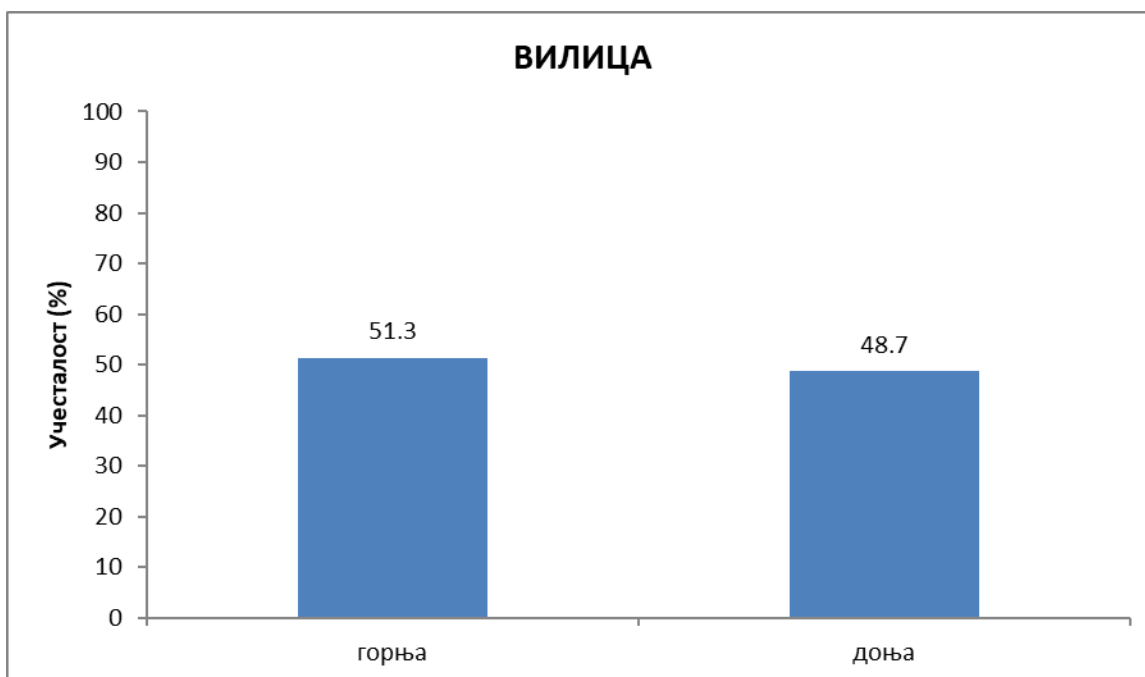
Графикон 5. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према локализацији лезије

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – ВИЛИЦА

Табела 7. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према вилици

Вилица	n	%
Горња	20	51,3
Доња	19	48,7
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање према вилици, горња је била заступљена код 51,3%, док је доња била заступљена код 48,7%.



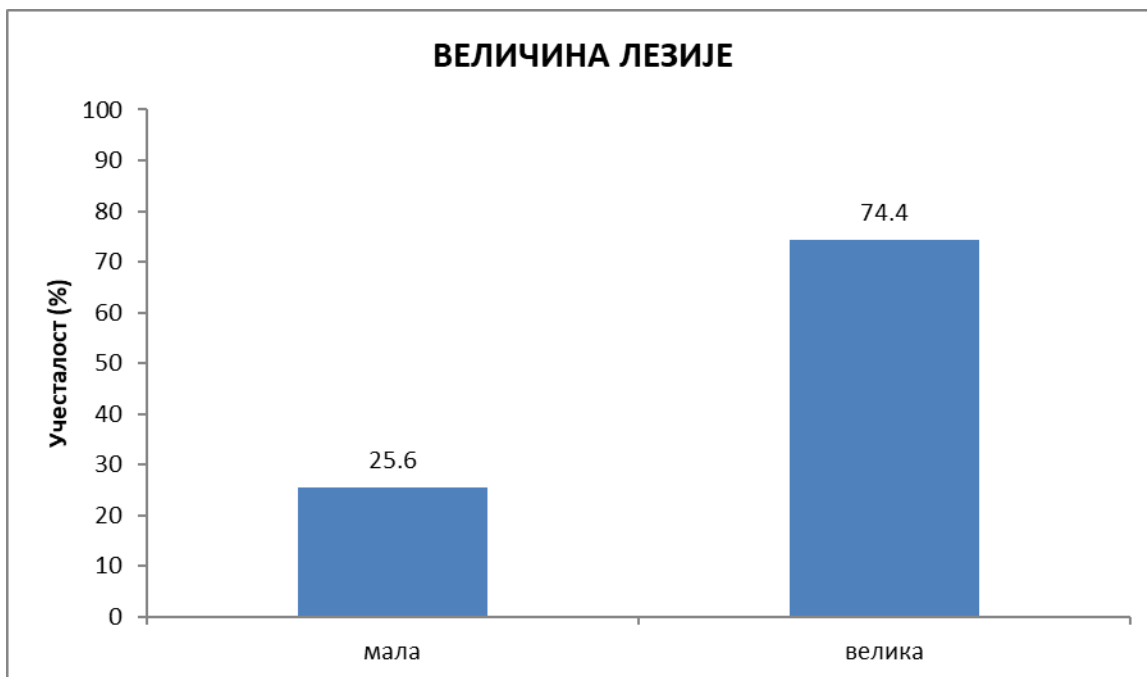
Графикон 6. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према вилици

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – ВЕЛИЧИНА ЛЕЗИЈЕ

Табела 8. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према величини лезије

Величина лезије	n	%
мала ($\leq 3,5\text{mm}$)	10	25,6
велика ($> 3,5\text{ mm}$)	29	74,4
Укупно	39	100,0

Од експерименталних испитаника укључених у истраживање према величини лезије, мале лезије је имало 25,6%, док је велике лезије имало 74,4%.



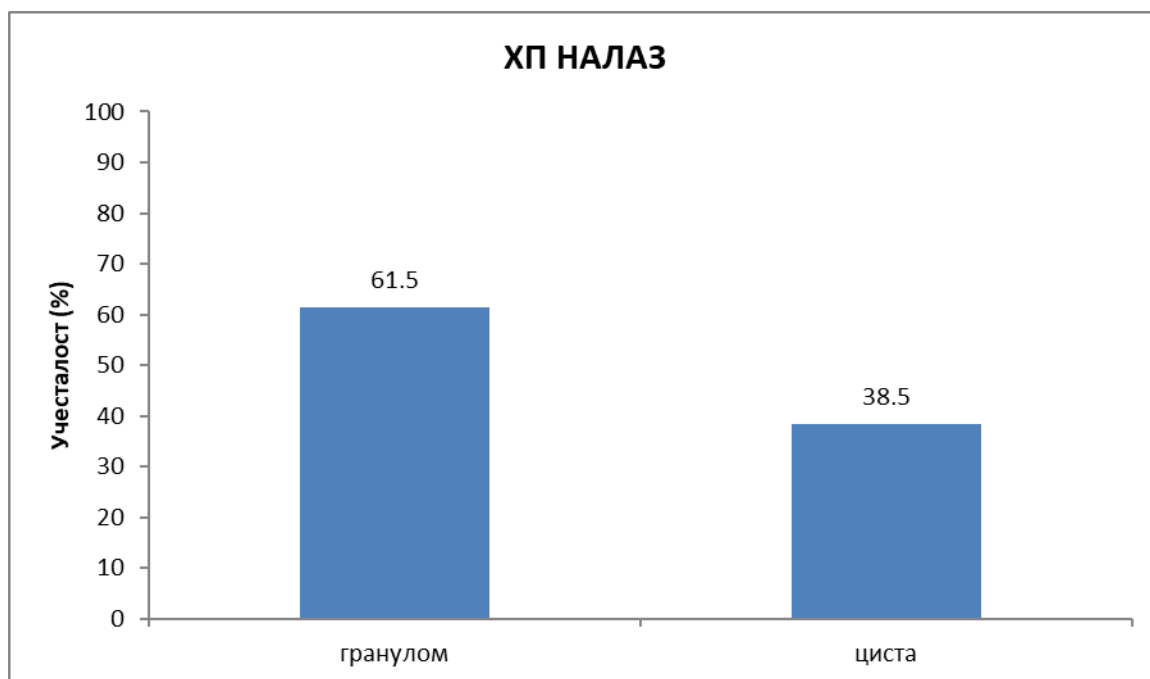
Графикон 7. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према величини лезије

ЕКСПЕРИМЕНТАНА ГРУПА – ХП НАЛАЗ

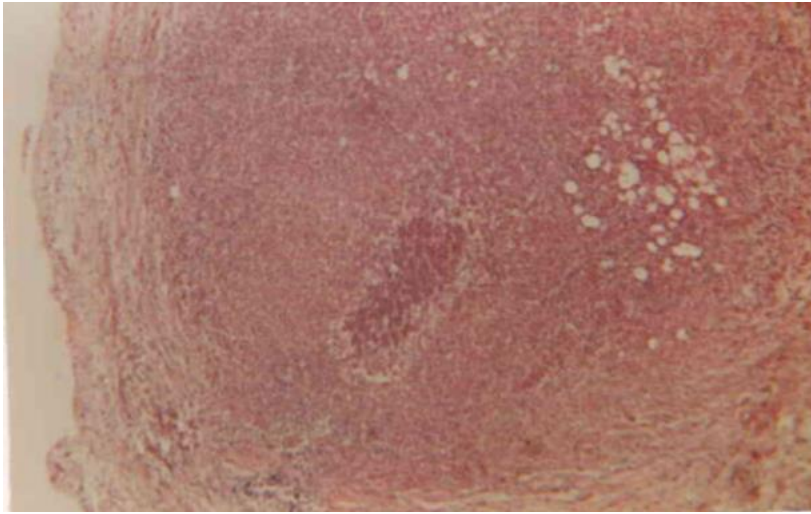
Табела 9. – Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према ХП налазу

ХП налаз	n	%
гранулом	8	61,5
циста	5	38,5
Укупно	13	100,0

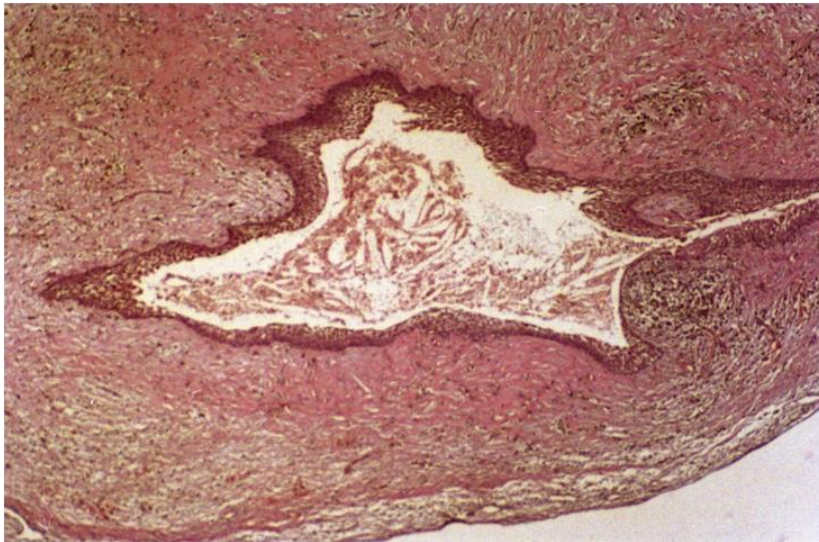
Од експерименталних испитаника укључених у истраживање код којих је тај податак постојао за ХП налаз, гранулом је имало 61,5%, док је цисте имало 38,5%.



Графикон 8. - Дистрибуција испитаника из експерименталне групе према ХП налазу



Слика 3: Периапексни гранулома



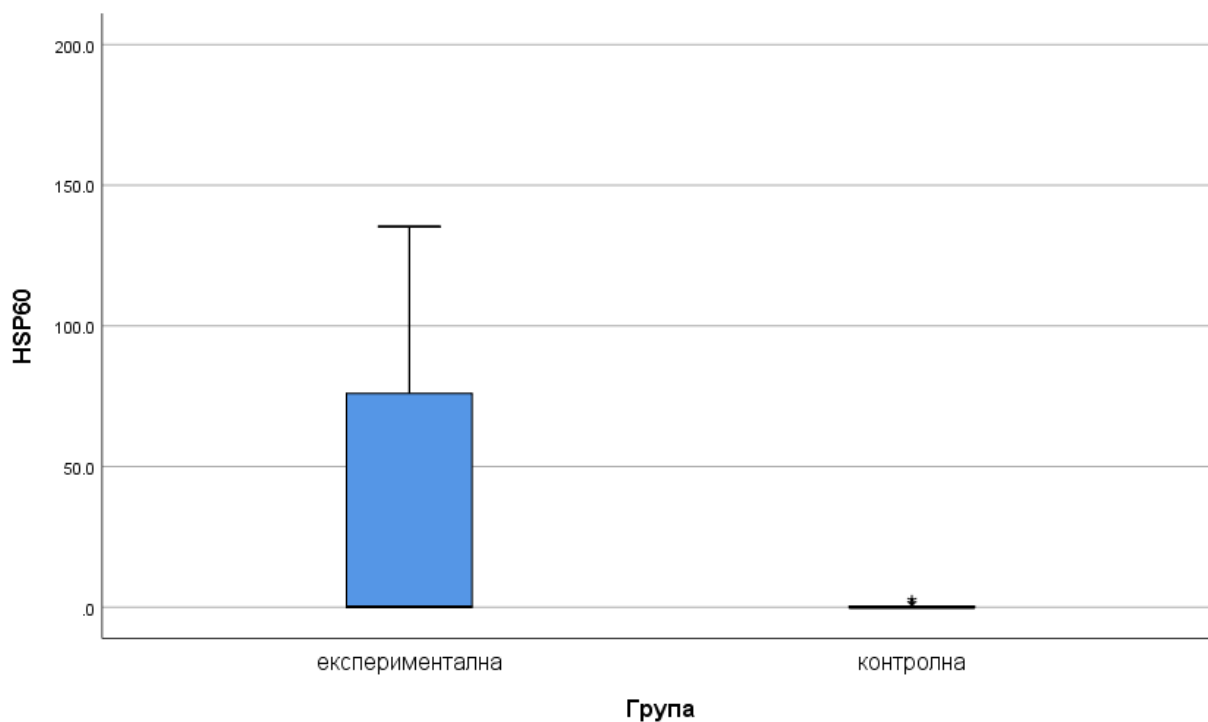
Слика 4: Радиксна циста

ГРУПЕ

Табела 10. Релативна експресија бактеријског *heat shock* протеина

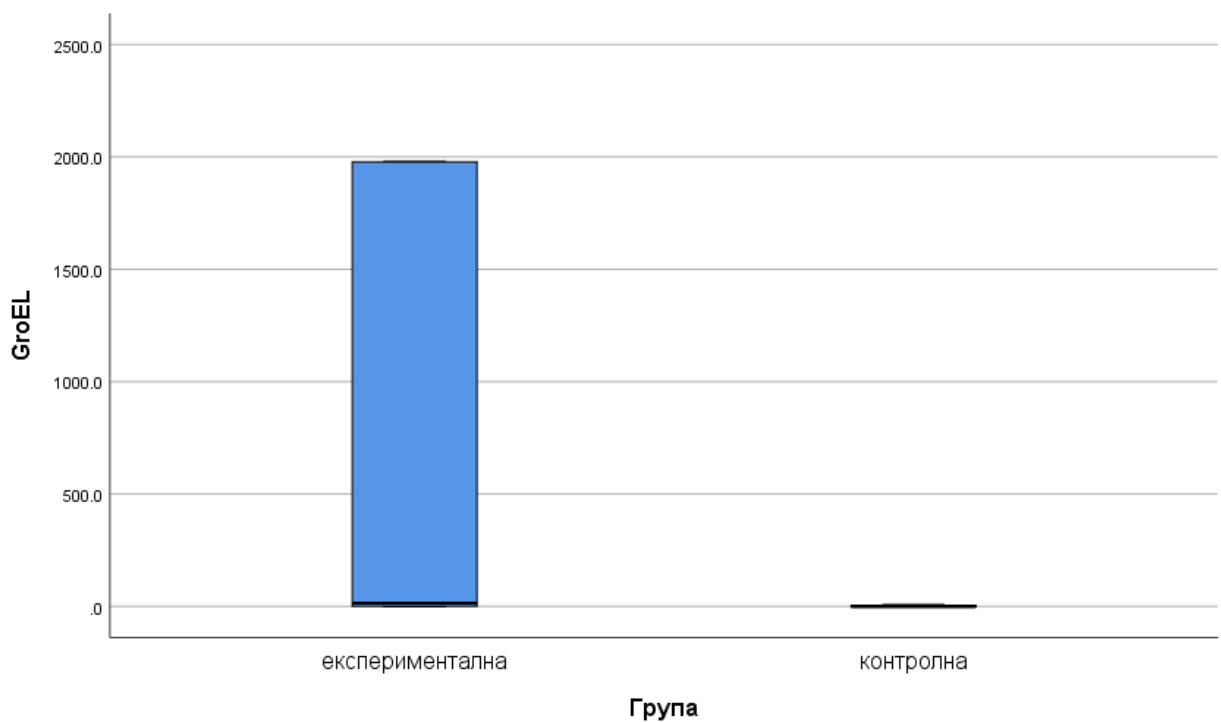
Варијабла	Групе	as	sd	med	min	max	P
HSP60	E	31950,822	136527,612	0,143	0,000	757034,750	0,021
	K	0,475	0,927	0,000	0,000	2,621	
GroEL	E	32445,120	111357,473	14,448	0,007	472514,803	0,021
	K	1,813	2,566	0,067	0,000	6,120	

Медијана вредности релативне експресије HSP60 испитаника експерименталне групе износила је 0,143 (опсег, 0,000 – 757034,750), док је код контролних испитаника износила 0,000 (опсег, 0,000 – 2,621), што је статистички значајна разлика ($U=89,0$; $p=0,021$). Испитаници експерименталне групе имају значајно веће вредности релативне експресије HSP60.



