



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Сузана М. Живановић

**Утицај сојних разлика на патогенезу
периапикалних лезија зуба у два соја пацова
Dark Agouti и Albino Oxford**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Suzana M. Živanović

**Uticaj sojnih razlika na patogenezu
periapikalnih lezija zuba u dva soja pacova
Dark Agouti i Albino Oxford**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2021. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Suzana M. Zivanovic

**Influence of strain differences on the
pathogenesis of periapical tooth lesions in two
strains of rats Dark Agouti and Albino Oxford**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

Аутор
Име и презиме: Сузана Живановић
Датум и место рођења: 15.08.1991. године у Крагујевцу
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Утицај сојних разлика на патогенезу периапикалних лезија зуба у два соја пацова Dark Agouti и Albino Oxford
Број страница:
Број слика: 5 шема, 22 слике и 9 табела
Број библиографских података: 230
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Биљана Љујић, ванредни професор за ужу научну област Генетика, Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 13.12.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: 15.07.2020. године IV-03-473/18
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. доц. др Марина Газдић Јанковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник; 2. проф. др Весна Милетић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан; 3. проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан; 4. проф. др Весна Станковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан; 5. доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета . . .
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Suzana Živanović
Datum i mesto rođenja: 15.08.1991. godine u Kragujevcu
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj sojnih razlika na patogenezu periapikalnih lezija zuba u dva soja pacova Dark Agouti i Albino Oxford
Broj stranica:
Broj slika: 5 šema, 22 slike i 9 tabela
Broj bibliografskih podataka: 230
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor za užu naučnu oblast Genetika, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i obrana
Datum prijave teme: 13.12.2019. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: 15.07.2020. IV-03-473/18
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. doc. dr Marina Gazdić Janković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik; 2. prof. dr Vesna Miletić, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, član; 3. prof. dr Ivan Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija i Onkologija, član; 4. prof. dr Vesna Stanković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član; 5. doc. dr Miroslav Vasović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Oralna hirurgija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta 2. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta . . .
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Suzana Zivanovic
Date and place of birth: 15.08.1991. Kragujevac
Current employment: assistant, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Influence of strain differences on the pathogenesis of periapical tooth lesions in two strains of rats Dark Agouti and Albino Oxford
No. of pages:
No. of images: 5 schemes, 22 images and 9 tables
No. of bibliographic data: 230
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: title, name and surname, position, name of faculty / institute and university Assoc. Prof. Biljana Ljujić, Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 13.12.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: 15.07.2020. IV-03-473/18
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Assis. Prof. Marina Gazdić Janković, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Genetics, President; 2. Assoc. Prof. Vesna Miletić, Associate Professor at the Faculty of Dentistry, University of Belgrade, for the narrow scientific field of Dental Diseases and Endodontics, member; 3. Assoc. Prof. Ivan Jovanović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Microbiology and Immunology and Oncology, member; 4. Assoc. Prof. Vesna Stanković, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pathological Anatomy, member 5. Assis. Prof. Miroslav Vasović, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Oral Surgery, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> 1. title, name and surname, position, name of faculty / institute and university 2. title, name and surname, position, name of faculty / institute and university . . .
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Увод Периапикалне лезије настају као последица дејства микроорганизама и њихових продуката из инфицираног канала на периапикално ткиво. Ова инфламација може стимулирати деструкцију периапикалних ткива и узроковати ресорпцију алвеоларне кости при чему настаје периапикална лезија. Периапикалне лезије немају увек исте карактеристике. Ћелије и медијатори инфламације које су повезани са развојем и величином периапикалних лезија нису у потпуности разјашњени. Генетска подлога експерименталних животиња може утицати на патогенезу болести. Dark Agouti и Albino Oxford пацови се разликују у осетљивости на инфламаторне стимулусе и на индукцију експерименталних аутоимуних болести.

Циљ Циљ ове студије је био да испита ефекте разлика у имунолошкој реактивности на индукцију периапикалних лезија.

Материјал и методе Периапикалне лезије су индуковане код DA и AO пацова излагањем пулпе десних мандибуларних молара оралној средини. Жртвовање животиња је урађено 21 дан након индукције периапикалних лезија, мандибуле су изоловане и припремљене за радиографску и патохистолошку анализу. На ћелије периапикалних лезија примењен је PCR у реалном времену и проточна цитометрија. Ниво цитокина и параметра оксидативног стреса су мерени из прикупљених узорака крви и супернатанта хомогената периапикалних лезија. Добијени резултати анализирани су у софтверском програму за статистичку анализу података *Statistical Package for Social Sciences v23.0*. Статистичка анализа је урађена параметарским *One-Way ANOVA* и *T*- тестом независних узорака и непараметарским тестовима *Kruskal-Wallis H* и *Mann-Whitney U* зависно од нормалне расподеле података. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група је сматрана кад је $p < .05$.

Резултати Радиографском и патохистолошком анализом је показано да су DA пацови развили веће периапикалне лезије у односу на AO пацове. Инфилтрација неутрофилима и макрофагима је била значајно израженија у периапикалним лезијама DA пацова. Проточном цитометријом је показан већи проценат T ћелија, као и INF- γ CD3+CD4+, IL-17 CD3+CD4+, и IL-10 CD3+CD4+ ћелија у периапикалним лезијама DA пацова. Експресија гена који кодирају цитокине IL-1 β , INF- γ , и IL-17 је била већа код DA пацова. Експресија RANKL је била значајно већа код DA пацова, док је експресија OPG била већа код AO пацова. RANKL/OPG однос је значајно већи у DA пацова. Патолошки процес у периапикалним лезијама се рефлектује и на системски ниво проинфламаторних цитокина: TNF- α и IL-6 је већи код DA пацова. Маркери оксидативног стреса у системској циркулацији и супернатанту хомогената периапикалних су израженији у DA пацовима.

Закључак DA пацови су развили веће периапикалне лезије у односу на AO пацове. Генетски условљена разлика у имунолошкој реактивности снажно утиче на патогенезу експерименталних периапикалних. Познавање генетски заснованих разлика може допринети разумевању механизмима који повећавају инфламацију и прогресију периапикалних лезија.

Кључне речи периапикалне лезије, Dark Agouti и Albino Oxford пацови, сојне разлике, имуногенетске разлике

ABSTRACT

Introduction Periapical lesions develop as a consequence of microorganisms and their products from the infected canal on the periapical tissue. This inflammation can stimulate the destruction of periapical tissues and cause resorption of the alveolar bone, developing periapical lesion. Periapical lesions do not always have the same characteristics. Inflammatory cells and mediators associated with the development and size of periapical lesions have not been fully elucidated. The genetic background of experimental animals may influence the pathogenesis of the disease. Dark Agouti and Albino Oxford rats differ in their sensitivity to inflammatory stimuli and in the induction of experimental autoimmune diseases.

Aim The aim of this study was to determine the effects of differences in immune reactivity on the induction of periapical lesions.

Material and methods Periapical lesions were induced in DA and AO rats by exposing the pulp of the right mandibular molars to the oral environment. Animal sacrifice was performed 21 days after induction of periapical lesions, mandibles were dissected and prepared for radiographic and pathohistological analysis, as well as for the real-time PCR and flow cytometry. Cytokine levels and oxidative stress parameters were measured from collected blood samples and supernatant of homogenous periapical lesions. The obtained results were analyzed in the software program for statistical data analysis Statistical Package for Social Sciences v23.0. Statistical analysis was performed by parametric One-Way ANOVA and T-test of independent samples and nonparametric tests Kruskal-Wallis H and Mann - Whitney U depending on the normal data distribution. A statistically significant difference in the obtained values between the groups was considered when $p < .05$.

Results Radiographic and pathohistological analysis showed that DA rats developed larger periapical lesions compared to AO rats. Infiltration by neutrophils and macrophages was significantly more pronounced in periapical lesions of DA rats. Flow cytometry showed a higher percentage of CD3 + cells, as well as INF- γ CD3 + CD4 +, IL-17 CD3 + CD4 +, and IL-10 CD3 + CD4 + in periapical DA lesions. Expression of genes encoding the cytokines IL-1 β , INF- γ , and IL-17 was higher in DA rats. RANKL expression was significantly higher in DA rats, while OPG expression was higher in AO rats. The RANKL/OPG ratio was shown to be higher in the periapical lesions of DA rats. The pathological process in periapical lesions is also reflected on the systemic level of proinflammatory cytokines: TNF- α and IL-6 are higher in DA rats. Markers of oxidative stress in the systemic circulation and periapical homogenate supernatant are more pronounced in DA rats.