Графикон 9. –Вредности релативне експресије (иРНК) HSP60 испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије GroEL испитаника експерименталне групе износила је 14,448 (опсег, 0,007-472514,803), док је код контролних испитаника износила 0,067 (опсег, 0,000– 6,120), што је статистички значајна разлика ($U=36.0$; $p=0,021$). Испитаници експерименталне групе имају значајно већу релативну експресију GroEL.

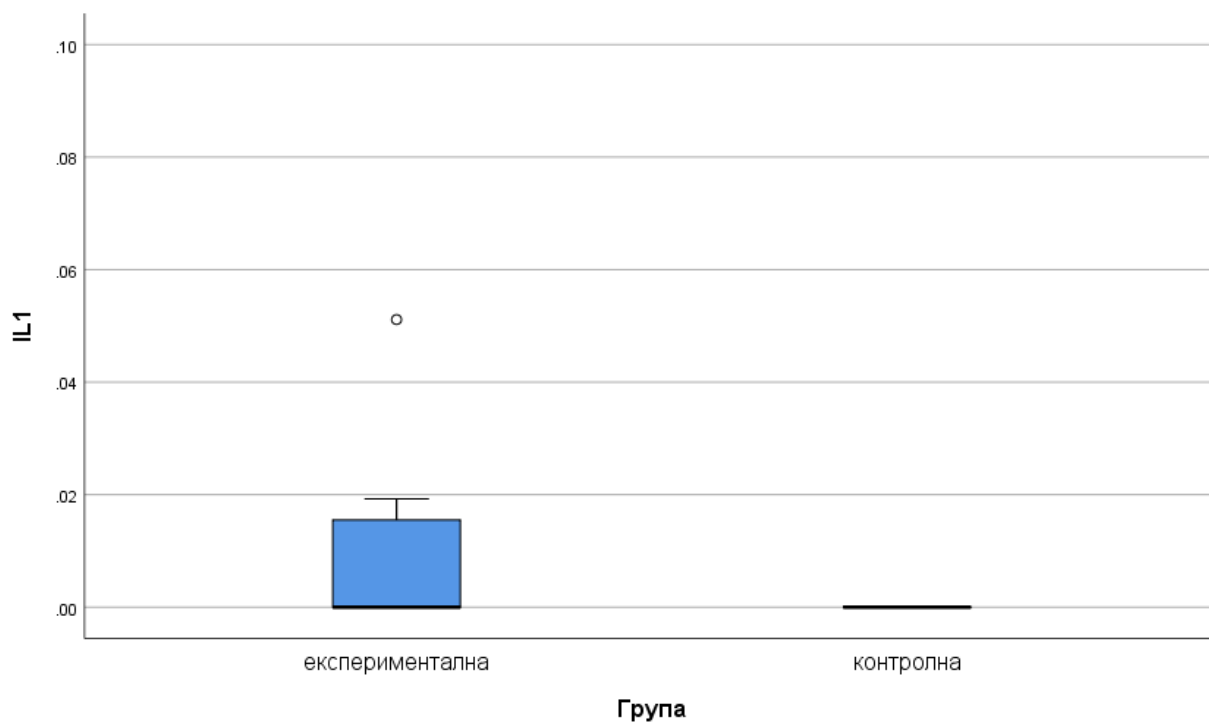


Графикон 10. –Вредности релативне експресије (иРНК) GroEL испитаника у истраживању

Табела 11. Релативна експресија цитокина

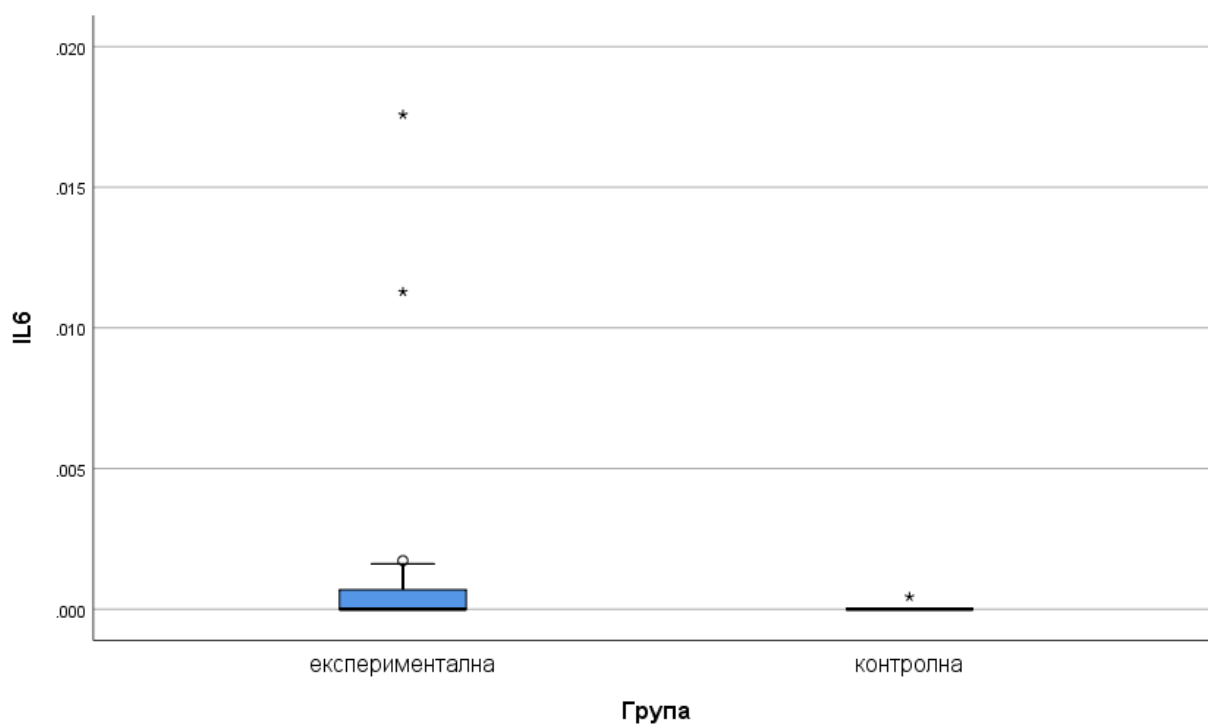
Варијабла	Групе	as	sd	med	min	max	P
IL-1 β	E	0,124	0,347	0,000	0,000	1,840	0,109
	K	0,120	0,360	0,000	0,000	1,079	
IL-6	E	3527,982	22031,775	0,000	0,000	137588,465	0,127
	K	<0,001	<0,001	0,000	0,000	<0,001	
IL-8	E	1711836,805	6657895,298	5480,151	0,374	30451289,786	<0,001
	K	1,478	3,166	0,065	0,002	9,781	
TNF- α	E	12,979	16,573	5,182	0,339	58,892	0,390
	K	3,122	4,602	1,301	0,252	14,929	
IL-12 (p40)	E	25220851,327	157110836,614	0,000	0,000	981219048,198	0,765
	K	1,248	1,665	0,758	0,000	5,315	
IL-23 (p35)	E	94278,408	516492,291	0,000	0,000	3223060,860	0,827
	K	0,451	0,535	0,438	0,000	1,338	
INF- γ	E	328,862	1780,207	1,790	0,000	11113,303	0,019
	K	1,379	3,046	0,000	0,000	9,318	
IL-4	E	3520,241	14344,425	0,002	0,000	81374,396	0,034
	K	2,299	1,751	2,189	0,000	5,105	
IL-5	E	13113254,007	49144121,823	0,035	0,000	240256463,046	0,508
	K	1098,565	1555,932	147,000	0,000	3565,775	
IL-13	E	783,906	3700,578	0,000	0,000	21920,605	0,085
	K	1,905	5,716	0,000	0,000	17,148	
IL-10	E	36246,300	128210,737	276,282	0,255	757034,750	<0,001
	K	21840873,874	58322127,950	1493224,858	9607,864	177101353,862	

Медијана вредности релативне експресије IL-1 β испитаника експерименталне групе износила је 0,000 (опсег, 0,00– 1,840), док је код контролних испитаника износила 0,00 (опсег, 0,00 – 1,079), што није статистички значајна разлика (U=122,0; p=0,109).



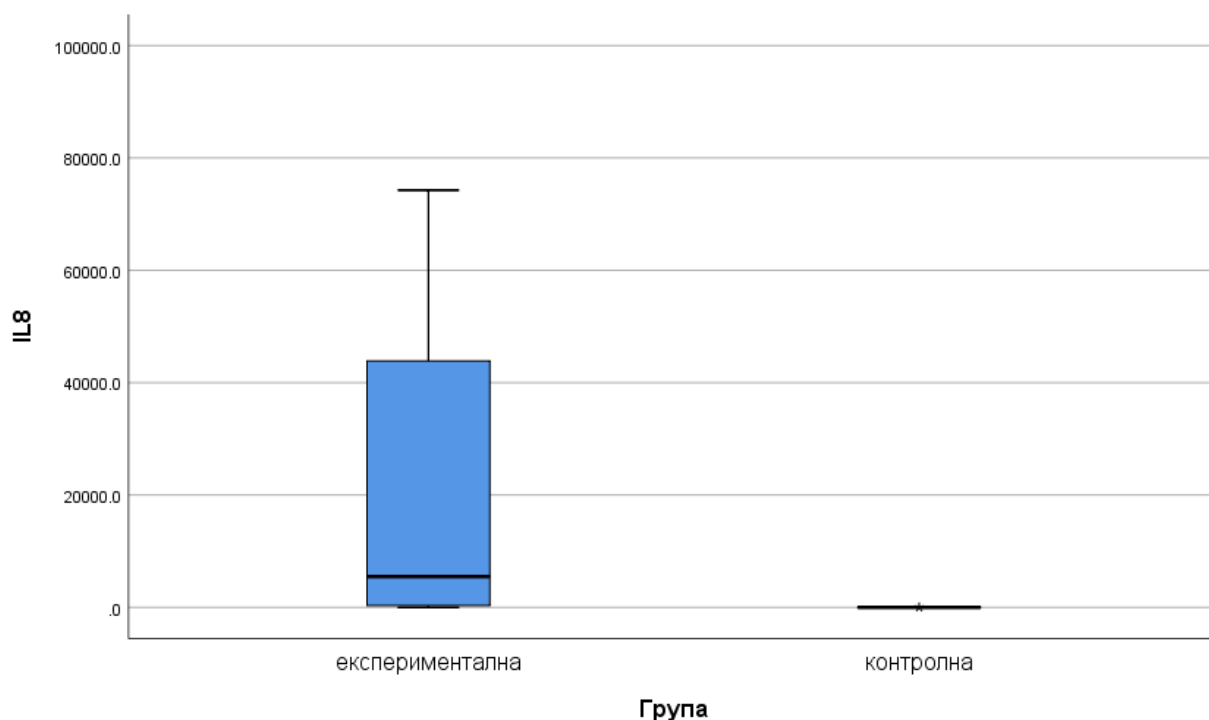
Графикон 11. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-1 β у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-6 испитаника експерименталне групе износила је 0,00 (опсег, 0,00 – 137588,465), док је код контролних испитаника износила 0,00 (опсег, 0,00 – <0,001), што није статистички значајна разлика ($U=128,0$; $p=0,127$).



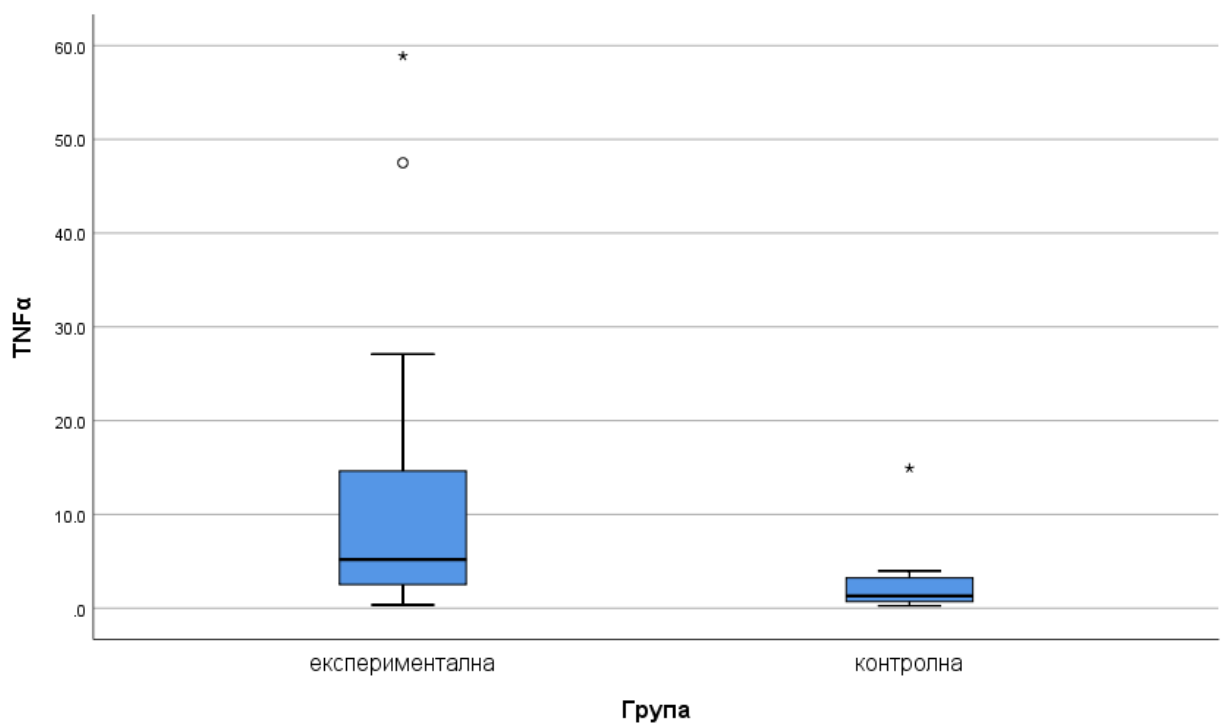
Графикон 12. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-6 у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-8 испитаника експерименталне групе износила је 5480,151(опсег, 0,374 – 30451289,786), док је код контролних испитаника износила 0,065(опсег, 0,000 – 9,781), што је статистички значајна разлика ($U=7,0$; $p<0,001$). Испитаници експерименталне групе у перипексном ткиву имају значајно већу експресију IL-8.



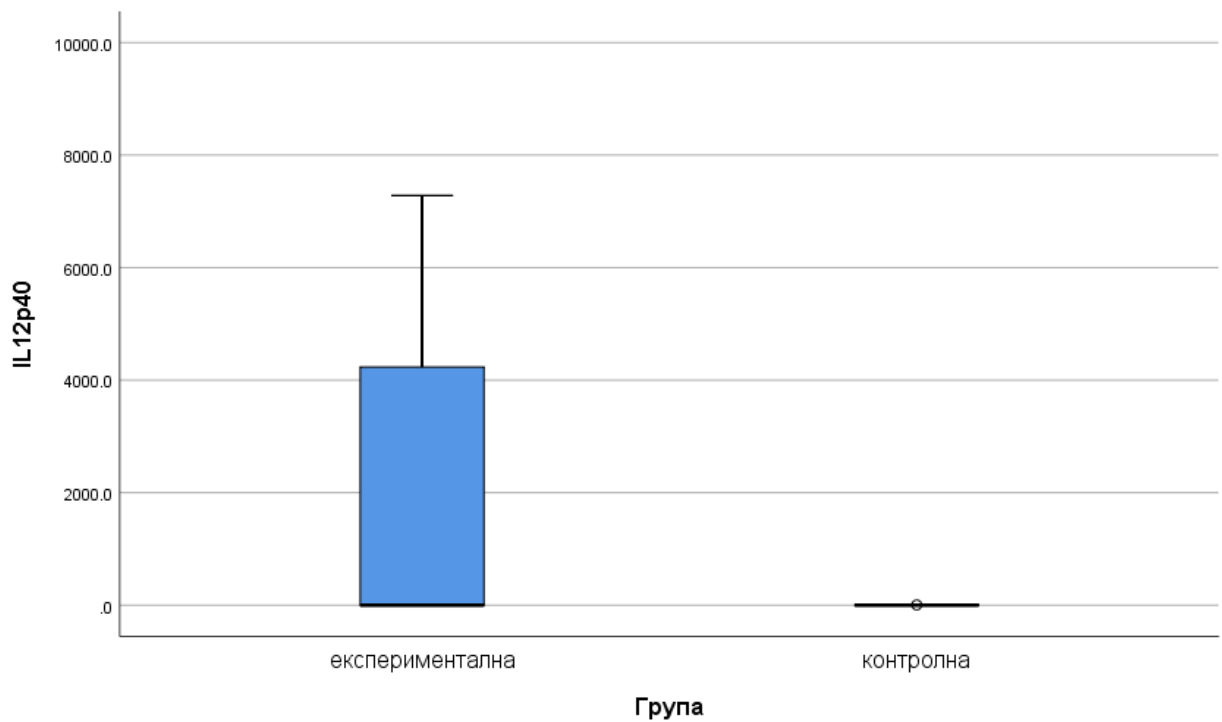
Графикон 13. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-8 у перипексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије TNF- α испитаника експерименталне групе износила је 5,182 (опсег, 0,339–58,892), док је код контролних испитаника износила 1,301 (опсег, 0,252– 14,929), што је статистички значајна разлика ($U=38,0$; $p=0,027$). Испитаници експерименталне групе у периапексном ткиву имају значајно већу експресију TNF- α .



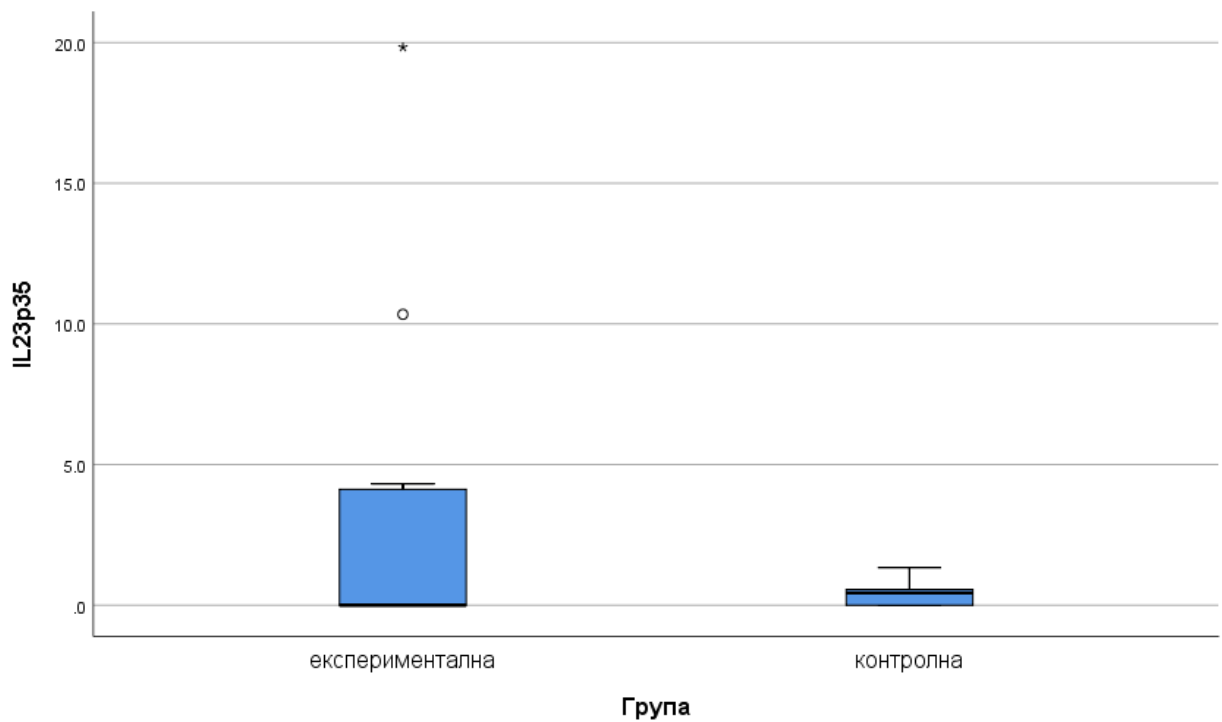
Графикон 14. –Вредности релативне експресије (иРНК) TNF- α у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL12 (p40) испитаника експерименталне групе износила је 0,00 (опсег, 0,00 – 981219048,198), док је код контролних испитаника износила 0,758 (опсег, 0,000–5,315), што није статистички значајна разлика ($U=165,0$; $p=0,765$).



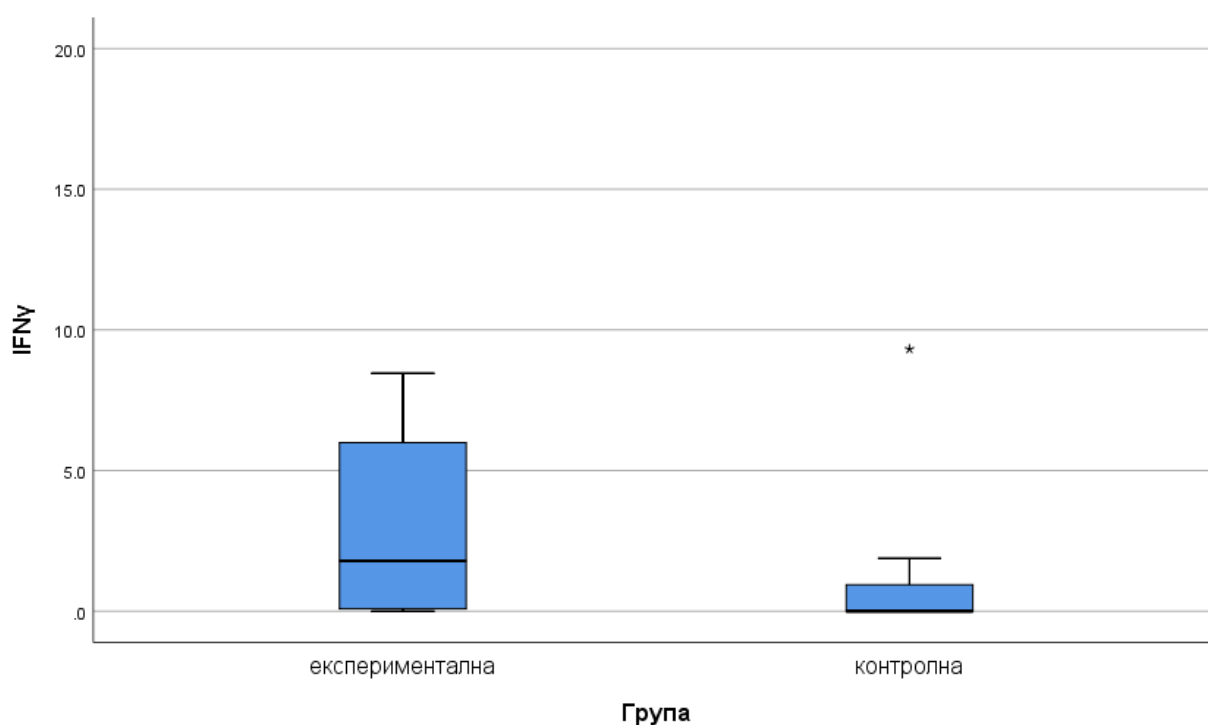
Графикон 15. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL12 (p40) у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL23 (p35) испитаника експерименталне групе износила је 0,00 (опсег, 0,00 –3223060,860), док је код контролних испитаника износила 0,438 (опсег, 0,00 –1,338), што није статистички значајна разлика ($U=168,0$; $p=0,827$).



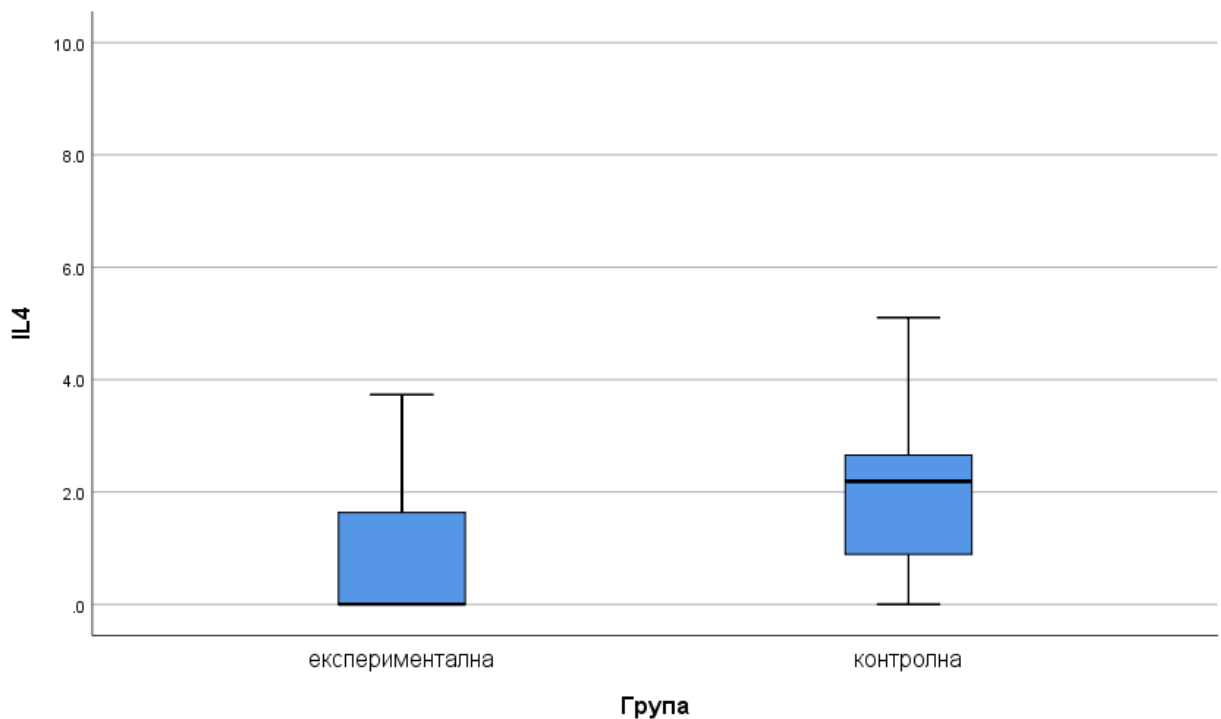
Графикон 16. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL23 (p35) у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије INF- γ испитаника експерименталне групе износила је 1,790 (опсег, 0,000 – 11113,303), док је код контролних испитаника износила 0,000 (опсег, 0,000 – 9,318), што је статистички значајна разлика ($U=87,0$; $p=0,019$). Испитаници експерименталне групе у периапексном ткиву имају значајно већу експресију INF- γ .



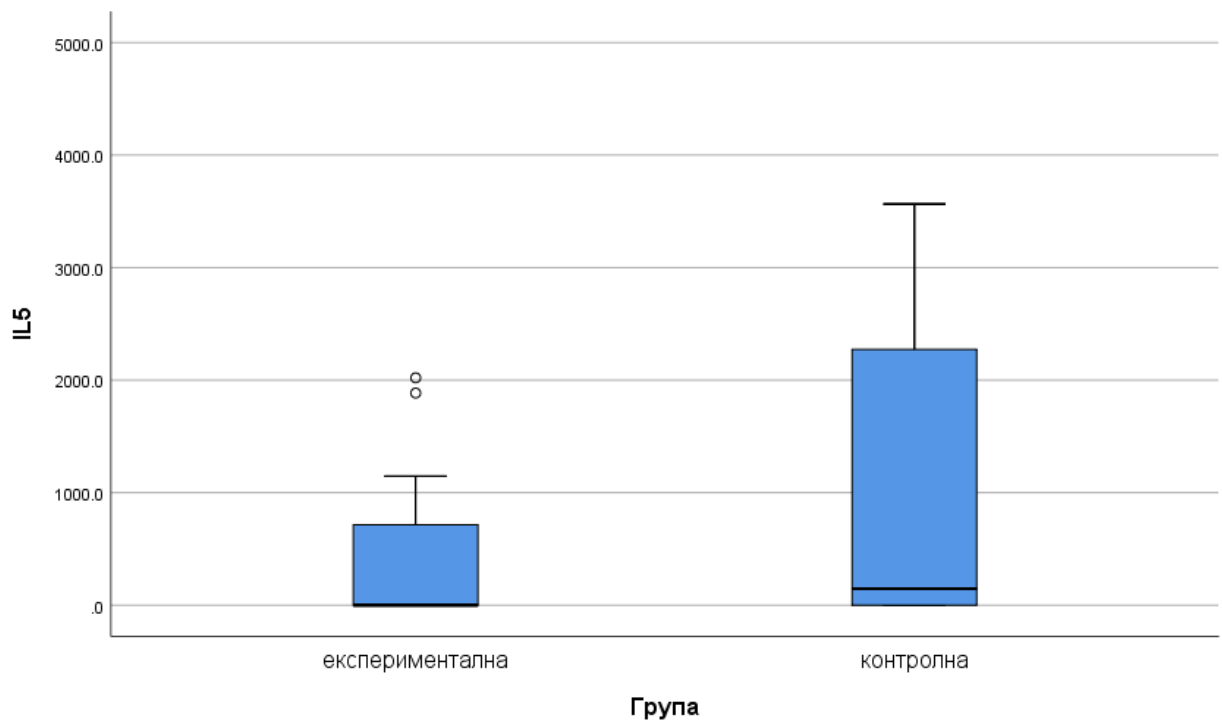
Графикон 17. –Вредности релативне експресије (иРНК) INF- γ у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-4 испитаника експерименталне групе износила је 0,002 (опсег, 0,000 – 81374,396), док је код контролних испитаника износила 2,189 (опсег, 0,000 – 5,105), што је статистички значајна разлика ($U=97,5$; $p=0,034$). Испитаници експерименталне групе у периапексном ткиву имају значајно мању експресију IL-4.