Conclusion DA rats developed larger periapical lesions compared to AO rats. The genetically determined difference in immune reactivity strongly influences the pathogenesis of experimental periapical lesions. Knowledge of genetically based differences may contribute to understanding the mechanisms that increase inflammation and progression of periapical lesions.

Key words periapical lesions, Dark Agouti and Albino Oxford rats, strain differences, immunogenetic differences

Ништа није коначно...ништа није случајно

*Мојим професоркама
проф. Лукић, проф. Поповић и проф. Љујић*

Посебну захвалност дугујем својим менторкама, проф. др Биљани Љујић и проф. др Александри Лукић на несебичној помоћи током израде докторске дисертације, као и на дивној сарадњи, разумевању и подрици.

Велику захвалност за помоћ у експерименталном раду и на корисним саветима, али и у целокупном обликовању дисертације дугујем проф. др Миодрагу Лукићу.

Захваљујем се Декану проф. др Владимиру Јаковљевићу и његовом тиму на челу са проф. др Владимиром Живковићем који су ми отворили врата лабораторије и помогли у експерименталном раду.

Захваљујем се доц. др Марини Милетић Ковачевић, доц. др Марини Газдић Јанковић, доц. др Немањи Јовичић и Сандри Николић за стручну и пријатељску помоћ током израде докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем мојим пријатељима, професорима и колегама са Катедре за стоматологију и из ординације “др Ракић” на разумевању, подрици и стрпљењу током израде докторске дисертације.

Захваљујем се др Тамари Вучићевић за помоћ, подрику и највећи ентузијазам у свим фазама докторске дисертацији.

Посебну захвалност дугујем др Милошу Папићу за највећу помоћ у свим фазама дисертације. Ова дисертација не би била иста без његове безграничне помоћи, подришке и најбитније безусловног пријатељства.

Хвала мојој породици на подрици, стрпљењу и безграничној љубави.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. ПЕРИАПИКАЛНО ТКИВО	1
1.2. ЕВОЛУЦИЈА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА	2
1.3. МИКРОБИОЛОШКА ФЛОРА КАНАЛА КОРЕНА И ПЕРИАПИКАЛНОГ ТКИВА.....	5
1.3.1. Бактерије	5
1.3.2. Вируси	5
1.3.3. Гљиве	5
1.4. ИНФЛАМАТОРНЕ ЋЕЛИЈЕ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА.....	5
1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА.....	7
1.5.1. Утицај цитокинског милеа на развој и прогресију периапикалних лезија	8
1.6. RANKL/OPG У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА.....	10
1.7. УЛОГА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА	11
1.8. ГЕНЕТСКА ОСНОВА ОСЕТЉИВОСТИ НА РАЗВОЈ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА.....	12
1.9. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА.....	12
1.10. СОЛНЕ РАЗЛИКЕ ПАЦОВА И МИШЕВА У ОСЕТЉИВОСТИ НА ИНДУКЦИЈУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ИНФЛАМАТОРНИХ БОЛЕСТИ.....	13
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	16
2.1. Радна хипотеза испитивања:.....	16
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	18
3.1. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ	18
3.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ	18
3.3. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА.....	18
3.3.1. Жртвовање животиња и изолација периапикалних лезија и контрола	19
3.4. РАДИОГРАФСКА АНАЛИЗА.....	19
3.5. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА	20
3.5.1. Фиксација и парафинизација ткивних узорака.....	20
3.5.2. Бојење ткивних исечака хематоксилин-еозином (H&E).....	21
3.5.3. Хистоморфометријска анализа периапикалних региона	21
3.6. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА АНАЛИЗА	22
3.7. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ	23
3.7.1. Изолација RNA-а из периапикалних лезија и здравог периодонталног лигаментa 23	
3.7.2. Реверзна транскрипција RNA -а у комплементарну DNA -а и квантификација гена 23	

3.8. АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА И ЗДРАВОГ ПЕРИОДОНТАЛНОГ ЛИГАМЕНТА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ.....	24
3.8.1. Изолација мононуклеарних ћелија из експерименталних периапикалних лезија и здравог периапикалног лигамента	25
3.8.2. Фенотипска и функционална анализа изолованих мононуклеарних ћелија.....	25
3.8.3. Бојење површинских маркера и интрацелуларних цитокина	25
3.9. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ.....	26
3.10. БИОХЕМИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ СИСТЕМСКИХ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА	27
3.10.1. Индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS).....	27
3.10.2. Нитрити (NO ₂ ⁻).....	28
3.10.3. Супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻).....	28
3.10.4. Водоник пероксид (H ₂ O ₂).....	28
3.10.5. Каталаза (CAT).....	29
3.10.6. Супероксид дисмутаза (SOD).....	29
3.10.7. Редукован глутатион (GSH)	29
3.11. ОДРЕЂИВАЊЕ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА И ЗДРАВОМ ПЕРИОДОНТАЛНОМ ЛИГАМЕНТУ	29
3.12. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА	30
4. РЕЗУЛТАТИ	32
4.1. РАДИОГРАФСКА АНАЛИЗА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА	32
4.2. ВЕЛИЧИНА ПЕРИАПИКАЛНЕ ЛЕЗИЈЕ И ИНФИЛТРАЦИЈА НЕУТРОФИЛА 35	
4.3. ТКИВНА ЕКСПРЕСИЈА CD3 И CD68 МАРКЕРА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА	39
4.4. ЗАСТУПЉЕНОСТ Th1/Th17 И T _{regs} СУБПОПУЛАЦИЈА ЋЕЛИЈА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА.....	41
4.5. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА КОЈИ УЧЕСТВУЈУ У РАЗВОЈУ И ВЕЛИЧИНИ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА И РЕСОРПЦИЈИ АЛВЕОЛАРНЕ КОСТИ 45	
4.6. КВАНТИФИКАЦИЈА СЕРУМСКИХ НИВОА ПРОИНФЛАМАТОРНИХ IL-6 И TNF- α ЦИТОКИНА.....	49
4.7. ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ И ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА ДА И АО ПАЦОВА	51
4.7.1. Системски нивои параметара оксидативног стреса.....	51
4.7.2. Нивои параметара оксидативног стреса у периапикалним лезијама.....	54
5. ДИСКУСИЈА	57
5.1. Разлике у величини периапикалних лезија и саставу ћелијског инфилтрата....	57

5.2.	Цитокини у периапикалним лезијама.....	58
5.3.	RANKL/OPG у периапикалним лезијама.....	61
5.4.	Утицај периапикалних лезија на ниво IL-6 и TNF- α у системској циркулацији 62	
5.5.	Оксидативни стрес у периапикалним лезијама	63
5.6.	Имуногенетска основа разлика у патогенези периапикалних лезија DA и AO пацова	64
6.	ЗАКЉУЧАК.....	68
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	69



УВОД

COUNTRY STATE UK 1234

1. УВОД

Периапикалне лезије су једне од најраспрострањенијих болести које карактерише јака инфламаторна реакција (1). Инфламација периапикалног ткива у већини случајева настаје дејством микроорганизама из инфицираног канала корена зуба који је обично последица несанираног каријеса (2).

Будући да су и каријес и периапикалне лезије бактеријски посредоване оралне болести и зависе од реакције домаћина на присуство инфективних агенаса, претпоставља се да исти гени могу модулирати обе болести, посебно у погледу имунских одговора, али вероватно и утицајем на формирање зубне структуре и квалитет пљувачке (1). Показано је да етничка припадност може имати утицај на настанак и развој каријеса (3). Такође, осетљивост на развој периодонталних болести може бити одређена генетским и епигенетским факторима експримираних у одређеним расама или етничким популацијама (4,5).

Обзиром да периапикалне лезије немају увек исте карактеристике, и да се не развијају код свих људи можемо очекивати да генетске разлике које одређују имунски одговор могу имати утицај на развој периапикалних лезија.

1.1. ПЕРИАПИКАЛНО ТКИВО

Апикални део корена зуба, периодонтални лигамент у пределу врха корена зуба и алвеоларна кост чине периапикално ткиво. Анатомски део корена зуба је прекривен цементом, који је аваскуларно и минерализовано ткиво. Цемент прекрива дентин и представља везу између дентина корена и периодонталног лигамента. За разлику од кости, цемент не садржи крвне и лимфне судове, нема инервацију. Цемент је изграђен од 50% минерала (хидроксиапатита) и 50% органског матрикса. Органском компонентом доминира колаген тип I, чак 90% органског дела је овај тип колагена. Цемент може бити целуларни и ацелуларни, у зависности да ли садржи цементоците или не (6). Апикални део корена зуба је прекривен целуларним цементом. На врху корена зуба налази се апикални форамен канала корена зуба, који повезује ендодонцијум и периодонцијум. Апикални форамен са осталим малим латералним отворима представља комуникацију пулпе зуба и околног ткива (алвеоларна кост и периодонтални лигамент)(7).

Алвеоларна кост је део мандибуле или максиле у коме се налазе алвеоле (зубне чашице). Састоји се од спонгиозне и компактне кости. Облик алвеоларне кости зависи од облика, локације и функције зуба. Са унутрашње стране алвеоле се налази компактна кост у коју су усађена периодонтална влакна, док су са друге стране везана за цемент зуба. Алвеоларна кост је васкуларизирана већином крвним судовима пореклом из периодонцијума. Главне ћелије кости су остеобласти (7).

Периодонтални лигамент је специјализовани везивно ткиво које се налази између цемента који покрива дентина корена зуба и алвеоларне кости. Периодонтални лигамент карактерише богата васкуларизација и инервација. Ово специјализовано ткиво чине влакна, ћелије, основна екстрацелуларна супстанца, крвни и лимфни судови и нерви. Ћелије периодонталног лигамента су: остеобласти, остеокласти, фибробласти, остаци епителних ћелија Маласезових острваца, моноцити, макрофаги, мезенхималне матичне ћелије, цементобласти. Прогениторске ћелије се могу диферентовати у остеобласте који учествују у стварању кости (6). Основну екстрацелуларну супстанцу чине протеини, налази се између елемената периодонталног лигамента. Периодонтални лигамент има улогу као сензорни рецептор током мастикације, амортизује покрете зуба током мастикације и има улогу у хомеостази и регенерацији ткива (7).

1.2. ЕВОЛУЦИЈА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Периапикална инфламација је честа и може се јавити са бројним локалним и регионалним компликацијама главе и врата, може бити симптоматска или асимптоматска. Инфекција је у већини случајева пореклом из инфициране некротичне пулпе. Из канала корена зуба преко апикалног отвора и латералних каналића у периапикалног ткиво могу доспети различити штетни агенси, живе и мртве бактерије, бактеријски фрагменти и токсини, протеолитички производи настали након дегенерације пулног ткива и измењеног ткива домаћина, изазивајући периапикални периодонтитис, периапикални апсцес или формирање периапикалног гранулома и цисте (8,9).

Почетни акутни одговор обично је узрокован микроорганизмима. Реакцију ткива одликује хиперемија, васкуларна конгестија, едем периодонталног лигамента, екстравазација неутрофила и моноцити и ограничена ресорпција алвеоларне кости која не мора довести до детектабилне радиолусценције. Код екстрадикуларне инфекције неутрофили уклањају микроорганизме, док моноцити и макрофаги ослобађају леукотријене и простагландине (10,11). Леукотријени (B4) привлаче још неутрофила и макрофага у подручје инфекције и последично се активирају остеокласти (12). Такође, у овој фази активирани макрофаги производе разне проинфламаторне медијаторе: IL-1 (енгл. *Interleukin-1*, IL-1), TNF- α (енгл. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) и хемотактичне цитокине, као што је IL-8, који заједно појачавају локални васкуларни одговор и ресорпцију алвеоларне кости (13). Ова фаза инфламације може имати неколико могућих исхода: спонтано зарастање, даље интензивирање инфламације, формирање апсцеса, фистулизација или може прећи у хроничну фазу (10).

Уколико се не уклони узрочник инфекције, у инфламацији полако превађавају макрофаги, лимфоцити и плазма ћелије инкапсулиране у колагено везивно ткиво (14). Проинфламаторни цитокини продуковани од стране макрофага су моћни стимулатори лимфоцита, посебно Т лимфоцита. Активирани Т-ћелије производе различите цитокине који смањују продукцију проинфламаторних цитокина, што доводи до супресије остеокластичне активности и смањења ресорпције кости. С друге стране, цитокини продуковани од стране Т ћелија могу истовремено стимулирати пролиферацију фибробласта и микроваскулатуре (15).

Успорена ресорпција кости и поновно стварање везивног и колагеног ткива се дешава током хроничне фазе, стварање гранулома. Као такав, периапикални гранулом може остати „миран“ и асимптоматски дужи временски период. Уколико се наруши осетљива равнотежа у периапикалном ткиву долази до акутизације процеса. Хронични гранулом спонтано постаје акутни са клиничким манифестацијама (10).

Периапикални гранулом се састоји од грануломатозног ткива инфилтрираног ћелијама имунског одговора, фибробластима и ограничен је капсулом. Више од 50% свих хроничних периапикалних гранулома су епителизовани. Формирање епителног ткива у периапикалном гранулому је неправилно, због чега се на неким хистолошким пресецима епител види као аркаде и прстенови. Екстраепително ткиво периапикалног гранулома се састоји од малих крвних судова, лимфоцита, плазма ћелија и макрофага. Везивно ткивна капсула је чврсто причвршћена за површину корена (16,17).

Епителизацијом хроничних периапикалних гранулома настају радикуларне цисте, међутим не развија се сваки гранулом у цисту. Учесталост циста међу периапикалним лезијама варира од 6-55% (18). Ипак на основу хистопатолошке анализе показано је да учесталост испод 20% (10,16). Сматра се да формирање цисте има три фазе. Прва фаза је пролиферација ћелијских остатака Маласезових острваца, под утицајем фактора раста

које ослобађају различите ћелије из периапикалног гранулома. Маласезових острваца су епителне ћелије, остаци Хертвигове кошуљице која је била присутна током развоја зуба (19). Током друге фазе формира се епителом обложена шупљина (**Схема 1.**).

Постоје две теорије настанка цисте. Прва теорија је дефицијенција исхране, која се заснива на претпоставци да епителне ћелије губе извор исхране и подлежу некрози и дегенеративној ликвефакцији. Током треће фазе долази до увећања цисте чији механизам није у потпуности разјашњен. Теорије настанка цисте дејством осмотског притиска временом је запостављена, јер се истраживачка пажња померила у корист проналажење молекуларног објашњења. Чињеница да је радикуларна циста у контакту са некротичним каналом корена, елиминише могућност осмотског притисака као потенцијалног фактора у развоју радикуларне цисте. С друге стране, постоје докази о молекуларном механизму ширења цисте. Сматра се да се у зиду цисте налазе макрофаги и Т ћелије који су континуирани извор простагландина и проинфламаторних цитокина који активирају остеокласте и за последицу имају ресорпцију кости (20–22).

Цистична шупљина је ограничена плочасто слојевитим епителом, у њој се у већином налази некротично ткиво, еритроцити који су вероватно последица крварења. У зиду цисте су пронађени неутрофили који су у процесу трансмиграције из епитела у лумен цисте. Лумен и зид радикуларне цисте често садрже кристале холестерола, ослобођених дегенерацијом еритроцита, лимфоцита, плазма ћелија и макрофага, али и липида крвне плазме (20).