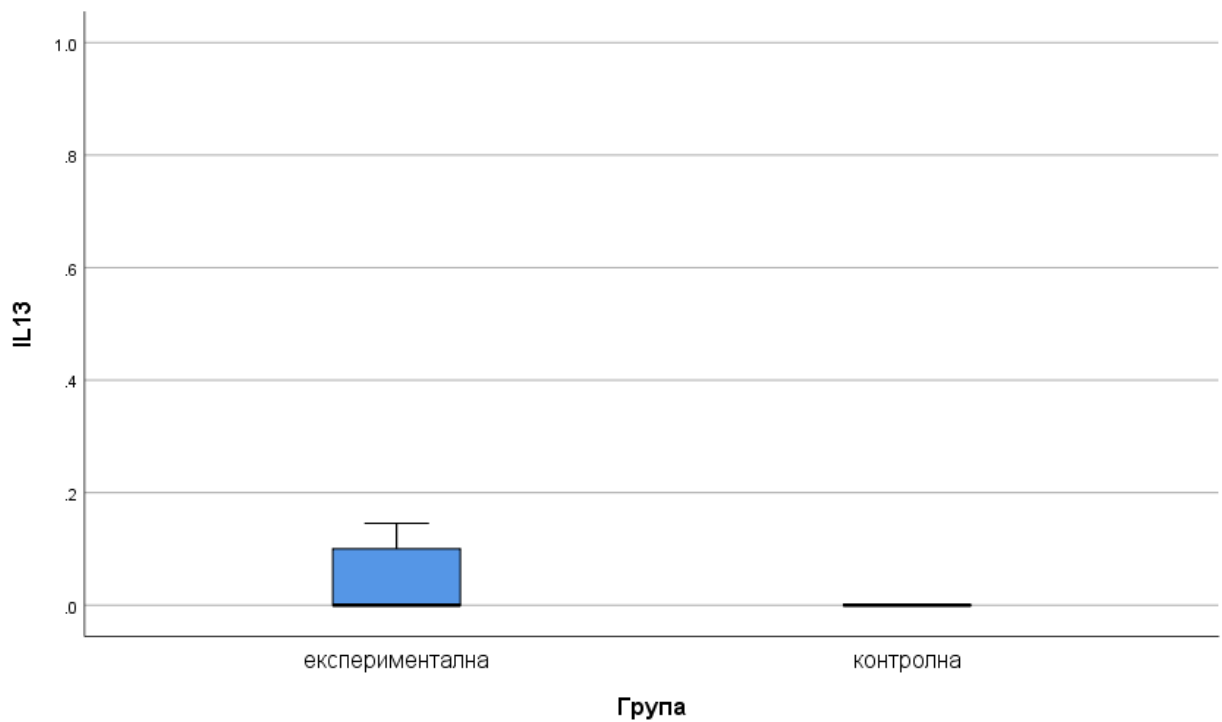
Графикон 18. –Вредности релативне експресије IL-4 у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-5 испитаника експерименталне групе износила је 0,035 (опсег, 0,00 – 240256463,046), док је код контролних испитаника износила 147,000 (опсег, 0,00 – 3565,775), што није статистички значајна разлика ($U=151,0$; $p=0,508$).



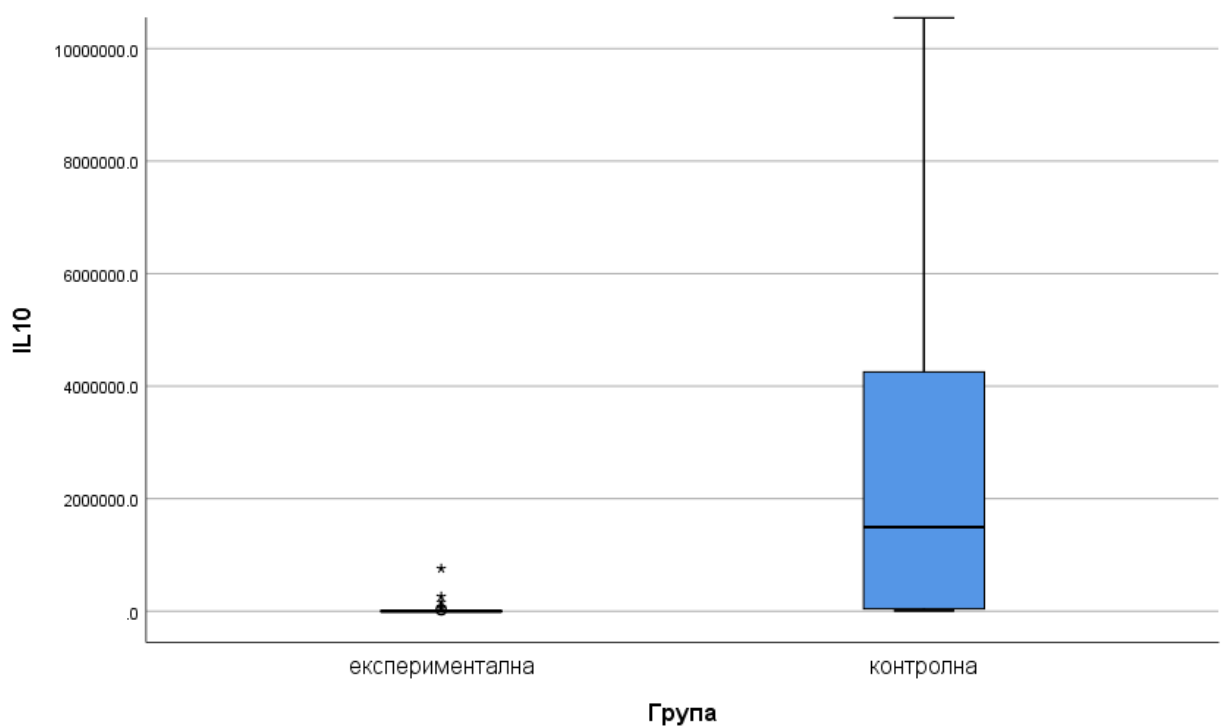
Графикон 19. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-5 у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-13 испитаника експерименталне групе износила је 0,00 (опсег, 0,00 – 21920,605), док је код контролних испитаника износила 0,00 (опсег, 0,00 – 17,148), што није статистички значајна разлика ($U=118,0$; $p=0,085$).



Графикон 20. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-13 у периапексном ткиву испитаника у истраживању

Медијана вредности релативне експресије IL-10 испитаника експерименталне групе износила је 276,282 (опсег, 0,255 – 757034,750), док је код контролних испитаника износила 1493224,858 (опсег, 9607,864 – 177101353,862), што је статистички значајна разлика ($U=21,0$; $p<0,001$). Испитаници експерименталне групе имају значајно мању експресију IL-10.



Графикон 21. –Вредности релативне експресије (иРНК) IL-10 у периапексном ткиву испитаника у истраживању

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКИХ *HEAT SHOCK* ПРОТЕИНА И ЦИТОКИНА У ПЕРИАПЕКСНИМ ГРАНУЛОМИМА И РАДИКСНИМ ЦИСТАМА

Табела 12. Релативна експресија бактеријских *heat shock* протеина у периапексним грануломима и радикалним цистама

Варијабла	ХП налаз	As	Sd	med	Min	max	P
HSP60	гранулом	37,982	45,421	24,494	0,000	111,430	0,019
	циста	0,003	0,005	0,001	0,000	0,011	
GroEL	гранулом	72738,740	163631,220	4180,577	0,183	472514,803	0,040
	циста	0,764	0,826	0,599	0,007	1,972	

Медијана вредности релативне експресије HSP60 испитаника са грануломом износила је 24,494 (опсег, 0,000 – 111,430), док је код испитаника са цистом износила 0,001 (опсег, 0,000 – 0,011), што је статистички значајна разлика ($U=4,0$; $p=0,019$). Испитаници са грануломом имају значајно већу експресију HSP60.

Медијана вредности релативне експресије GroEL испитаника са грануломом износила је 4180,577 (опсег, 0,183 – 472514,803), док је код испитаника са цистом износила 0,599 (опсег, 0,007 – 1,972), што је статистички значајна разлика ($U=6,0$; $p=0,040$). Испитаници са грануломом имају значајно већу експресију GroEL.

Табела 13. Релативна експресија цитокина у периапексним грануломима и радикалним цистама

Варијабла	ХП налаз	As	Sd	med	min	Max	p
IL-1β	гранулом	0,001	0,003	0,000	0,000	0,008	0,009
	Циста	0,018	0,020	0,012	0,001	0,051	
IL-6	гранулом	0,003	0,006	0,000	0,000	0,018	0,547
	Циста	<0,001	0,001	<0,001	0,000	0,001	
IL-8	гранулом	8210221,99 7	13412142,579	418680,073	0,374	30451289,786	0,079
	Циста	454,001	709,909	10,339	1,385	1629,259	
TNFα	гранулом	24,091	19,899	18,624	3,138	58,892	0,028
	Циста	4,119	2,321	3,160	1,919	7,464	
IL-12(p40)	гранулом	122767833, 253	346866815,816	4901,718	0,000	981219048,19 8	0,883
	Циста	49038,015	91206,326	337,794	22,162	209995,662	
IL-23 (p35)	гранулом	20,320	53,418	0,000	0,000	152,219	0,317
	Циста	487,883	1088,750	0,002	0,000	2435,496	
INF-γ	гранулом	1518,575	3889,905	4,194	0,008	11113,303	0,107
	Циста	0,118	0,166	0,013	0,001	0,382	
IL-4	гранулом	4458,299	12609,972	0,000	0,000	35666,388	0,014
	Циста	20316,611	35236,178	0,078	0,004	81374,396	
IL-5	гранулом	58043,060	144834,029	587,034	0,002	414209,179	0,079
	Циста	66025473,9 99	104866612,240	62182,229	0,035	240256463,04 6	
IL-13	гранулом	3818,921	7816,419	39,235	0,029	21920,605	0,057
	Циста	0,331	0,603	0,081	0,005	1,404	
IL-10	гранулом	96295,204	267013,100	138,797	19,973	757034,750	0,242
	Циста	1059,473	1797,739	6,409	0,536	4153,178	

Медијана вредности релативне експресије IL-1 β испитаника са грануломом износила је 0,000(опсег, 0,000 – 0,008), док је код испитаника са цистом износила 0,012(опсег, 0,001 – 0,051), што је статистички значајна разлика (U=3,0; p=0,009). Испитаници са грануломом имају значајно мању експресију IL-1 β , ниво иРНК.

Медијана вредности релативне експресије IL-6 испитаника са грануломом износила је 0,00 (опсег, 0,00 –0,018), док је код испитаника са цистом износила <0,001 (опсег, 0,00 –0,001), што није статистички значајна разлика (U=16,0; p=0,547).

Медијана вредности релативне експресије IL-8 испитаника са грануломом износила је 418680,073 (опсег, 0,374– 30451289,786), док је код испитаника са цистом износила 10,339 (опсег, 1,385 – 1629,259), што није статистички значајна разлика (U=8,0; p=0,079).

Медијана вредности релативне експресије TNF- α испитаника са грануломом износила је 18,624(опсег, 3,138 – 58,892), док је код испитаника са цистом износила 3,160(опсег, 1,919 – 7,464), што је статистички значајна разлика (U=5,0; p=0,028). Испитаници са грануломом имају значајно већу експресију TNF- α .

Медијана вредности релативне експресије IL-12 (p40) испитаника са грануломом износила је 4901,718 (опсег, 0,00 – 981219048,198), док је код испитаника са цистом износила 337,794 (опсег, 22,162– 209995,662), што није статистички значајна разлика (U=19,0; p=0,883).

Медијана вредности релативне експресије IL-23 (p35) испитаника са грануломом износила је 0,00 (опсег, 0,00 – 152,219), док је код испитаника са цистом износила

0,002 (опсег, 0,00 – 2435,496), што није статистички значајна разлика ($U=13,5$; $p=0,317$).

Медијана вредности релативне експресије INF- γ испитаника са грануломом износила је 4,194 (опсег, 0,008 – 11113,303), док је код испитаника са цистом износила 0,013 (опсег, 0,001 – 0,382), што није статистички значајна разлика ($U=9,0$; $p=0,107$).

Медијана вредности релативне експресије IL-4 испитаника са грануломом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 35666,388), док је код испитаника са цистом износила 0,078 (опсег, 0,004 – 81374,396), што је статистички значајна разлика ($U=4,0$; $p=0,014$). Испитаници са грануломом имају значајно мању експресију IL-4.

Медијана вредности релативне експресије IL-5 испитаника са грануломом износила је 587,034 (опсег, 0,002 – 414209,179), док је код испитаника са цистом износила 62182,229 (опсег, 0,035 – 240256463,046), што није статистички значајна разлика ($U=8,0$; $p=0,079$).

Медијана вредности релативне експресије IL-13 испитаника са грануломом износила је 39,235 (опсег, 0,029 – 21920,605), док је код испитаника са цистом износила 0,081 (опсег, 0,005 – 1,404), што није статистички значајна разлика ($U=7,0$; $p=0,057$).

Медијана вредности релативне експресије IL-10 испитаника са грануломом износила је 138,797 (опсег, 19,973 – 757034,750), док је код испитаника са цистом износила 6,409 (опсег, 0,536– 4153,178), што није статистички значајна разлика ($U=12,0$; $p=0,242$).

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКИХ *HEAT SHOCK* ПРОТЕИНА И ЦИТОКИНА У МАЛИМ И ВЕЛИКИМ ПЕРИАПЕКСНИМ ЛЕЗИЈАМА

Табела 14. Релативна експресија бактеријских *heat shock* протеина у малим и великим периапексним лезијама.

Варијабла	Величина лезије	As	Sd	med	Min	max	P
HSP60	Мале	118850,697	258994,575	80,822	0,000	757034,750	0,084
	Велике	1985,348	10441,028	0,019	0,000	56266,944	
GroEL	Мале	48001,438	149172,102	0,092	0,000	472514,803	0,986
	Велике	3630,395	14715,689	0,060	0,000	76862,911	

Медијана вредности релативне експресије HSP60 у групи испитаника са малим лезијама износила је 80,822 (опсег, 0,00 – 757034,750), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,019 (опсег, 0,00 – 56266,944), што није статистички значајна разлика ($U=91,5$; $p=0,084$).

Медијана вредности релативне експресије GroEL у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,092 (опсег, 0,000 – 472514,803), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,060 (опсег, 0,000 – 76862,911), што није статистички значајна разлика ($U=144,5$; $p=0,986$).

Табела 15. Релативна експресија цитокина у малим и великим периапексним лезијама

Варијабла	Величи на лезије	As	Sd	med	min	Max	p
IL-1β	мале	0,331	0,615	0,000	0,000	1,840	0,77
	велике	0,052	0,145	0,000	0,000	0,742	9
IL-6	мале	0,002	0,006	0,000	0,000	0,018	0,21
	велике	4744,527	25549,518	0,000	0,000	137588,465	6
IL-8	мале	3594003,64 7	9586427,019	1316,410	0,374	30451289,78 6	0,87
	велике	1062813,75 6	5377566,460	6608,009	1,385	29009055,73 9	2
TNF-α	мале	12,070	16,282	5,301	0,000	47,505	0,55
	велике	6,413	11,645	3,340	0,000	58,892	1
IL-12 (p40)	мале	98213955,6 52	310256494,5 49	0,000	0,000	981219048,1 98	0,91
	велике	50815,353	170524,744	0,000	0,000	845825,189	5
IL-23 (p35)	мале	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
	велике	126788,203	598137,257	0,002	0,000	3223060,860	4
INF-γ	мале	1212,597	3490,563	4,430	0,009	11113,303	0,04
	велике	24,126	97,844	0,693	0,000	522,758	3
IL-4	мале	2021,825	6390,152	0,001	0,000	20208,517	1,00
	велике	4036,936	16280,220	0,004	0,000	81374,396	0
IL-5	мале	48321,434	129493,256	0,001	0,000	414209,179	0,47
	велике	17618403,1 70	56530594,97 9	0,233	0,000	240256463,0 46	9
IL-13	мале	2989,009	7107,586	0,000	0,000	21920,605	0,86
	велике	23,526	108,664	0,000	0,000	584,071	1
IL-10	мале	96407,769	236995,656	5424,334	120,25 9	757034,750	0,01 6

велике	15500,965	50166,349	135,298	0,255	260333,239
---------------	-----------	-----------	---------	-------	------------

Медијана вредности релативне експресије IL-1 β у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 1,840), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,000 (опсег, 0,000 – 0,742), што није статистички значајна разлика (U=137,0; p=0,779).

Медијана вредности релативне експресије IL-6 у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 0,018), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,000 (опсег, 0,000 – 137588,465), што није статистички значајна разлика (U=112,0; p=0,216).

Медијана вредности релативне експресије IL-8 у групи испитаника са малим лезијама износила је 1316,410 (опсег, 0,374 – 30451289,786), док је код испитаника са великим лезијама износила 6608,009 (опсег, 1,385 – 29009055,739), што није статистички значајна разлика (U=140,0; p=0,872).

Медијана вредности релативне експресије TNF- α у групи испитаника са малим лезијама износила је 5,301 (опсег, 0,000 – 47,505), док је код испитаника са великим лезијама износила 3,340 (опсег, 0,000 – 58,892), што није статистички значајна разлика (U=126,5; p=0,551).

Медијана вредности релативне експресије IL-12 (p40) у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 981219048,198), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,000 (опсег, 0,000 – 845825,189), што није статистички значајна разлика (U=142,0; p=0,915).

Медијана вредности релативне експресије IL-23 (p35) у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 19,835), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,002 (опсег, 0,000 – 3223060,860), што је статистички значајна разлика ($U=65,0$; $p=0,004$). Испитаници са малим лезијама имају значајно мању експресију IL-23.

Медијана вредности релативне експресије INF- γ у групи испитаника са малим лезијама износила је 4,430 (опсег, 0,009 – 11113,303), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,693 (опсег, 0,000 – 522,758), што је статистички значајна разлика ($U=82,0$; $p=0,043$). Испитаници са малим лезијама имају значајно већу експресију INF- γ .

Медијана вредности релативне експресије IL-4 у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,001 (опсег, 0,000 – 20208,517), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,004 (опсег, 0,000 – 81374,396), што није статистички значајна разлика ($U=145,0$; $p=1,000$).

Медијана вредности релативне експресије IL-5 у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,001 (опсег, 0,000 – 414209,179), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,233 (опсег, 0,000 – 240256463,046), што није статистички значајна разлика ($U=123,5$; $p=0,479$).

Медијана вредности релативне експресије IL-13 у групи испитаника са малим лезијама износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 21920,605), док је код испитаника са великим лезијама износила 0,000 (опсег, 0,000 – 584,071), што није статистички значајна разлика ($U=140,0$; $p=0,861$).

Медијана вредности релативне експресије IL-10 у групи испитаника са малим лезијама износила је 5424,334 (опсег, 120,259 – 757034,750), док је код испитаника

са великим лезијама износила 135,298 (опсег, 0,255 – 260333,239), што је статистички значајна разлика ($U=70,0$; $p=0,016$). Испитаници са малим лезијама имају значајно већу експресију IL-10.

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКИХ *HEAT SHOCK* ПРОТЕИНА И ЦИТОКИНА У ГРУПАМА СА И БЕЗ ЕНДОДОНТСКОГ ТРЕТМАНА

Табела 16. Релативна експресија бактеријских *heat shock* протеина у групама са и без ендодонтског третмана

Варијабла	Ендодонтски третман	as	Sd	med	min	Max	p
HSP60	Да	124481,922	256724,469	123,752	0,000	757034,750	0,003
	не	43,546	158,340	0,013	0,000	849,223	
GroEL	Да	55049,576	148651,282	0,000	0,000	472514,803	0,813
	не	1200,002	4378,234	0,128	0,000	23010,425	

Медијана вредности релативне експресије HSP60 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 123,752 (опсег, 0,000 – 757034,750), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,013 (опсег, 0,000 – 849,223), што је статистички значајна разлика ($U=53,5$; $p=0,003$). Испитаници са ендодонтским третманом имају значајно већу експресију HSP60.

Медијана вредности релативне експресије GroEL у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 472514,803), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,128 (опсег, 0,000 – 23010,425), што није статистички значајна разлика ($U=138,0$; $p=0,813$).

Табела 17. Релативна експресија цитокина у групама са и без ендодонтског третмана

Варијабла	Ендодонтски третман	As	Sd	Med	min	Max	P
IL-1β	да	0,404	0,616	<0,001	0,000	1,840	0,34
	не	0,027	0,060	0,000	0,000	0,198	5
IL-6	да	0,003	0,006	0,000	0,000	0,018	0,70
	не	4744,526	25549,518	0,000	0,000	137588,465	8
IL-8	да	629439,682	1689659,100	16285,707	23,103	5383078,376	0,58
	не	2085077,192	7660187,761	1629,259	0,374	30451289,786	
TNF-α	да	12,206	21,915	1,656	0,000	58,892	0,52
	не	6,366	8,118	3,411	0,000	30,696	0
IL-12 (p40)	да	98122585,279	310288468,502	0,000	0,000	981219048,198	0,40
	не	82322,378	232571,482	0,000	0,000	906532,992	
IL-23 (p35)	да	3,033	6,736	0,000	0,000	19,835	0,34
	не	126787,158	598137,487	0,000	0,000	3223060,860	8
INF-γ	да	1118,896	3511,700	4,430	0,004	11113,303	0,06
	не	56,437	193,198	0,660	0,000	922,880	7
IL-4	да	1,062	1,510	0,158	0,000	3,458	0,81
	не	4733,750	16531,814	0,002	0,000	81374,396	4
IL-5	да	18123687,320	57166729,433	1,495	0,000	180822629,772	0,61
	не	11385518,382	47065900,958	0,035	0,000	240256463,046	
IL-13	да	2199,225	6929,423	0,000	0,000	21920,605	0,55
	не	295,865	1479,525	0,002	0,000	7967,989	2
IL-10	да	18866,573	48699,843	2633,142	43,713	156955,929	0,24
	не	42239,309	146291,850	156,498	0,255	757034,750	7

Медијана вредности релативне експресије IL-1 β у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је <0,001 (опсег, 0,000 – 1,840), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,000 (опсег, 0,000 – 0,198), што није статистички значајна разлика (U=118,0; p=0,345).

Медијана вредности релативне експресије IL-6 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 0,018), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,000 (опсег, 0,000 – 137588,465), што није статистички значајна разлика (U=135,0; p=0,708).

Медијана вредности релативне експресије IL-8 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 16285,707 (опсег, 23,103 – 5383078,376), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 1629,259 (опсег, 0,374 – 30451289,786), што није статистички значајна разлика (U=128,0; p=0,585).

Медијана вредности релативне експресије TNF- α у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 1,656 (опсег, 0,000 – 58,892), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 3,411 (опсег, 0,000 – 30,696), што није статистички значајна разлика (U=125,0; p=0,520).

Медијана вредности релативне експресије IL-12 (p40) у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 981219048,198), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,000 (опсег, 0,000 – 906532,992), што није статистички значајна разлика (U=121,5; p=0,404).

Медијана вредности релативне експресије IL-23 (p35) у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 19,835), док је код

испитаника без ендодонтског третмана износила 0,000 (опсег, 0,000 – 3223060,860), што није статистички значајна разлика ($U=119,0$; $p=0,348$).

Медијана вредности релативне експресије INF- γ у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 4,430 (опсег, 0,004 – 11113,303), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,660 (опсег, 0,000 – 922,880), што није статистички значајна разлика ($U=88,0$; $p=0,067$).

Медијана вредности релативне експресије IL-4 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,158 (опсег, 0,000 – 3,458), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,002 (опсег, 0,000 – 81374,396), што није статистички значајна разлика ($U=138,0$; $p=0,814$).

Медијана вредности релативне експресије IL-5 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 1,495 (опсег, 0,000 – 180822629,772), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,035 (опсег, 0,000–240256463,046), што није статистички значајна разлика ($U=129,5$; $p=0,610$).

Медијана вредности релативне експресије IL-13 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 0,000 (опсег, 0,000 – 21920,605), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 0,002 (опсег, 0,000 – 7967,989), што није статистички значајна разлика ($U=128,0$; $p=0,552$).

Медијана вредности релативне експресије IL-10 у групи испитаника са ендодонтским третманом износила је 2633,142 (опсег, 43,713 – 156955,929), док је код испитаника без ендодонтског третмана износила 156,498 (опсег, 0,255 – 757034,750), што није статистички значајна разлика ($U=109,0$; $p=0,247$).

КОРЕЛАЦИЈЕ

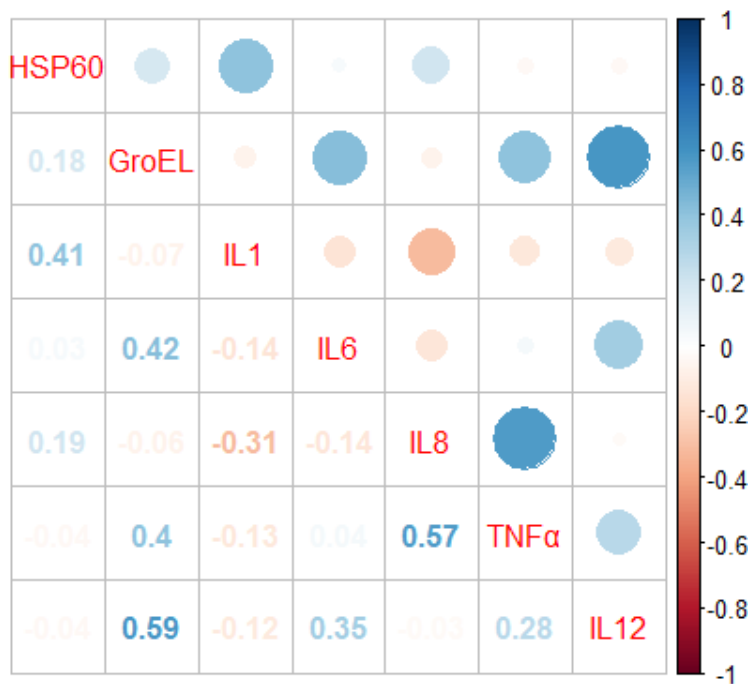
Табела 18. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и проинфламацијских цитокина

		HSP60	GroEL
IL1	Rho	0,41	-0,07
	P	0,010	0,683
IL6	Rho	0,03	0,42
	P	0,838	0,008
IL8	Rho	0,19	-0,06
	P	0,237	0,699
TNF α	Rho	-0,04	0,40
	P	0,825	0,012
IL12	Rho	-0,04	0,59
	P	0,818	<0,001

rho – Spearmanов коефицијент корелације

Постоји статистички значајна позитивна повезаност између експресије HSP60 и релативне експресије IL-1 β ($\rho=0,41$; $p=0,010$). Већа експресија HSP60 удружена је са већом експресијом IL-1 β .

Постоји статистички значајна позитивна повезаност између експресије GroEL и IL-6 ($\rho=0,42$; $p=0,008$), TNF α ($\rho=0,40$; $p=0,012$) и IL12($\rho=0,59$; $p<0,001$). Већа експресија GroEL удружена је са већом експресијом IL-6, TNF- α и IL-12.



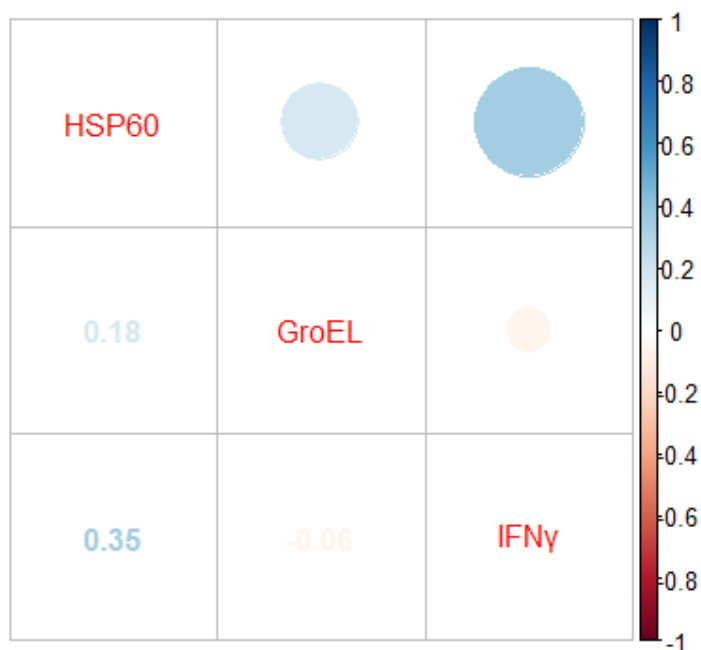
Слика 5. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и проинфламацијских цитокина

Табела 19. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и Th1 цитокина

		HSP60	GroEL
IFN γ	Rho	0,35	-0,06
	P	0,030	0,727

rho – Spearmanов коефицијент корелације

Постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије HSP60 и IFN- γ ($\rho=0,35$; $p=0,030$). Већа експресија HSP60 удружена је са већом експресијом IFN- γ .



Слика 6. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и Th1 цитокина

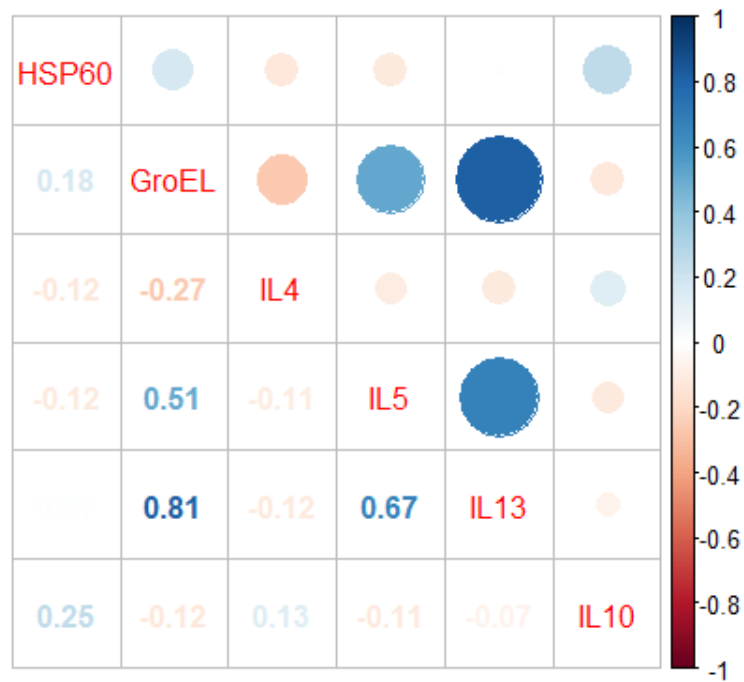
Табела 20. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и Th2 цитокина и антиинфламацијскиг цитокина IL10

		HSP60	GroEL	IL10
IL4	Rho	-0,12	-0,27	0,13
	P	0,461	0,102	0,416
IL5	Rho	-0,12	0,51	-0,11
	P	0,475	0,001	0,504
IL13	Rho	0,01	0,81	0,07
	P	0,961	<0,001	0,688
IL10	Rho	0,25	-0,12	
	P	0,118	0,455	

rho – Spearmanов коефицијент корелације

Постоји статистички значајна позитивна повезаност релативне експресије GroEL и IL-5 ($\rho=0,51$; $p=0,001$) и IL-13 ($\rho=0,81$; $p<0,001$). Већа релативна експресија GroEL удружена је са релативно већом експресијом IL-5 и IL-13.