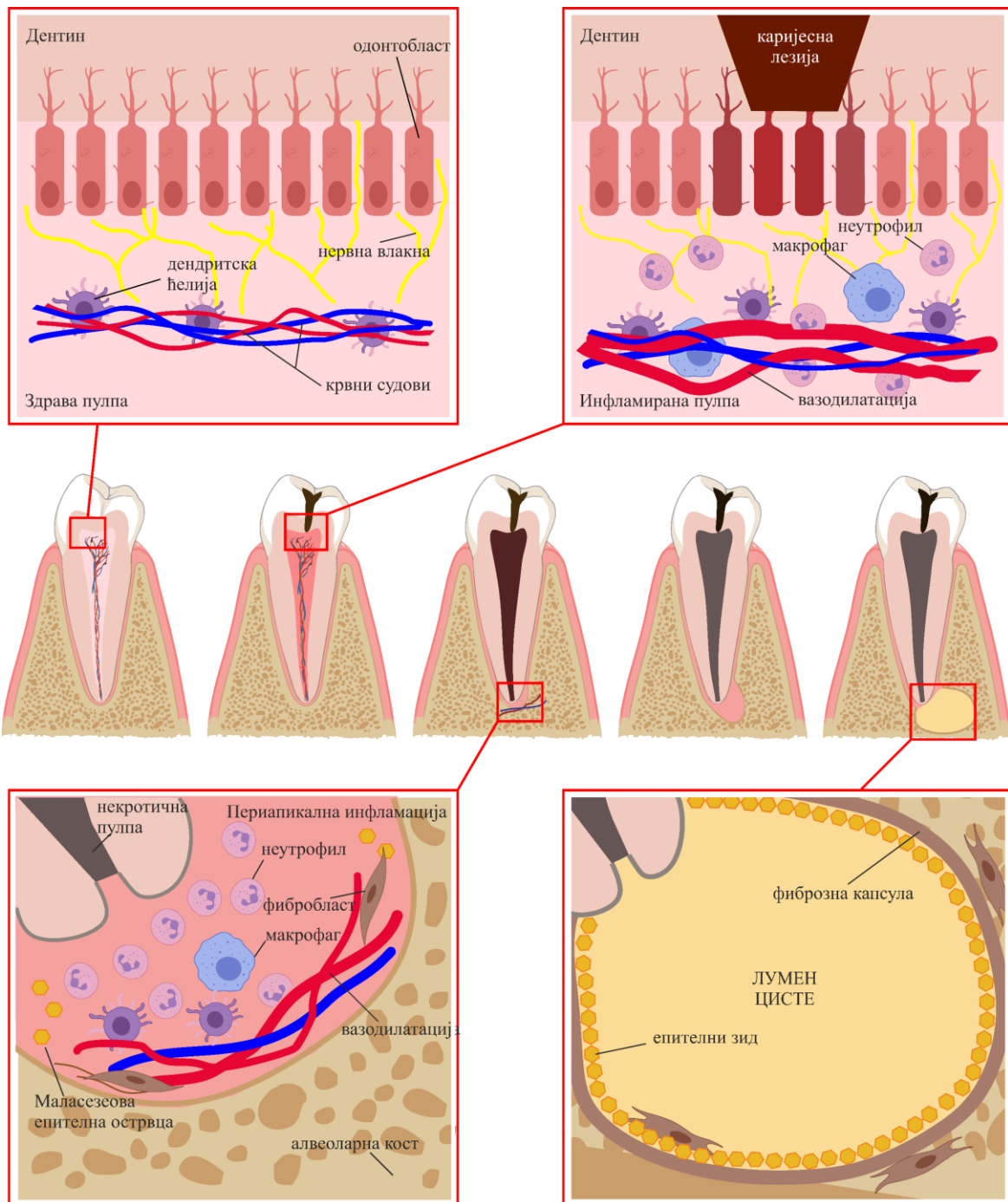


Схема 1. Развој периапикалних лезија. Схематски приказ развоја периапикалних лезија од каријесне лезије и инфламације пулпе до инфламаторне реакције у периапикалном ткиву. Прелазак акутне инфламаторне реакције у хроничну периапикалну лезију и на крају епителизација хроничне лезије и развој радикуларне цисте.

1.3. МИКРОБИОЛОШКА ФЛОРА КАНАЛА КОРЕНА И ПЕРИАПИКАЛНОГ ТКИВА

Као што је претходно поменуто инфламација у периапикалном ткиву је првенствено последица инфекција канала корена. Зато је битно познавање микробне флоре канала корена, а самим тим и периапикалног ткива. Више од 300 врста микроорганизама колонизује здрава људска уста (23). Патогени који се најчешће налазе у оболелој пулпи и у перирадикуларним ткивима су бактерије, вируси и гљивице (24).

1.3.1. Бактерије

Патогене анаеробне бактерије преобладавају у оболелом пулпном ткиву, а такође су и повезане са болестима периодонталног ткива. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Treponema denticola* су пронађене код ендодонтски лечених зуба, а и код зуба који имају акутно запаљење периапикалног ткива и хроничне периапикалне лезије (10,24). Студијама је показано да постоји разлика у врстама микроорганизама у каналу корена зуба и периапикалним лезијама зависно од популације пацијената (25–27).

Actinomyces је једна од најчешћих бактеријских врста откривених у периапикалним лезијама. Могуће објашњење за то је да је ова врста бактерија отпорна на фагоцитозу због способности агрегације (28). *Fusobacterium* је друга по заступљености бактерија у периапикалним лезијама, грам-негативни анаероб способан за везивање, инвазију и преживљавање унутар епителних и ендотелних ћелија коришћењем FadA адхезина (енгл. *Fusobacterium adhesin A*, FadA) (29). *Porphyromonas* и *Prevotella* су анаеробни грам-негативни штапићи, који су најчешће повезивани са гнојни периапикалним апсцесима (30).

1.3.2. Вируси

Последњих година све је више студија који указују на то да вируси играју важну улогу у болести ендодонцијума, али и периодонцијума (31,32). Показано је да хумани цитомегаловирус и Епштајн–Баров вирус имају улоге у патогенези симптоматских перирадикуларних лезија (32). Активација инфламаторних ћелија у ткиву узрокованих вирусима може нарушити равнотежу имунског одговора и довести до прекомерног раста броја бактерија. Вирус у ткиву може бити у стању латентности дужи временски период да се активира неким “окидачем” и да доведе до прогресије перирадикуларних лезија (31,33).

1.3.3. Гљиве

Показана је веза између колонизације зубних ткива гљивама и развоја обољења пулпе, али и са настанком асимптоматских периапикалних периодонтитиса и патологијом перирадикуларних ткива. *Candida albicans* је откривена у чак 21% инфицираних канала корена, због њене изразите способности колонизације зидова канала корена и дентинских тубула (27).

1.4. ИНФЛАМАТОРНЕ ЋЕЛИЈЕ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Различите популације инфламаторних ћелија су описане у периапикалним лезијама. Присуство неутрофила, макрофага, лимфоцита, плазма ћелија и епителних ћелија у периапикалним лезијама одавно је доказано (34–36). Високе концентрације неутрофила

и неких макрофага су очекиване током акутне фазе инфламације, док током хроничне фазе су већином присутне ћелијске популације лимфоцита, али и макрофага и плазма ћелија (34,37).

У акутној фази инфламаторног одговора **неутрофили** и њихова интеракција са микроорганизмима је од посебног значаја као прва линија одбране. Микроорганизми пореклом из инфицираних канала корена продукују високе концентracије липополисахарида (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS). LPS активира систем комплемента који доводи до стварања хемотактичних пептида и привлачи неутрофиле на место инфекције (38). Неутрофили елиминишу бактерије процесом фагоцитозе (39). За ове ћелије се претходно сматрало да је њихова улога само фагоцитоза, али показано је да под утицајем LPS продукују: IL-1, IL-6 и TNF- α . Поред протективне улоге, уједно се одиграва и њихова улога у прогресији лезије продукцијом ових цитокина интензивира се инфламацију и ресорпција алвеоларне кости. Такође, стимулацијом продукције хемотактичног цитокина IL-8, повећава се број неутрофила и чини их још активнијим у процесу фагоцитозе (40,41). IL-8 је значајан у акутној егзацербацији болести, одговоран је за активност остеокласта, ресорпцију кости и појаву бола код симптоматских периапикалних лезија (41). Такође, показано је да је број неутрофила већи код симптоматских периапикалних лезија (42). Након завршетка своје улоге, неутрофили умиру и ослобађају протеолитичке ензиме одговоре за деструкцију околног ткива и тиме стварају простор за долазак других инфламаторних ћелија (18).

Друга врста ћелије, која долази на место инфламације је **макрофаг**. Учесталост макрофага унутар периапикалних лезија је између 4% и 50% (38). Инфилтрација макрофага на место инфламације је релативно спора у поређењу са неутрофилима, али они су способни да фагоцитишу свако страно тело и зато њихова инфилтрација траје дуже (39). Макрофаги могу продуковати проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине које имају улогу у прогресији (IL-1 α , TNF- α , IL-6), али и нарастању периапикалних лезија TGF- β (енгл. *Transforming growth factor β* , TGF- β). Ови цитокини имају улогу у регулацији инфламаторних процеса активацијом и диференцијацијом остеокласта, фибробласта, производњи колагена и нео-васкуларизацији периапикалних лезија (43–45). Поред, продукције цитокина макрофаги продукују и простагландине, леукотријене и матрикс металопроотеиназе који имају улогу у прогресији периапикалне лезије (46).

Најефикасније антиген презентујуће ћелије су **дендритске ћелије**, које имају способност да “ухвате, обраде и представе” антигене Т лимфоцитима, чиме се регулише стечени имунски одговор. Дендритске ћелије у периапикалним лезијама састоје се од најмање две субпопулације које се могу разликовати на основу структуре и фенотипа (47). Иако и макрофаги и дендритске ћелије активирају Т лимфоците локално, дендритске ћелије су једине одговорни за покретање имунолошког одговора активацијом наивних ћелије у регионалним лимфним ткивима (48). Цитокини (IL-1 β , TNF- α и IL-6) и простагландини утичу на сазревање дендритских ћелија (експримирају молекулу CD83, (енгл. *Cluster of differentiation 83*, CD83)) (49). Дендритске ћелије активирају наивне Т ћелије и покрећу специфичне имунолошке одговоре Т ћелија. Код хроничне инфламације, дендритске ћелије се задржавају и пролазе локално сазревање манифестовано повећаном експресијом костимулаторних молекула (CD86, CD40) и експресијом CD83 (50). У периапикалним лезијама пронађене су плазмоцитоидне дендритске ћелије, за које се сматра да имају улогу у патогенези периапикалних лезија изазваних вирусима (42).

Позната је значајна улога **лимфоцита** у имунском одговору периапикалних лезија (51). Постоје различити ставови о улози лимфоцита, неки сугеришу да су Т лимфоцити карактеристични за иницирање и развој лезија (52), а В лимфоцити одговорни за процес

зрастања, док је другом студијом показано да се појединачно периапикалне лезије разликују у односу Т и В лимфоцита (42). Такође, потврђено је да су CD4+ Т лимфоцити већином заступљени у раној фази инфлације лезије, док су CD8+ Т лимфоцити у хроничној (53). Супротно, показано је да је развој грануломатозне инфилтрације у периапикалној лезији је повезан са приливом CD4+ Т лимфоцитима (54). Висок однос CD4/CD8 је пронађен у цистама, које такође имају већи проценат В лимфоцита него периапикални грануломи (53). Различити имуноглобулини су пронађени у периапикалним лезијама (енгл. *Immunoglobulin*, IgG, IgM и IgA), при чему су IgG најбројнији у мононуклеарним инфилтратима (55).

1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА

Периапикалне лезије карактерише грануломатозно ткиво и пролиферативни епител, који су инфилтрирани различитим инфламаторним ћелијама (неутрофилима који стимулишу миграцију моноцита и лимфоцита) (56,57). Ћелијски инфилтрати, који садрже антиген презентујуће ћелије, Т и В лимфоците су карактеристични за хронични периапикалне лезије. Најбројније антиген презентујуће ћелије у периапикалним лезијама су дендритске ћелије које су од посебног значаја у поларизацији имунског одговора (58,59). Сматра се да је Th1 имунски одговор посредован INF- γ (енгл. *Interferon- γ* , IFN- γ), IL-6 и TNF- α одговоран за појачану ресорпцију кости и последичну прогресију лезије. Супротно томе, Th2 имунски одговор је заслужан за зрастање, смањење инфламације посредством дејстава цитокина (IL-4, IL-5, IL-10), док Th17 цитокин: IL-17 може играти улогу у погоршању инфламације код периапикалних лезија (60,61) (Схема 2.).

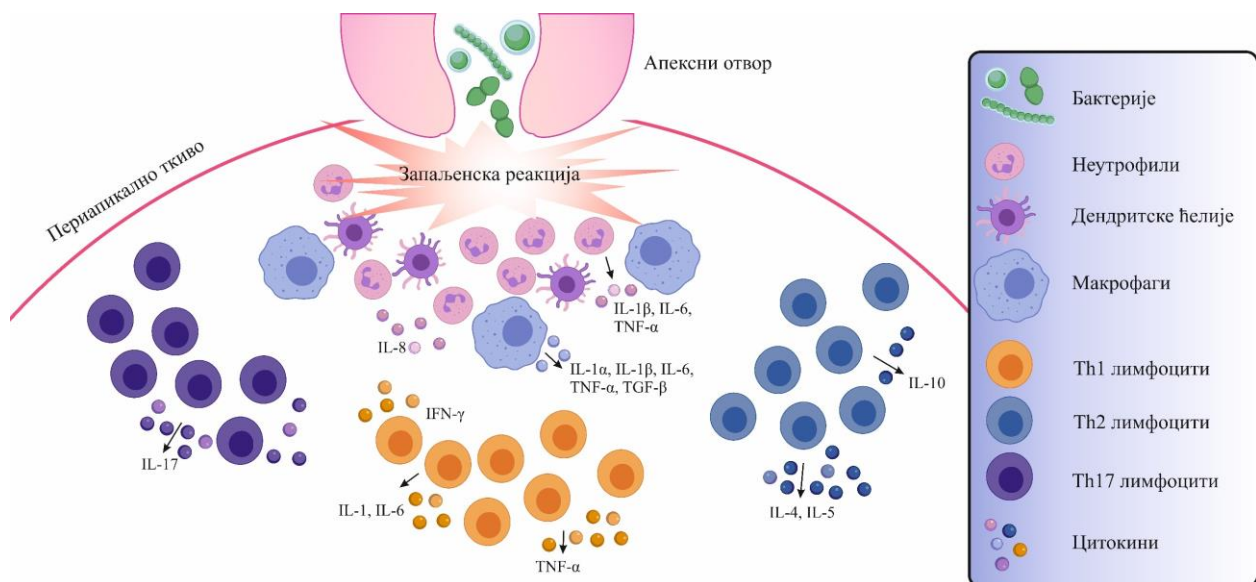


Схема 2. Инфламација у периапикалном ткиву. Схематски приказ инфламаторне реакције у периапикалном ткиву. Присуство ћелија инфламације и њихова продукција цитокина који имају улогу у развоју и имунском одговору периапикалних лезија.

1.5.1. Утицај цитокинског миљеа на развој и прогресију периапикалних лезија

IL-1 – главни цитокин у регулацији имунског одговора на инфекцију изазвану микроорганизмима. Такође, позната је његова улога у ресорпцији кости и инхибицији стварање кости (62). IL-1 α и IL-1 β су две форме овог цитокина, за оба облика је показано њихово присуство у периапикалним лезијама (63). У запаљењу пулпе и периапикалног ткива продукују их фибробласти, остеокласти, неутрофили и макрофаги (64). У периапикалним лезијама IL-1 α има улогу у ресорпцији алвеоларне кости. Због његовог ослобађања у екстрацелуларни простор може бити сигнал имунском одговору да постоји деструкција ткива (65). Такође, IL-1 β има улогу у појачању имунског одговора у инфламацији периапикалних ткива повећањем нивоа IL-6 и простагландина E2 (66). *Morsani* и сарадници (67) су показали да повећани ниво IL-1 β може допринети повећаној суцептибилности (осетљивости) на развој перзистентних периапикалних лезија (Табела 1).

IL-6 – за овај цитокин се зна да има двојаку улогу, проинфламаторну и антиинфламаторну (68). IL-6 је мултифакторијални цитокин који се продукује у костима на стимулус неке трауме или инфекције, али и као одговор на продукцију IL-1 β и TNF- α (69). Синтетишу га различите ћелије: неутрофили, макрофаги, кератиноцити и фибробласти (70). Овај цитокин је способен да стимулише различите биолошке процесе у организму: активацију Т лимфоцита, диференцијацију В лимфоцита, хематопоезу, ангиогенезу, али и диференцијацију остеокласта (71). Поред улога IL-6 у регулацији имунског одговора, показано је и да дефицијенција овог цитокина узрокује развој периапикалних лезија (72) (Табела 1).