Не постоји статистички значајна повезаност релативне експресије IL10 и IL-4 ($\rho=0,13$; $p=0,416$), IL-5 ($\rho=-0,11$; $p=0,504$) и IL-13 ($\rho=0,07$; $p=0,688$).



Слика 7. Корелација између релативне експресије бактеријских *heat shock* протеина и Th2 цитокина и антиинфламацијскиг цитокина IL10

6. ДИСКУСИЈА

Хроничне периапексне лезије спадају у веома честе оралне болести, чији су механизми настанка још увек у сфери интересовања научне јавности (144).

6.1. Хит шок протеини

У хроничним периапексним лезијама смањују се одбрамбене способности организма, нарушава се равнотежа између присутних микроорганизама и имунских механизма домаћина, па се активирају ћелије урођене имуности. Развој запаљењских реакција има за последицу активацију остеокласта који ресорбују кост. У апексном пародонтитису микроорганизми ослобађају различите молекуле који стимулишу урођени имунски одговор и тако изазивају инфламацију и оштећење ткива независно од њихове вируленције и ткивне инвазивности (76). Познато је да хит шок протеини, поред своје заштитне улоге, имају и антигени потенцијал и да битно утичу на развој имунског одговора (139). Хит шок протеини могу стимулисати ћелије домаћина да синтетишу проинфламацијске цитокине (145,146).

Сматра се да HSP могу стимулисати апоптозу ћелија имунског система што може да инхибира антибактеријски одговор домаћина (147). Цитотоксичност неких бактеријских HSP такође може допринети уништавању ткива, док хомологија међу хуманим и бактеријским хит шок протеинима може да подстакне развој аутоимунских реакција (148).

Досадашња истраживања су се бавила експресијом хуманих хит шок протеина у периапексним лезијама. *Goodman* и сарадници су доказали високу експресију гена ових протеина у периапексним лезијама и указали да породица гена HSP40 игра пресудну улогу у одржавању инфекције и уништавању ткива у апикалном пародонтитису (149). Други аутори су истраживали нивое HSP47 у ендодонтским

инфекцијама. Открили су да је HSP47 изражен у активним лезијама и 7 дана након ендодонтског третмана на сличном нивоу (150).

Истраживања показују да хит шок протеини могу утицати на ток различитих одонтогених лезија (151). Негативан налаз HSP60 у *Malassez*-овим епителним остацима, а повећана експресија HSP60 у епителу радикалних циста такође указује на повезаност хит шок протеина са инфламацијским процесима у периапексним лезијама (152). Показано је и да GroEL протеин бактерије *A.actinomycetemcomitans* делује и цитотоксички али и стимулише пролиферацију епителних ћелија (153). Резултати истраживања показују повећану експресију хуманог Срп60 у пародонтитису, што указује на његову значајну улогу у имунским догађајима током настанка и прогресије пародонталних болести (154). Постоје основе и за истраживање повезаности експресије појединих хит шок протеина са генском предиспозицијом за развој периапексних лезија (155).

Познато је да је микрофлора која учествује у етиологији периапексних лезија и пародонталних обољења врло слична (156). Студије су показале повећану експресију GroEL у пародонталним обољењима и да овај протеин значајно утиче на развој имунских збивања и на ток пародонтопатије (157). Hasan је у свом истраживању потврдио да бактеријски хит шок протеини (HSP65) индукују снажнију пролиферацију Т лимфоцита периферне крви пацијента са пародонтитисом, у поређењу са хуманим хит шок протеинима (158), док је Yamazaki доказао да постоји јачи пролиферативни одговор моноклеарних ћелија изолованих из периферне крви пацијента са пародонталним обољењима на хумани хит шок протеин у поређењу са одговором моноклеарних ћелија изолованих из крви здравих особа. Није показан пролиферативни одговор ћелија периферне крви на бактеријски хит шок протеин GroEL (159).

Ово је прва студија која се бави истраживањем квантитативне експресије бактеријских хит шок протеина GroEL који се означавају и као HSP60 и као Срп60 у ткиву хроничних периапексних лезија. Показали смо по први пут да су бактеријски Срп60 који се иначе користе за идентификацију бактеријске контаминације и заједнички су за различите врсте бактерија (146,147), значајно

више експримирани у периапексним лезијама у поређењу са здравим периапексним ткивом.

У нашем истраживању, испитивано је присуство две различите секвенце бактеријског хит шок протеина, такозваних бактеријских бар кодова (146) које смо означили са HSP60 и GroEL у 39 узорака периапексних лезија и 9 узорака контролног здравог периапексног ткива . Резултати овог истраживања показују да је HSP60 детектован у 31 узорку периапексних лезија и 3 узорка здравог периапексног ткива, док је GroEL детектован у 21 узорку периапексних лезија и 6 узорака здравог периапексног ткива. Испитаници експерименталне групе имају значајно већу експресију GroEL и HSP60 у поређењу са контролном групом.

У оквиру ове докторске дисертације испитивана је експресија хит шок протеина HSP60 и GroEL у периапексним лезијама са различитим радиолошким и патохистолошким карактеристикама. Уочено је да је експресија HSP60 заступљена и у периапексним грануломима и у радикалним цистама без статистички значајне разлике у експресији у ове две групе, док је експресија GroEL хит шок протеина била значајно већа у групи периапексних гранулома у односу на групу радикалних циста. Статистичка анализа није показала постојање значајне разлике у експресији HSP60 и GroEL између група малих и великих периапексних лезија.

6.2. Проинфламацијски цитокини

Познато је да проинфламацијски цитокини представљају медијаторе запаљења који утичу на настанак и прогресију хроничних периапексних лезија (76). Инфламаторне ћелије из периапексних лезија стварају значајне количине проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α . (84). Проинфламацијски цитокини стимулишу продукцију молекула RANKL који се везује за своје ћелијске рецепторе RANK, што индукује диференцијацију проостеокласта у остеокласте. Остеокласти ресорбују коштану ткиво и на тај начин доприносе развоју периапексне лезије (160).

IL-1 β игра централну улогу у неколико хроничних болести и један је од најактивнијих стимулатора коштане ресорпције (161). Већ је показано да се експресија IL-1 β повећава у периапексним лезијама (162), и смањује се после ендодонтског лечења (163).

Проинфламацијски цитокин IL-1 β је кључни регулатор реакције домаћина на присуство микроорганизама и може појачати ресорпцију кости и инхибирати стварање нове кости (164). IL-1 β такође може играти улогу у покретању и регулацији запаљеног одговора у апикалном пародонтитису повећавањем нивоа IL-6 и производње простагландина E2 (165). Морсани и сарадници су показали да повећана производња IL-1 β може допринети повећаној подложности развоју упорног апикалног пародонтитиса (162).

Наши резултати показују да не постоји већа експресија IL-1 β у периапексним лезијама у поређењу са контролном групом.

Истраживање Роровске и сар. показало је умерену позитивну корелацију, што значи да су у групама већих лезија откривене веће количине IL-1 β . Међутим, показано је и да постоје мање лезије које садрже велике количине IL-1 β и велике лезије са једва мерљивим количинама IL-1 β (167).

Добијени резултати показују да нема разлике у експресији IL-1 β у групама испитаника са малим и великим периапексним лезијама. Наши резултати су у складу са резултатима које су добили Gazivoda и сарадници (166).

Rorovska и сар. показали су већу концентрацију IL-1 β у периапексном ткиву у раној фази развоја гранулома и у хроничним лезијама које показују знаке егзацербације (167). За разлику од ових истраживања, резултати Jakovljevića и сар. показују да је концентрација IL-1 β значајно већа у радикалним цистама у поређењу с периапексним грануломима (168). Према резултатима Meghji-а и сар. IL-1 β детектован је само у узорцима запаљенских радикуларних циста (169,170).

Резултати наше студије су показали да нема разлике у експресији IL-1 β међу групама са грануломима и са цистама.

IL-6 спада у проинфламацијске цитокине који има способност да активира окстеокласте који учествују у процесу коштане ресорпције. Полиморфонуклеарни леукоцити у ткиву периапексних лезија продукују IL-6 што указује на то да он може имати улогу у ткивној деструкцији у току развоја периапексних лезија (171). Синергистички са IL-1 β у различитим ћелијама стимулише продукцију простагландина, који такође подстичу коштану ресорпцију (172). У неколико студије показана је експресија IL-6 у периапексним лезијама (125,170).

Наши резултати показују да постоји експресија IL-6 и у групи периапексних лезија и у контролној групи, и да не постоји значајна разлика између ове две групе. С тим што постоји велики број узорака из обе групе где није детектована експресија IL-6. Нема разлике у експресији између малих и великих периапексних лезија, као ни између гранулома и циста.

У истраживању Gazivode и сар. уочена је већа продукција IL-6 у периапексном ткиву са великим лезијама (166).

Разлике у резултатима се могу објаснити и тиме да IL-6 може имати и проинфламацијско и антиинфламацијско дејство у зависности од тога са којим цитокинима делује и на које ћелије. Тако да постоје студије које показују да он може штитити коштану ткиво од деструкције (64, 174).

У периапексним лезијама показана је значајна продукција IL-8, проинфламацијског цитокина, којег продукују различите хематопоетске и стромалне ћелије (173, 175). Овај проинфламацијски цитокин има изразиту хемогасну активност и један је од првих цитокина који се секретују на месту инфламације а који појачава миграцију неутрофилних гранулоцита (182). Његова продукција се повећава у симптоматским периапексним лезијама због већег присуства полиморфонуклеарних леукоцита и других инфламаторних ћелија (166).

Резултати једне студије сугеришу да су липопротеини, као компонента *Streptococcus gordonii* – Gram позитивне оралне бактерије која се често налази у периапексним лезијама, важан фактор за индукцију производње IL-8 у хуманим ћелијама периодонталног лигамента путем TLR2 активације (183).

Повећана производња IL8 је установљена и код пародонтопатије и гингивитиса, а ниво експресије овог интерлеукина је у позитивној корелацији са тежином клиничке скике (178).

Хит шок протеини, као антигени, могу значајно да утичу на продукцију проинфламацијских цитокина (179,180)

Сматра се да под утицајем GroEL хумани фибробласти гингиве појачано продукују IL6 и IL8 (181)

Ова студија је показала да постоји значајна разлика у експресији IL-8 у периапексним лезијама у поређењу са контролном групом. Наши резултати су у складу са резултатима других аутора (173,175).

Нема разлике у експресији IL-8 у периапексном ткиву међу испитаницима са малим и великим лезијама и међу испитаницима са грануломима и цистама.

У нашој студији је анализирана експресија два цитокина из фамилије IL-12, IL-12 p40 и IL-23 p35, које продукују макрофаги и дендритске ћелије.

Ћolić и сар. су позакали да IL-12 и IL-23 могу потенцирати продукцију IFN- γ , и тако посредно утицати на развој периапексне лезије (156).

Резултати наше студије су показали да не постоји повећана релативна експресија IL-12 p40 и IL-23 p35 у периапексним лезијама у односу на контролну групу, као ни између периапексних гранулома и радикалних циста. Мале периапексне лезије имају значајно мању релативну експресију IL-23 p35. Већа експресија GroEL удружена са већом експресијом IL-12 p40.

TNF- α је посредник остеокластичне активности у стањима запаљенске остеоллизе као што је периапексна лезија (184) и показана је експресија овог цитокина у периапексним лезијама (185).

Као одговор на бактеријске продукте, LPS, макрофаги продукују проинфламацијски цитокин TNF- α (186). TNF- α могу да продукују и NK ћелије, CD4+ Т лимфоцити, неутрофили, еозинофили и мастоцити. Експресија проинфламацијског цитокина TNF- α у периапексним лезијама доказана у бројним студијама (187). Бактеријски шаперони су, слично активности TNF- α , такође познати као снажни активатори остеолитичке активности (188).

Резултати ове студије показују да постоји значајна разлика у експресији TNF- α у периапексним лезијама у поређењу са периапексним ткивом контролне групе. Такође је у групи гранулома детектована значајно већа експресија TNF- α у него у групи испитаника са радикалним цистама.

Сматра се да различити фактори у организму могу утицати на степен експресије проинфламацијских цитокина у ткиву периапексних лезија. Једна студија која је изведена код оваријектомисаним пацова је показала да хормонски статус значајно утиче на експресију проинфламацијских цитокина у периапексним лезијама. Наиме, код оваријектомисаних пацова са периапексним лезијама је била значајно повишена експресија IL-1 β , TNF- α и IL-6, па се може претпоставити да хипоестрогено стање погоршава запаљење и деградацију компонената ванћелијског матрикса у периапексним лезијама, што може пружити увид у разумевање развоја периапексних лезија код жена у постменопаузи (189).

Подаци из литературе показују да протеин бактеријског топлотног шока (GroEL, Сrp60), пореклом из различитих бактерија, индукује експресију цитокина у

ћелијама имунског система домаћина (190, 191). Познато је да шаперонин Срп60 из *Mycobacterium tuberculosis* индукује производњу TNF- α у ћелијској линији хуманих моноцита, *THP-1*(192,193).

Како смо се у овом истраживању, по први пут, бавили испитивањем експресије бактеријског хит шок протеина HSP60 (GroEL), циљ нам је био да испитамо и корелацију између експресије хит шок протеина и проинфламацијских цитокина урођене имуности (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α).

Постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије HSP60 и IL-1 β у смислу да су је већа експресија HSP60 удружена са већом релативном експресијом IL-1 β . То је веома значајан податак, када знамо да је IL-1 β проинфламацијски цитокин са снажним деловањем у периапексном ткиву у току развоја периапексне лезије у смислу промоције запаљењских реакција и ресорпције коштаног ткива (164).

Показали смо да постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије GroEL и експресије IL-6, TNF- α и IL-12. Већа експресија GroEL у периапексним лезијама удружена је са већом експресијом цитокина IL-6, TNF- α и IL-12 у овим лезијама. IL-6, TNF- α и IL-12 такође спадају у проинфламацијске цитокине чија је активност у процесу настанка и развоја периапексних лезија доказана (173,187) али се до сада није разматрала њихова повезаност са бактеријским хит шок протеином GroEL. По први пут је у овој студији показано да постоји значајна повезаност између веће експресије GroEL и веће експресије проинфламацијских цитокина IL-6, TNF- α и IL-12 у ткиву периапексних лезија, а ова позитивна корелација указује да би GroEL могао да буде значајан фактор у настанку и развоју периапексних лезија. Ти резултати су у корелацији са истраживањима која су се бавила утицајем бактеријских хит шок протеина на експресију TNF- α (194,195).

6.3. Th цитокини

У овој студији бавили смо се испитивањем експресије Th цитокина, и то Th1 цитокина (IFN- γ) и Th2 цитокина (IL-4, IL-5 и IL13), обзиром да је позната њихова улога у развоју имунских процеса у периапексним лезијама (174). Наиме, доказано је да у почетним фазама инфекције доминирају Th1 лимфоцити који делују проинфламацијски и подстичу одговор домаћина на антигенски материјал, док у каснијим фазама долази до доминације Th2 лимфоцита који продукују цитокине који подстичу репарацију оштећеног ткива. Клиничка и претклиничка испитивања пародонталних и периапексних лезија указују да проинфламацијски цитокини директно модулирају експресију RANKL/OPG и на тај начин подстичу напредовање лезије, заједно са про-остеокластогеном подршком коју пружају Th1, Th17 и B лимфоцити. Супротно томе, сарадња између Th2 и *Tregs* лимфоцита ствара антиинфламацијски и прорепарацијски миље повезан са стабилношћу лезија (196).

IFN- γ активира макрофаге и подстиче фагоцитозу, повећава цитотоксичку активност CD8+T лимфоцита, и NK- ћелија (4). Сматра се да овај цитокин може имати улогу у регулисању производње проинфламацијских медијатора запаљења и активацији ефекторских T лимфоцита у периапексним лезијама обзиром да има улогу у активацији макрофага (132). Међутим, INF- γ такође игра важну улогу у метаболизму кости јер у инфламацијској средини, механизмом негативне повратне спреге спречава прекомерну ресорпцију кости узроковану повећаном секрецијом RANKL- (197). Истраживања на IFN- γ „*knock-out*” мишевима показала су да IFN- γ може да супримира развој периапексних лезија (198).