TNF- α – главни извор продукције овог цитокина су макрофаги, поред њих овај цитокин продукују још и ендотелне ћелије, лимфоцити и фибробласти (73). Има улогу у процесу миграције ћелија, регулацијом адхезивних молекула и производњом хемокина (73–75). TNF- α је присутан у гингивалној течности и инфламираном периодонцијуму где је у позитивној корелацији са матрикс металопротеиназама и експресијом RANKL-а (енгл. *Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand*, RANKL) (76,77). У складу са резултатима хуманих студија и резултати анималних показују да TNF- α има главну улогу у инфламацији, ресорпцији кости (76). Такође, директан ефекат TNF- α у патогенези периапикалних лезија је повећање продукције других проинфламаторних цитокина (IL-1 β и IL-6) (73,78,79) (Табела 1).

INF- γ – продукују га углавном Т лимфоцити. INF- γ се сматра главним цитокином који активира макрофаге, повезан је са продукцијом проинфламаторних цитокина и хемокина (80–82). Обзиром да је INF- γ присутан у прогресивним периапикалним лезијама, показано је и да је укључен у развој инфламације и ресорпције кости (83). Експерименталним студијама на глодарима је показано да INF- γ има улогу у инфламаторним процесима код којих је присутна инфекција изазвана бактеријама (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*)(84–86). Интересантно, у *in vitro* студијама показано је да INF- γ инхибира остеокластогенезу, док је у *in vivo* студијама његова улога супротна (87–90). Експерименталним (*in vivo*) студијама потврђена је проинфламаторна улога INF- γ , повећаном регулацијом производње TNF- α и IL-1 β чиме утиче на повећање продукције RANKL-а и на остеокластогенезу (86,91) (Табела 1).

IL-17 – овај цитокин је карактеристичан за Th17 имунски одговор, продукују га Т лимфоцити (92). Присуство овог цитокина је доказано у периапикалним лезијама (61).

Улога IL-17 у деструкцији кости се огледа у повећању производње RANKL-а, али и синергистичком деловању са осталим проинфламаторним цитокинима (93). Сходно томе, сматра се да IL-17 утиче на егзацербацији хроничних периапикалних лезија, активирање ћелија да производе медијаторе инфламације. Значајно већа производња IL-17 је у симптоматским лезијама, које карактерише инфилтрација неутрофила и појачана производња IL-8, што подржава тврдњу да IL-17 стимулишући производњу IL-8 игра улогу у егзацербацији хроничних периапикалних лезија (61) (Табела 1).

IL-4 - још један врста ћелија која је пронађена у периапикалним лезијама је Th2 ћелијски скуп (94). Један од главних цитокина Th2 имунског одговора је **IL-4**. За овај цитокин се сматра да је један од стимулатора В лимфоцита, доприноси њиховој диференцијацији, али и производњи антитела (80,81). Сматра се да је IL-4 главни цитокин који има протективну улогу у инфламацији периодонталног ткива. IL-4 повећава производњу ткивних инхибитора металопротеиназа, али и OPG (енгл. *Osteoprotegerin*, OPG) чија је улога у инхибицији ресорпције кости (90) (Табела 1).

IL-10 – антиинфламаторни IL-10 цитокин је такође присутан у инфламацији периодонталног ткива, где се сматра да му је улога ограничење инфламације (77,95). Контролу инфламације IL-10 спроводи супресорима цитокинске сигнализације (енгл. *suppressors of cytokine signaling*, SOCS), чија је улога утишавање сигнала као део негативног ефекта, на инфламаторни стимулус (96). IL-10 директно омета продукцију IFN- γ и IL-17, указујући на своју главну улогу као имунорегулаторни цитокин (97) (Табела 1).

Табела 1. Цитокини који су учествују у развоју периапикалних лезија

Цитокини	Извор цитокина	Примарна функција
IL -1	макрофаги, фибробласти, остеокласти и неутрофили	стимулација продукције простагландина, протеолитичких ензима и IL-6 и IL-8; повећање ресорпције кости и инхибиција стварања кости;
IL-6	неутрофили, кератиноцити и фибробласти	макрофаги, и стимулише различите биолошке процесе у организму: активацију Т лимфоцита, диференцијацију В лимфоцита, хематопоезу, ангиогенезу, али и диференцијацију остеокласта;
TNF-α	макрофаги, ћелије, лимфоцити и фибробласти	ендотелне и има главну улогу у инфламацији, ресорпцији кости, повећање продукције других проинфламаторних цитокина (IL-1 β и IL-6);
INF-γ	Т лимфоцити	активација макрофага; повећање продукције TNF- α , IL-1 β , као и RANKL-а
IL-17	Т лимфоцити	активација IL-1, IL-6 и TNF- α , и повећање продукције IL-8; стимулација ресорпције кости;
IL-4	Т лимфоцити	протективну улогу у инфламацији; инхибиција ресорпције кости;
IL-10	макрофаги	смањује продукцију IFN- γ и IL-17;

1.6. RANKL/OPG У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА

Периапикалне лезије карактерише локална ресорпција алвеоларне кости током инфламаторног процеса. Спрега RANK/RANKL/OPG је важан регулатор метаболизма кости који има утицај на диференцијацију и активност остеокласта. RANK (енгл. *receptor activator of nuclear factor κ B*, RANK) је трансмембрански протеин, члан породице рецептора фактора туморске некрозе, и већином га експримирају макрофаги, Т и В лимфоцити, дендритске ћелије. RANKL (енгл. *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*, RANKL) је цитокин сличан TNF- α и има улогу лиганда RANK-у и OPG-у (енгл. *Osteoprotegerin*, OPG) (98). Активација RANK-а RANKL-ом резултира његовом интеракцијом са TNF рецепторима, чиме се активирају NF- κ B (енгл. *nuclear factor- κ B*, NF- κ B) и протеин c-Fos, који учествују у матурацији остеокласта (99).

Супротно томе, солубилни протеин OPG може блокирати интеракцију RANK/RANKL, везивањем за RANKL и спречавањем диференцијације и активације остеокласта, чиме се смањује ресорпција кости (98,100,101). Сматра се да проинфламаторни цитокини TNF- α , IL-1 и RANKL имају синергично дејство на остеокластогенезу (102,103). Супротно, продукција IL-10 који је типичан антиинфламаторни цитокин, указује на брзо покретање система негативне повратне спреге, како би се избегла прекомерна продукција медијатора коштане ресорпције (104).

RANKL/OPG однос у периапикалним лезијама је индикатор ресорпције алвеоларне кости, а самим тим и активности лезије. Када је овај однос велики постоји активна лезија, у супротном мали RANKL/OPG однос је показатељ хроничних периапикалних лезија (105).

Показано је да одређене ћелије и цитокини и њихова интеракција одређују степен прогресије лезије, а самим тим и RANKL/OPG однос. Приликом инвазије бактерија у периапикално ткиво долази до инфламаторне реакције у којој се активирају имунске ћелије и продукују медијатори инфламације (106,107). Међу првим ћелијама које се активирају су неутрофили и макрофаги, који продукују TNF- α и IL-1 који имају улогу у ресорпцији кости, директним или индиректним дејством на RANKL (65,78). Повећање продукције IL-17 и IFN- γ у инфламираном периапикалном ткиву такође утиче на прогресију болести (108). Иако постоје различити путеви којима се повећава ниво RANKL у периапикалним лезијама, уједно и постоји супротни механизми регулисани активацијом Th2 и Treg ћелија који су одговорни за стабилност ћелије (109,110). Th2 ћелије продукују цитокин IL-4 који делује на хемокине који привлачи Treg ћелије у периапикалном ткиву. Интеракција Th2 и Treg ћелија преводи активну периапикалну лезију у стабилну, продукцијом цитокина IL-4, IL-10 и TGF- β (енгл. *transforming growth factor β* , TGF- β) (107). Поред ових ћелија IL-10 и TGF- β продукују и мезенхималне матичне ћелије (енгл. *mesenchymal stem cells*, MSCs). IL-10 и TGF- β утичу на повећање нивоа OPG у периапикалним лезијама. Присуство ових антиинфламаторних и регулаторних цитокина узрокује смањење RANKL/OPG односа. Поред продукције цитокина за стабилност лезије је битан број неутрофила и макрофага. Под дејством IFN- γ макрофаги задржавају M1 фенотип, међутим повећаном продукцијом IL-4 дешава се поларизација макрофага у M2 фенотип. M2 фенотип макрофага је антиинфламаторни и имају улогу у инхибицији ресорпције кости (111).

RANKL/OPG однос је одговоран за судбину периапикалних лезија. Дејством Th1 и Th17 ћелија и проинфламаторних цитокина долази до напредовања, прогресије или егзацербације периапикалних лезија. Супротно, Th2 и Treg ћелије са њиховом

антиинфламаторном улогом одговорне су за зарастање и заустављање прогресије периапикалних лезија. На крају, за развој или зарастање периапикалних лезија је одговорна интеракција имунских одговора и његових утицаја на RANKL/OPG однос који је пак одговоран за ресорпцију алвеоларне кости (112) (Схема 3).

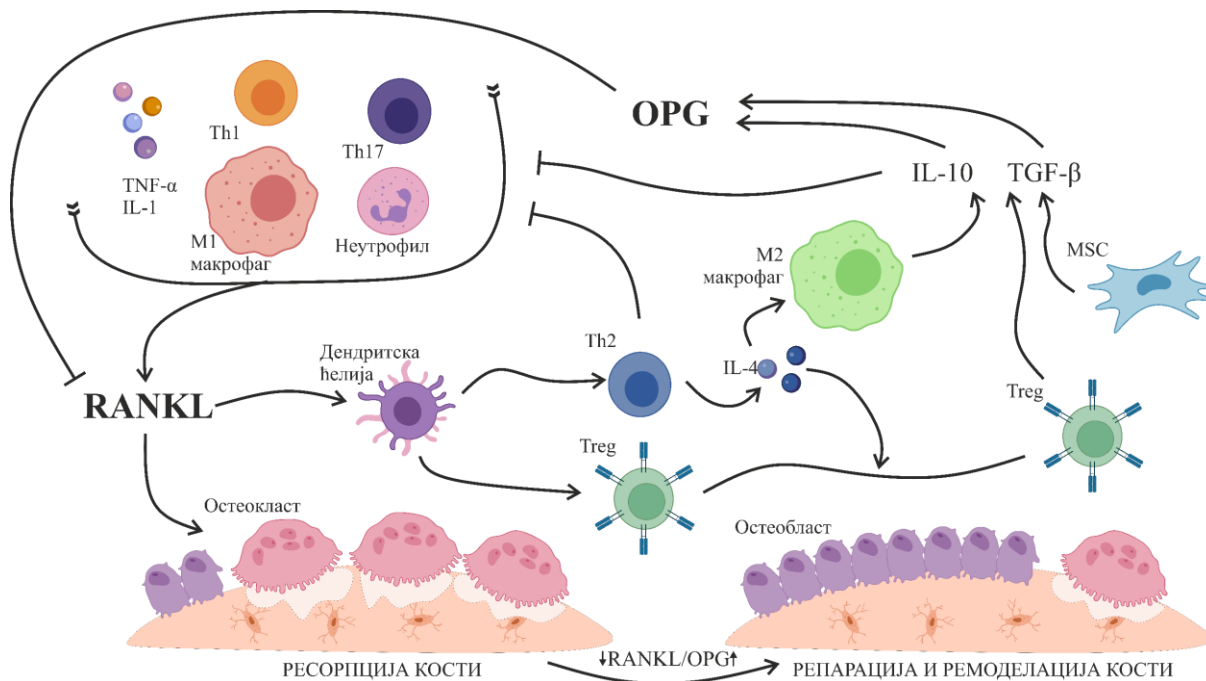


Схема 3. Ресорпција алвеоларне кости посредством имунске реакције и RANKL/OPG-а. Схематски приказ инфламаторне реакције у периапикалном ткиву. Присуство ћелија инфламације и њихова продукција цитокина који имају улогу у развоју и имунском одговору периапикалних лезија. Утицај ћелија инфламације и медијатора инфламације на експресију RANKL-а и OPG-а.

1.7. УЛОГА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА

Оксидативни стрес је укључен у патогенезу различитих инфламаторних процеса (113). Стварање реактивних врста кисеоника (енгл. *reactive oxygen species*, ROS) је нормални део ћелијског метаболизма, међутим уколико је у високим концентрацијама присутан у ткиву, може бити важан медијатор у оштећењу ћелијске структуре, липида, протеина итд. (114). У ROS се сврставају слободни радикали и не-радикали (нитрит оксид (NO^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2)).

Супротно слободним радикалима су антиоксиданси, чији механизми се заснивају на ензимским и не-ензимским реакцијама (каталаза (енгл. *Catalase*, CAT) и супероксид дисмутаза (енгл. *superoxide dismutase*, SOD), као и активност редукованог глутатиона (енгл. *reduced glutathione*, GSH)). Интеракцијом ROS-а и антиоксидативних механизма одржавају се нормални физиолошки процеси. Оксидативни стрес је поремећај про-анти-оксидативне равнотеже, при чему долази до поремећаја и оштећења ткива.

Локално оксидативни стрес у периапикалном ткиву изазива оштећење (113). Претходним студијама је показано да NO^- има значајну улогу у регулацији инфламације периапикалних лезија, у повећању продукције проинфламаторних цитокина и простагландина. Поред тога, услед контакта макрофага и LPS-а пореклом из бактерија, NO^- се отпушта из макрофага узрокујући прогресију инфламације (115,116). Као

последица нарушене равнотеже, стварање кости је смањено, али је и уједно повећана диференцијација остеокласта и ресорпција кости (117). Повећан ниво интрацелуларног H_2O_2 узрокује већу експресију RANKL-а који има улогу у ресорпцији кости (118). Супротно, GSH је најбитнији антиоксиданс и има улогу у одржавању равнотеже и здравља ткива (119,120).

1.8. ГЕНЕТСКА ОСНОВА ОСЕТЉИВОСТИ НА РАЗВОЈ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Познато је да генетски фактори утичу на имунски одговор и да појединци могу различито реаговати на исте стимулусе из спољашње средине (121). Генетски полиморфизми су типови генских варијација и могу утицати на различите болести. Тако, генетски фактори који могу утицати на осетљивост на развој каријеса, пулпитиса и на развој периапикалних лезија нису у потпуности разјашњени (1). Претходним студијама је показано да су људи подложнији каријесу зависно од етничке припадности, социоекономског статуса, и других уобичајених фактора ризика (3,122–124). Показана је повезаност између полиморфизма гена одговорних за IL-1 α и IL-1 β и повећања ризика за развој већих периапикалних лезија у популацији Северних Европљана (125). Ова тврдња је у складу са резултатима друге студије о продукцији специфичних генетских маркера који се доводе у везу а повећаном продукцијом IL-1. Откривен је специфичан генотип (IL-1 α и IL-1 β) који присутан у чак 78% периодонтитиса са озбиљном клиничком сликом (126). Супротно, у популацији Афро-Американаца где је исто испитивана преваленца гена IL-1 β (+3954) није показана повезаност између овог гена и развоја прогресивног периодонтитиса (127). Студија спроведена на популацији у Бразилу, где је такође испитиван полиморфизам (+3954) IL-1 β гена је показала да овај ген може бити фактор ризика за развој хроничних периодонтитиса (128). Утицај генетских полиморфизама (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) је показана и у осетљивости на развој симптоматског денталног апсцеса (129). Идентификација генетских фактора, али и других фактора ризика који могу бити одговорни за повећану осетљивост за развој периапикалних лезија је од значаја, за правилну превенцију и дијагностику обољења, али и одговарајућу терапију.

1.9. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Периапикалне лезије су честе у хуманој популацији, али често немају исте карактеристике и разликују се у величини, саставу, типу микроорганизама итд. (130–133). Управо због тих неспецифичности, анимални модели су погодни за истраживање патогенезе.

Први експериментални модел периапикалних лезија је спроведен 1965. године и базира се на принципу отварања коморе пулпе и њене комуникације са усном дупљом (134). Овај начин индукције експерименталних периапикалних лезија се користи и у скорашњим истраживањима.