Gazivoda и сар. су детектовали IFN- γ на нивоу протеина у свим узорцима периапексних лезија, без значајне разлике између малих и великих, и симптоматских и асимптоматских периапексних лезија (174).

Резултати ове студије показују експресију INF- γ у свим узорцима периапексних лезија. Експресија INF- γ је статистички значајно већа у периапексним лезијама у

поређењу са експресијом у периапексном ткиву здравих испитаника. Није пронађена статистички значајна разлика у експресији INF- γ међу групама испитаника са грануломима и радикалним цистама, али је експресија INF- γ у малим лезијама значајно већа у поређењу са експресијом у великим лезијама.

Познато је да хумани HSP60 изазива снажан проинфламацијски одговор у ћелијама урођене имуности. HSP60, у присуству APC, стимулише продукцију великих количина INF- γ у Т лимфоцитима (199).

Обзиром да INF- γ регулише активност бројних ћелија имунског система и тако остварује значајне имуномодулаторне ефекте испитана је корелација експресије овог цитокина и експресије HSP60 и GroEL. Резултати ове студије показују да постоји статистички значајна позитивна корелација између експресије бактеријског HSP60 и експресије INF- γ у периапексном ткиву.

Th2 ћелије су главни извор IL-4, али поред њих, овај интерлеукин стварају и мастоцити и други лимфоцити (200). Обзиром да IL-4 може имати улогу у диференцијацији Th2 ћелија и стимулацији продукције IgG и IgE, то указује да овај цитокин може стимулирати хуморални имунски одговор у периапексним лезијама (201). IL-4 има инхибиторни ефекат на функцију макрофага (174).

У овој студији је показано да је експресија IL-4 значајно мања у узорцима периапексних лезија у него у узорцима контролне групе, док значајне разлике у експресији IL-5 и IL-13 међу групама није било. Група гранулома има значајно мању експресију IL-4 него група радикалних цисти, док значајне разлике међу овим групама у експресији IL-5 нема. Нема статистички значајне разлике у експресији IL-4 и IL-5 у периапексном ткиву између група малих и великих лезија.

Наша студија корелације показала је да постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије GroEL и IL-5 и IL-13. Већа експресија GroEL удружена је са већом експресијом IL-5 и IL-13.

6.4. Антиинфламацијски цитокини

Како би се спречило прекомерно оштећење ткива, инфламацијски процеси морају бити контролисани. Један од најважнијих имунорегулаторних цитокина је IL-10, и његово присуство и улога у развоју периапексних лезија је доказана у бројним студијама (198, 202).

Ћелије које продукују овај цитокин су В и Т лимфоцити, фибробласти и макрофаги. Он има способност инхибирања синтезе проинфламацијских цитокина као што су INF- γ , IL-2, IL-3, TNF- α , стимулише В лимфоците да продукују антитела и може имати супресорску активност на антигенпрезентујућу способност антиген-презентујућих ћелија (202).

Све те особине чине га цитокином са израженим антиинфламацијским својством.

Наши резултати су показали да испитаници експерименталне групе имају значајно мању експресију IL-10 у поређењу са контролном групом здравих испитаника. Не постоји статистички значајна разлика између група у којима су се налазили грануломи и радикалне цисте, док су испитаници са малим лезијама имају значајно већу експресију IL-10 него испитаници са великим лезијама.

Cpr60 из *Mycobacterium tuberculosis*, након стимулације *Toll like* рецептора 2 (TLR2) на макрофагима индукује производњу антиинфламацијског цитокина IL-10 (203). Антизапаљенска активност IL-10 је добро позната и кључна је у контроли пародонталних болести и инхибицији ресорпције костију (204).

Иако је претходно показано да протеин GroEl бактерије *Actinobacillusactinomycetemcomitans* може индуковати производњу IFN- γ и IL-10 у CD4 + Т лимфоцитима (184), као и да се експресија IL-10 у хуманим моноцитима повећава након стимулације GroEl-ом (190), у овој студији није показана корелација у експресији IL-10 и GroEl (Cpr60) у ткиву периапексних лезија. Уместо тога, уочена је већа експресија IL-10 у здравом ткиву у поређењу са ткивом периапексних лезија. Недавно студија је показала повећану експресију IL-

10 у периапексном ткиву 7 дана након ендодонтског третмана зуба (205). С тога би могло бити могуће да је мања експресија IL-10 у ткиву периапикалних лезија и одсуство корелације са експресијом Ccrp60, повезано са клиничким карактеристикама ових лезија.

7. ЗАКЉУЧЦИ

Добијени резултати указују да експресија протеина бактеријског топлотног шока у ткиву периапексних лезија снажно корелира са експресијом проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-12, и експресијом IFN- γ , цитокина који продукују Th1 лимфоцити, ћелије које учествују у развоју периапексних лезија, што коначно указује да Cpn60 (HSP60, GroE1) вероватно игра улогу стимулатора инфламацијског одговора у периапексном ткиву, тј. да је један од актера у патогенези периапексних лезија (слика 5).

На основу спроведеног истраживања и добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Експресија хит шок протеина HSP60 и GroEL у периапексним лезијама је значајно већа у односу на здраво периапексно ткиво.
2. Експресија проинфламацијских цитокина IL-8 и TNF- α је значајно већа у периапексним лезијама него у здравом периапексном ткиву, а међу групама нема разлике у експресији проинфламацијских цитокина IL-1, IL-6, IL-12 и IL-23.
3. Експресија Th1 цитокина, IFN- γ је значајно већа у периапексним лезијама него у здравом периапексном ткиву.
4. Експресија Th2 цитокина, IL-4, је значајно мања у узорцима периапексних лезија него у контролној групи, док међу групама нема значајне разлике у експресији IL-5 и IL-13.
5. Експресија проинфламацијског цитокина, IL-10, је значајно већа у здравом ткиву него у ткиву периапексних лезија.
6. Експресија IL-23 је значајно мања, а експресија IL-10 и IFN- γ значајно већа у групама испитаника са малим лезијама у поређењу са групом испитаника са великим лезијама.

7. Већа експресија хит шок протеина HSP60 удружена је са већом експресијом проинфламацијског цитокина IL-1.
8. Постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије хит шок протеина GroEL и експресије проинфламацијских цитокина IL-6, TNF- α и IL-12.
9. Постоји статистички значајна позитивна повезаност експресије хит шок протеина HSP60 и експресије Th1 цитокина, IFN- γ .
10. Већа експресија хит шок протеина GroEL удружена је са већом експресијом Th2 цитокина, IL-5 и IL-13.
11. Испитаници са грануломом имају значајно већу експресију хит шок протеина HSP60 и GroEL у периапексном ткиву него испитаници са радикалним цистама.
12. Испитаници са грануломом имају значајно мању експресију IL-1 β и IL-4, а значајно већу експресију TNF- α у поређењу са групом испитаника са радикалним цистама.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6:89–96.
2. Nair, P. N. (1997). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." *Periodontol* 2000 13: 121-48.
3. Sundquist G. Bacteriological studies of necrotic pulps. Umea: University of Umea; 1976.
4. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:348-81.
5. Torabinejad M, Kettering J (1985). Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 11:122–125.
6. Petrović V, Čolić S. Periapikalne lezije. Beograd: Velarta; 2001.
7. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9:498–521.
8. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31:311-25.
9. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy* 1974;25:347-58.
10. Miller WD. The micro-organisms of the human mouth. Philadelphia: White Dental Mfg. Co.; 1890.
11. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009; 88: 969–81.

12. Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006;55:101-7.
13. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3599-606.
14. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427–430.
15. Jiang, Y. and H. Schilder (2002). "An optimal host response to a bacterium may require the interaction of leukocytes and resident host cells." *J Endod* 28(4): 279-82.
16. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, Schrenzel J, Lazarevic V. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. *Front Microbiol* 2018;9:2374.
17. Nair, P. N., U. Sjogren, G. Krey, K. E. Kahnberg and G. Sundqvist (1990a). "Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study." *J Endod* 16(12): 580-8.
18. Nair, P. N., S. Henry, V. Cano and J. Vera (2005). "Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99(2): 231-52.
19. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340–9.
20. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE (1996). Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 81:93–102.

21. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Jan;81(1):93-102.
22. Fabricius, L., G. Dahlén, A. Öhman and Å. J. Möller (1982). "Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canal after varied times of closure." *Scandinavian Journal of Dental Research* 90: 134–44. 0010
23. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 2007; 18: 267–80.
24. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):162-9.
25. Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endod J.* 2001 Oct;34(7):506-13.
26. Henderson B, Poole S, Wilson M (1996). Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 60:316-341
27. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1980 Apr;28(1):258-68.
28. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol.* 2012 May 4;3:95.
29. Tissières, Alfred & Mitchell, Herschel & Tracy, Ursula. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology.* 84. 389-98. 10.1016/0022-2836(74)90447-1.

30. Khguzg Rensing SA, Maier UG. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family *J Mol Evol*, 1994, 39, 80–86.
31. Srivastava P. New jobs for ancient chaperones *Sci Am*, 2008, 1, 50–55.
32. Barišić K, Galović Rengel R, Žanić Grubišić T. Stresni proteini i njihov klinički značaj *Biochem Medica*, 2003, 3, 101–107.
33. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*. 1998;16(9):833-838.
34. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996;381(6583):571-579.
35. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(19):1564-1572.
36. Brodsky JL, Chiosis G. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and identification of small molecule modulators. *Curr Top Med Chem*. 2006;6:1215–1225.
37. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*. 1999;24(4):136-141.
38. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:349-384.
39. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):253-66.
40. Polla, B. S., S. Baladi, K. Fuller and G. Rook (1995). "Presence of hsp65 in bacterial extracts (OM-89): a possible mediator of orally-induced tolerance?" *Experientia* 51(8): 775-9.

41. Tabeta K, Yamazaki K Analysis of immune responses to purified recombinant antigens of periodontal pathogens. *Methods Mol Biol.* 2010;666:345-57
42. Braig K; Otwinowski Z; Hegde R; et al. (oktobar 1994). „The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å”. *Nature.* 371 (6498): 578—86. PMID 7935790
43. Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Remaley AT, Csako G, Thomas F, Patterson AP, Eggerman TL. Targeting of scavenger receptor class B type I by synthetic amphipathic alpha-helical-containing peptides blocks lipopolysaccharide (LPS) uptake and LPS-induced pro-inflammatory cytokine responses in THP-1 monocyte cells. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):36072-82
44. Chen Q, Wu G, Chen H, Li H, Li S, Zhang C, Pang X, Wang L, Zhao L, Shen J. Quantification of Human Oral and Fecal *Streptococcus parasanguinis* by Use of Quantitative Real-Time PCR Targeting the groEL Gene. *Front Microbiol.* 2019 Dec 20;10:2910.
45. Links MG, Dumonceaux TJ, Hemmingsen SM, Hill JE. The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. *PLoS One.* 2012;7(11):e49755
46. Bansal A, Paliwal PK, Sagi SS, Sairam M. Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of *Salmonella typhi* against *S. typhi* infection. *Mol Cell Biochem.* 2010;337(1-2):213-221
47. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog.* 2017;113:303-311
48. Lin FY, Hsiao FP, Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Tsai CS, Yang SF, Chang NC, Hung SL, Lin YW. *Porphyromonas gingivalis* GroEL induces

- osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7):e102450.
49. Živković S, Miljušković D. Endodontska terapija hroničnih apeksnih parodontita. Beograd: DANUBIUS-DENTAL; 2003.
 50. Weine FS. Endodontic therapy. St.Louis: Mosby; 1996.
 51. Spatafore CM, Griffin JA Jr, Keyes GG, Wearden S, Skidmore AE. Periapical biopsy report: an analysis of over a 10-year period. *J Endod*. 1990;16:239-41.
 52. SHEAR M (1992) Cysts of the Oral Regions. (3rd edn.) Oxford: Wright,136–70.
 53. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl): 474–84.
 54. Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J*. 1993;26:131-6.
 55. Kovác J, Kovác D. Histopatológia a etiopatogenéza chronickej apikálnej parodontitídy--periapikálnych granulómov [Histopathology and etiopathogenesis of chronic apical periodontitis--periapical granuloma]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2011 Jun;60(2):77-86. Slovak. PMID: 21838176.
 56. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15:139-50.
 57. Bernardi L, Visioli F, Nör C, Rados PV. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *J Endod*. 2015 Dec;41(12):1951-61.
 58. Eggmann F, Connert T, Bühler J, Dagassan-Berndt D, Weiger R, Walter C. Do periapical and periodontal pathologies affect Schneiderian membrane appearance? Systematic review of studies using cone-beam computed tomography. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1611-1630.

59. Andonovska B, Dimova C, Panov S. Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2008 Dec;65(12):882-6.
60. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.
61. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal?. *Int Endod J.* 1998;31(3):155-160.
62. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997;13:121-148.
63. Nair PNR. Non-Microbial Endodontic Disease. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics.* Hamilton: BC Decker Inc.; 2008.
64. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun.* 2001 Feb;69(2):744-50.
65. Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jan;34(1):46-52.
66. Petrović V. Hronične periapikalne lezije. U: Todorović L, urednik. *Oralna hirurgija.* Beograd: Nauka; 2007.
67. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2012;2:1-15.
68. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003; 36(7): 464–71.
69. Nagase, H., A. J. Barrett and J. F. Woessner, Jr. (1992). "Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases." *Matrix Suppl* 1: 421-4.

70. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endod.* 1994;20(1):13-17.
71. Suzuki N, Okiji T, Suda H. Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. *Arch Oral Biol* 1999; 44(1): 67–79.
72. N Kawashima, P Stashenko Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol.* 1999 Jan;44(1):55-66.
73. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):14-20.
74. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13.
75. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020 Jun 15;877:173090.
76. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 2014;40:155-63.
77. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(1): 1–8.
78. Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(4): 511–21.
79. Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Apr;286(4):C739-44.

80. Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002 Mar;23(3):130-5.
81. Lukic, A., V. Danilovic and R. Petrovic (2008). "[Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions]." *Vojnosanit Pregl* 65(6): 435-40.
82. Rubtsov AV, Rubtsova K, Kappler JW, Jacobelli J, Friedman RS, Marrack P. CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs. *J Immunol.* 2015 Jul 1;195(1):71-9.
83. Lukic A, Arsenijević N, Vujanić G, Ramić Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod.* 1990;16(3):119-22
84. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38:605-11.
85. Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10(3): 121–8.
86. Colic M, Lukic A, Vucevic D et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol* 2006: 51: 1120–1130.
87. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Majstorović I, Vasiljić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):997-1002.
88. Stashenko P, Yu SM, Wang C-Y (1992). Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 18:422–426.

89. Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92(2): 221–7
90. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3.
91. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010;89(12):1349-63.
92. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/ Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004; 35: 21 41.
93. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. *J Endod* 1981; 7: 447-52.
94. Mihailovic B. Magistarski rad „Histološka i imunocitohemijska istraživanja hroničnih periapikalnih procesa“, 1994 god. Priština.
95. Kuntz DD, Genco RJ, Guttuso J, Natiella JR. Localization of immunoglobulins and the third component of complement in dental periapical lesions. *J Endod* 1977;3(2): 68–73.
96. Lukić A. Immunopathophysiology of pulp disease in apical parodontium. In: Milenković P, editor. *Pathological physiology*. Belgrade: Belgrade University; 2003. p. 176–84.
97. Smith G, Matthews JB, Smith AJ, Browne RM. Immunoglobulin-producing cells in human odontogenic cysts. *J Oral Pathol* 1987; 16:45-8.
98. Skaug N. Proteins in fluids from non-keratinizing jaw cysts: 4. Concentration of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) and some non-immunoglobulin proteins: relevance to concepts of cyst wall permeability and clearance of cyst proteins. *J Oral Pathol* 1974; 3: 47-61.

99. Torabinejad M, Kiger RD. Experimentally induced alterations in periapical tissues of the cat. *J Dent Res.* 1980;59(1):87-96.
100. Torabinejad M, Clagett J, Engel D. A cat model for evaluation of mechanism of bone resorption; induction of bone loss by simulated immune complexes and inhibition by indomethacin. *Calcif Tissue Int* 1979; 29: 207-14.
101. Roodman GD:Cell biology of the osteoclast.*Exp Hematol* 1999;27. 1229-1241.
102. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki SI, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Higashio K. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 1999; 25, 109-113.
103. Feng X.: RANKing intracellular signaling in osteoclast. *IUBMB Life* 2005; 57, 389-395.
104. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, Anderson K, Hanein D, Geiger B, Addadi L.: The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PloS ONE* 2007; 2:e 179.
105. Edwards JR, Mundy GR. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Apr;7(4):235-43.
106. Puzas JE, Ishibe M. Osteoblast/osteoclast coupling. In:Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of the osteoclast.* Boca Raton: CRC Press; 1992. p.337–56.
107. Cotti E, Torabinejad M. Detection of leukotriene C4 in human periradicular lesions. *Int Endod J* 1994; 27(2): 82–6.
108. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 1994; 277(1): 19–26.

109. Abbas, K. A. and H. A. Lichtman (2019). *Basic Immunology*. 6th Edition, New York, Elsevier Inc.
110. Hasegawa T, Venkata Suresh V, Yahata Y, Nakano M, Suzuki S, Suzuki S, Yamada S, Kitaura H, Mizoguchi I, Noiri Y, Handa K, Saito M. Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation. *Sci Rep*. 2021 Jan 28;11(1):2613.
111. Lim CG, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD (1994). Interleukin 1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 20:225–227.
112. Ataoglu T, Üngör M, Serpek B, Haliloglu S, Ataoglu H, Ari H (2002). Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *Int Endod J* 35:181–185.
113. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Aug;10(4):213-9.
114. Hamachi T, Anan H, Akamine A, Fujise O, Maeda K. Detection of interleukin-1 beta mRNA in rat periapical lesions. *J Endod* 1995; 21(3): 118–21.
115. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(3):334–6.
116. Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta periapical exudates of infected root canals: Correlations with the clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 1994; 20(9): 432–5.
117. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996; 22(6): 311–6.

118. Wang C, Stashenko P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiology & Immunology* 1993;8:50–6.
119. Gowen MD, Wood DD, Ihire EJ, McGuire MKB, Russel RGG. An interleukin-1-like factor stimulate bone resorption in vitro. *Nature* 1983;306:378-80.
120. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.
121. Abdolsamadi HR, Vahedi M, Esmaeili F, Nazari S, Abdollahzadeh S. Serum interleukin-6 as a serologic marker of chronic periapical lesions: A case-control study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2008; 2:43–7.
122. Prso IB, Kocjan W, Simić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:38210.
123. De Sá AR, Pimenta FJGS, Dutra WO, Gomez RS. Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin α in dental granuloma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96:356–60.
124. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2014; 47:615–21.
125. Brekalo Pršo I, Kocjan W, Šimić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:38210.
126. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007 Apr;86(4):306-19.

127. Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua DJ. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):719-29.
128. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715-25.
129. Artese L, Platteli A, Quaranta M, Colosante A, Musiani P. Immunoreactivity for interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 1991;17:483-7.
130. Safavi KE, Rossomando ER. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 1991;17:12– 4.
131. Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KBS, et al. Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:404 – 9.
132. Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma and Y. T. Konttinen (2003). "Regulation of macrophage activation." *Cell Mol Life Sci* 60(11): 2334-46.
133. McLeod JJ, Baker B, Ryan JJ. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine*. 2015 Sep;75(1):57-61.
134. Choj EHS, Panayi GS. Mechanisms of Disease: Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2001;344: 907-16.
135. Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* 24(6): 677-88.

136. Colić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vučević D, Marjanović M, Lukić A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci.* 2007 Aug;115(4):315-20.
137. Li, M. O. and R. A. Flavell (2008). "TGF-beta: a master of all T cell trades." *Cell* 134(3): 392-404.
138. Couper, K. N., D. G. Blount and E. M. Riley (2008). "IL-10: the master regulator of immunity to infection." *J Immunol* 180(9): 5771-7.
139. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41.
140. Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* 2000; 108:195–201.
141. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, et al. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45(1): 70-76.
142. Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Two novel real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4759-64.
143. Uyaguari-Diaz MI, Chan M, Chaban BL, Croxen MA, Finke JF, Hill JE, Peabody MA, Van Rossum T, Suttle CA, Brinkman FS, Isaac-Renton J, Prystajecy NA, Tang P. A comprehensive method for amplicon-based and metagenomic characterization of viruses, bacteria, and eukaryotes in freshwater samples. *Microbiome.* 2016 Jul 19;4(1):20.
144. Ilić J, Vujašković M, Tihacek-Šojić L, Milić-Lemić A. Frequency and quality of root canal fillings in an adult Serbian population. *Srp Arh Celok Lek.* 2014;142:663-8.)

145. Bansal A, Paliwal PK, Sagi SS, Sairam M. Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of *Salmonella typhi* against *S. typhi* infection. *Mol Cell Biochem* 2010; 337(1-2): 213-221.)
146. Goh SH, Potter S, Wood JO, Hemmingsen SM, Reynolds RP, Chow AW. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J ClinMicrobiol* 1996; 34(4): 818-23.
147. Brousseau R, Hill JE, Préfontaine G, Goh SH, Harel J, Hemmingsen SM. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4828-33.
148. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules*. 2018 Nov 1;23(11):2846.
149. Goodman SC, Letra A, Dorn S Expression of heat shock proteins in periapical granulomas. *J Endod*. 2014; 40: 830-6
150. Leonardi R, Villari L, Caltabiano M, Heat shock protein 27 expression in the epithelium of periapical lesions. *JEndod*. 2001; 27: 89-92.
151. Andisheh-Tadbir A, Fakharian M. HSP70 expression in dentigerous cyst, odontogenic keratocyst, and ameloblastoma. *Oral Maxillofac Surg*. 2015; 19: 287-91.
152. Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions *J Oral Pathol Med*. 2002; 31: 488-93.)
153. Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D, Uitto V. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillusactinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 182: 231–235.

154. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(1): 35-40.).
155. KanwalMaheshwari, Renato M. Silva, Leticia Guajardo-Morales, Gustavo P. Garlet, Alexandre R. Vieira, Ariadne Letra. Heat Shock70 Protein Genes and Genetic Susceptibility to Apical Periodontitis. *J Endod.* 2016; 42(10): 1467–1471.)
156. Colic, M., D. Gazivoda, I. Majstorovic, A. Dragicevic, S. Vasilijic, R. Rudolf, P. Milosavljevic and D. Vucevic (2009b). "Expression and Function of IL-27 in Human Periapical Lesions."
157. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(3):334–6.
158. Hasan A, Sadoh D, Palmer R, Foo M, Marber M, Lehner T. The immune responses to human and microbial heat shock proteins in periodontal disease with and without coronary heart disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 142(3): 585-94.
159. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, Yoshie H, Seymour GJ. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun.* 2002;70(5):2492-501.
160. Menezes R, Garlet TP, Letra A, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod.* 2008;34:932-8.
161. De Sa AR, Moreira PR, Xavier GM, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J* 2007;40:563–72.
162. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:455–9.

163. De Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38:481–5.
164. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J*. 2008;41:6–31.
165. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod*. 2012;38:740–5.
166. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*. 2009 Aug;38(7):605-11.
167. Popovska L, Dimova C, Evrosimoska B, Stojanovska V, Muratovska I, Četenović B, Marković D. Relationship between IL-1 β production and endodontic status of human periapical lesions. *Vojnosanitetski preglad* 2017, vol. 74, iss. 12, pp. 1134-1139.
168. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J* 2015; 41(2): 72–7.
169. Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol* 1996; 41(6): 523–31.
170. Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Enzyme histochemical characterization of mononuclear cells in human dental periapical chronic inflammatory lesions. *Scand J Dent Res* 1984; 92(4):325–33.
171. Silva RAB, Sousa-Pereira AP, Lucisano MP, Romualdo PC, Paula-Silva FWG, Consolaro A, Silva LAB, Nelson-Filho P. Alendronate inhibits osteocyte

- apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. *Int Endod J.* 2020 Jan;53(1):84-96.
172. Danin, J., L. E. Linder, G. Lundqvist and L. Andersson (2000). "Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90(4): 514-7.
173. Lukic A, Vojvodic D, Majstorovic I, Colic M. Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 296–300.
174. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009 Nov;47(1):101-13.
175. Marton IJ, Rot A, Schwarzinger E, et al. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 63–5.
176. Iizasa H, Matsushima K. IL-8. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, ed. *Cytokine reference*. San Diego, CA: Academic Press, 2001: 1061–1067.
177. Kim AR, Ahn KB, Kim HY, Seo HS, Kum KY, Yun CH, Han SH. *Streptococcus gordonii* lipoproteins induce IL-8 in human periodontal ligament cells. *Mol Immunol.* 2017 Nov;91:218-224.
178. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001 Jun;36(3):194-203.
179. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* 2006;74:3693-3706.

180. Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:399-412.
181. Hinode D, Yoshioka M, Tanabe S, Miki O, Masuda K, Nakamura R. The GroEL-like protein from *Campylobacter rectus*: immunological characterization and interleukin-6 and -8 induction in human gingival fibroblast. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:1-6.
182. De Sa AR, Moreira PR, Xavier GM, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J* 2007;40:563–72
183. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(1): 35-40.).
184. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res* 2015; 2015: 615486.).
185. Álvares PR, de Arruda JAA, Oliveira Silva LV, da Silva LP, do Nascimento GJF, da Silveira MMF, Sobral APV. Immunohistochemical Analysis of Cyclooxygenase-2 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Periapical Lesions. *J Endod* 2018; 44(12): 1783-1787.)
186. Zhao S, Zhong Y, Fu X, Wang Y, Ye P, Cai J, Liu Y, Sun J, Mei Z, Jiang Y, Liu J. H3K4 Methylation Regulates LPS-Induced Proinflammatory Cytokine Expression and Release in Macrophages. *Shock*. 2019 Mar;51(3):401-406.
187. Mei LX, Jiang Y, Zhao CH, Liu Z, Zhang P. [Relationships between periapical lesion and IL-1, TNF-alpha gene expression in rat]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Sep;38(5):345-7. Chinese. PMID: 14680581.
188. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 1996; 64(7): 2371-80.

189. Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, Silva LAB, Nelson-Filho P. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod.* 2018 May;44(5):780-785.
190. Nalbant A, Saygılı T. IL12, IL10, IFN γ and TNF α Expression in Human Primary Monocytes Stimulated with Bacterial Heat Shock GroEL (Hsp64) Protein. *PLoS One* 2016; 11(4): e0154085.
191. Saygılı T, Akıncılar SC, Akgül B, Nalbant A. Aggregatibacter actinomycetemcomitans GroEL protein promotes conversion of human CD4⁺ T cells into IFN γ IL10 producing Tbet⁺ Th1 cells. *PLoS One* 2012; 7(11): e49252.
192. Torres-Huerta A, Villaseñor T, Flores-Alcantar A, Parada C, Alemán-Navarro E, Espitia C, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. Interaction of the CD43 Sialomucin with the Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 Chaperonin Leads to Tumor Necrosis Factor Alpha Production. *Infect Immun.* 2017; 85(3): e00915-16).
193. Cehovin A, Coates AR, Hu Y, Riffo-Vasquez Y, Tormay P, Botanch C, Altare F, Henderson B. Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2010; 78(7): 3196-206.
194. Marcatili A, Cipollaro de l'Ero G, Galdiero M, Folgore A, Petrillo G. TNF-alpha, IL-1 alpha, IL-6 and ICAM-1 expression in human keratinocytes stimulated in vitro with Escherichia coli heat-shock proteins. *Microbiology (Reading)*. 1997;143 (Pt 1):45-53.
195. Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with Propionibacterium acnes and P. acnes GroEL. *Br J Dermatol* 2004; 150(3): 421-8.

196. Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 2021 Jan;100(1):29-36.
197. Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura and T. Taniguchi (2000). "T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma." *Nature* 408(6812): 600-5
198. De Rossi, A., L. B. Rocha and M. A. Rossi (2008). "Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions." *J Endod* 34(1): 31-8.
199. Breloer M, Moré SH, Osterloh A, Stelter F, Jack RS, Bonin Av Av. Macrophages as main inducers of IFN-gamma in T cells following administration of human and mouse heat shock protein 60. *Int Immunol*. 2002 Nov;14(11):1247-53.
200. Ueki K, Tabeta K, Yoshie H, Yamazaki K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2002;127:72-77.
201. Mekori, Y. A. and D. D. Metcalfe (1999). "Mast cell-T cell interactions." *J Allergy Clin Immunol* 104(3 Pt 1): 517-23.
202. Menezes, R., T. P. Garlet, A. P. Trombone, C. E. Repeke, A. Letra, J. M. Granjeiro, A. P. Campanelli and G. P. Garlet (2008). "The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis." *J Endod* 34(12): 1480-4.
203. Parveen N, Varman R, Nair S, Das G, Ghosh S, Mukhopadhyay S. Endocytosis of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60 is required to induce

interleukin-10 production in macrophages. *J Biol Chem* 2013; 288(34): 24956-71.

204. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, Yang W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 284836.

205. Maia LM, Espaladori MC, Diniz JMB, Tavares WLF, de Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. Clinical endodontic procedures modulate periapical cytokine and chemokine gene expressions. *Clin Oral Investig* 2020; 24(10): 3691-3697.

БИОГРАФИЈА

Др Јелена Станишић Зиндовић рођена је у Призрену, 28.05.1982. године. Основну школу завршила је у Призрену, а Гимназију у Младеновцу са одличним успехом.

Дипломирала је 2009. године на одсеку стоматологије Медицинског факултета Универзитета у Приштини са седишем у Косовској Митровици са просеком 8,72. Након приправничког стажа обављеног на Медицинском Факултету у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици, положила је стручни испит.

Прву годину докторских академских студија уписала школске 2009/2010 године на Медицинском факултету Приштина у Косовској Митровици. Положила је све испите предвиђене планом и програмом академских докторских студија са просечном оценом 9,8. Одобрена јој је је тема докторске дисертације под називом „Испитивање корелације између експресије бактеријског хит шок протеина, проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина и хистопатолошких карактеристика периапексних лезија“ 2.7.2018.године

Од 2013. године ради као сарадник у настави на предмету Орална хирургија на Катедри за стоматологију Медицинског факултета Приштина, а 01.10.2018. године добија звање асистента. Специјализацију из Оралне хирургије завршила је 2017. године.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Станишић Зиндовић

број индекса 38/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИСПИТИВАЊЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКОГ ХИТ ШОК ПРОТЕИНА, ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ И АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА И ХИСТОПАТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА

- 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

Stanišić Jelena

У Косовској Митровици, 04.07.2021.

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора - Јелена Станишић Зиндовић

Број индекса 38/09

Студијски програм - Клиничка и експериментална стоматологија

Наслов рада - ИСПИТИВАЊЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ЕКСПРЕСИЈЕ
БАКТЕРИЈСКОГ ХИТ ШОК ПРОТЕИНА, ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ И
АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА И ХИСТОПАТОЛОШКИХ
КАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА

Ментор - Проф. Бранко Михаиловић

Потписани/а Stanišić Jelena

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

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 Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда

Stanišić Jelena

У Косовској Митровици, 04.07.2021.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ЕКСПРЕСИЈЕ БАКТЕРИЈСКОГ ХИТ ШОК ПРОТЕИНА, ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ И АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА И ХИСТОПАТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА

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 Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици 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

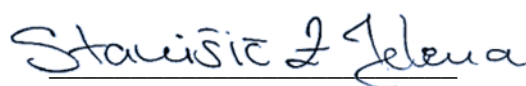
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

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 Косовској Митровици, 04.07.2021.