Током времена, спроведене су неке модификације овог начина индукције периапикалних лезија коришћењем липополисахарида (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS). Након отварања коморе пулпе и испитивања проходности канала ендодонтским инструментом, папирни поен се натопа LPS-ом и постави у канал корена зуба, затим се кавитет затвара привременим цементом на бази цинк оксид еугенола (135). За разлику од претходног начина примене LPS-а, модификација овог начина је да се натопљена куглица вате

директно постави на пулно ткиво, задржи кратко време и затим се зуб остави тако отворен на временски период од две недеље (136). LPS је ендотоксин који се налази на спољашњој мембрани грам негативних бактерија. Овај ендотоксин је нашао примену у индукције периапикалних лезија, јер се сматра да може директно да стимулише остеобласте да експримирају RANKL и повећава продукцију остеокласта (137). Такође је показано да LPS активира ресорпцију кости у току инфламације, стимулишући продукцију проинфламаторних цитокина и матрикс металопротеиназа пореклом из макрофага (138).

Познато је да системски фактори и неке болести могу утицати на развој и патогенезу периапикалних лезија. На пример, истраживана је повезаност експерименталних периапикалних лезија и модела оваријектомисаним пацовима (139–141). Показан је утицај хормона на развој периапикалних лезија. Дефицијенција естрогена доводи до повећане експресије RANKL-а и последично је повећана деструкција кости (142).

Дијабетес мелитус може имати утицај на зарастање периапикалних лезија након ендодонтског третмана. Ови пацијенти су подложни инфекцијама и споријем зарастању, али је и показно да дијабетес мелитус има утицај на развој периодонталне болести, повећање губитка алвеоларне кости (143,144). Управо због тога је испитиван утицај ове системске болести на развој експерименталних модела периапикалних лезија (143,145).

Поред утицаја системских болести на развој експерименталних периапикалних лезија, испитиван је и утицај периапикалних лезија на системске болести. Кардиоваскуларна обољења немају утицај на развој периапикалних стања, али су честа удружена обољења код пацијента који се хоспитализују код дентоалвеоларних апсцеса, који могу бити компликација или егзацербација периапикалних лезија (146). Пролазна бактеријемја која може настати у току ендодонтске терапије може бити ризик за развој бактеријског ендокардитиса код ових пацијента (131). Управо због тога се користе модели експерименталних периапикалних лезија заједно са моделима кардиоваскуларних болести (147–149) да би се испитао међусобни утицај.

1.10. СОЈНЕ РАЗЛИКЕ ПАЦОВА И МИШЕВА У ОСЕТЉИВОСТИ НА ИНДУКЦИЈУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ИНФЛАМАТОРНИХ БОЛЕСТИ

Бројним експерименталним студијама је показано да генетска основа експерименталних животиња утиче на патогенезу болести (150–152). Показано је и да равнотежа између Th1 и Th2 имунског одговора је од највећег значаја за исход тих болести.

C57BL/6 и BALB/c мишеви су најчешћи сојеви мишева који се користе у испитивању имунорегулација у различитим моделима болести. C57BL/6 мишеви развијају Th1 имунски одговор, док BALB/c развијају Th2 имунски одговор (151,153). Т ћелије C57BL/6 мишева продукују Th1 цитокин INF- γ у већим количина, а IL-4 знатно мање, док BALB/c мишеви продукују веће количине Th2 цитокин IL-4, а мање INF- γ (154). Такође, макрофаги код ових сојева мишева имају различит одговор на LPS током бактеријске инфекције, указујући да се и урођени имунски одговор разликује (155,156). Постоје конститутивне разлике у дистрибуцији имунских ћелија у метаболичким ткивима различитих мишијих сојева. Показана је разлика у имунометаболичком фенотипу и имунском одговору ова два соја мишева који су били изложени исхрани богатој мастима. Уочено је да постоје наследне разлике у метаболичким процесима, инфламацији, фибрози и имунском одговору ова два соја мишева (151).

Поред мишева, DA и АО пацови су коришћени у истраживањима имунског одговора код различитих болести (157–159). Ове разлике су детаљно проучаване у моделима експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (енгл. *experimental autoimmune encephalitis*, ЕАЕ), и дијабетес мелитус тип I (150,158,159). Ове две врсте пацова се разликују у продукцији цитокина, саставу и величини инфилтрата мононуклеарних ћелија у циљаним ткивима (159). Резистенција АО пацова на болести регулисане Th1/Th17 имунским одговором, може бити последица мање продукције INF- γ и IL-2. Сасвим супротно, код DA пацова је карактеристичан Th1/Th17 имунски одговор и продукција INF- γ и IL-17 (152,159).

Претпостављено је да генетске разлике могу утицати на патогенезу периапикалних лезија због њихове могуће улоге у модулацији локалног имунског одговора и ресорпције кости у лезијама. Стога је ова студија имала за циљ да истражи утицај разлика сојева у имунском одговору на патогенезу експерименталних периапикалних лезија у DA и АО сојевима пацова.



ЦИЉ СТУДИЈЕ

COUNTRY STATE UK 1234

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Главни циљ овог истраживања је испитивање ефеката разлика у имунолошкој реактивности на индукцију периапикалних лезија.

У том циљу коришћена су два генетски високородна (“*inbred strains*”) соја пацова Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (AO).

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су следећи експериментални задаци:

1. Испитати радиографске карактеристике периапикалних лезија 21 дан после њихове индукције
2. Одредити патохистолошки скор инфламаторних промена и ресорпцију кости у периапикалном ткиву
3. Дефинисати и квантификовати инфламаторне ћелије у периапикалним лезијама
4. Испитати фенотипске карактеристике ћелија у периапикалном мононуклеарном инфилтрату
5. Испитати експресију гена који кодирају проинфламаторне и регулаторне цитокине у мононуклеарним ћелијама периапикалних лезија
6. Испитати ниво експресије RANKL-а, OPG-а и RANKL/OPG однос у периапикалним лезијама
7. Утврдити ниво маркера оксидативног стреса: индекса липидне пероксидације (TBARS), азот монооксида NO- (у облику нитрита), супероксид анјон радикала (O₂-), водоник пероксида (H₂O₂), каталазе (CAT), супероксид-дизмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH)) у системској циркулацији и у супернатанту периапикалних лезија.

2.1. Радна хипотеза испитивања:

Постоји разлике у анино карактеристикама периапикалних лезија између DA и AO пацова.

Уочене разлике могу бити последица:

- Величине и састава мононуклеарних инфилтрата у периапикалним лезијама посебно у субпопулацијама Т лимфоцита
- Присуства проинфламаторних и регулаторних цитокина
- Различитим нивоом маркера оксидативног стреса у системској циркулацији и супернатанта хомогената периапикалних лезија.



МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

COUNTRY STATE UK 1234

1234567890

1234567890

1234567890

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ

Сви експерименти спроведени на животињама одобрени су од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (број одобрења 01-16176/3). Експерименталне процедуре су у складу са Директивом Европске уније о добробити лабораторијских животиња (2010/63EU), Директивом Савета Европских заједница (86/609/EEZ), начелима добре лабораторијске праксе и принципима анималних истраживања у ендодонцији PRAISE (160).

3.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживања су изведена на пацовима генетски високородних сојева Dark Agouti (DA) (n=36) и Albino Oxford (AO) (n=36), мушког пола, старости 8 недеља. На почетку истраживања животиње су примарно добијене из лабораторије проф. *George Ford (Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, United Kingdom)*, а потом одгајане као “*inbred*” сојеви у виваријуму Центра за имунолошка истраживања Војномедицинске Академије (ВМА) у Београду. Све животиње одгајане су под стандардним условима, *ad libitum*.

3.3. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Пре индукције периапикалних лезија, животиње су анестезиране интраперитонеалном инјекцијом кетамин хидрохлорида (80mg/kg телесне тежине) и ксилазина (10mg/kg телесне тежине). Након анестезирања животиње су фиксиране на постоље за интервенције и затим је пулпа десног првог мандибуларног молара отворена помоћу денталног микромотора (W&H Dentalwer, Burmoos, Austria), округлим карбидним сврдлом. Комора пулпе је отворена и препарација је екстендирана све док се нису видели улази у канале корена, а затим је спроведена експлорација канала ендодонтским инструментом (К турпија величине 10). Коморе пулпе су остављене отворене и експониране оралном окружењу и микроорганизмима усне дупље. Да би се убрзао развој периапикалних лезија, све животиње су добиле 10% раствора глукозе у води за пиће током 14 дана након индукције периапикалних лезија, у периоду од 14h до 9h (**Схема 4**). Здраву периапикално ткиво левог првог мандибуларног молара исте животиње је коришћено као контрола.

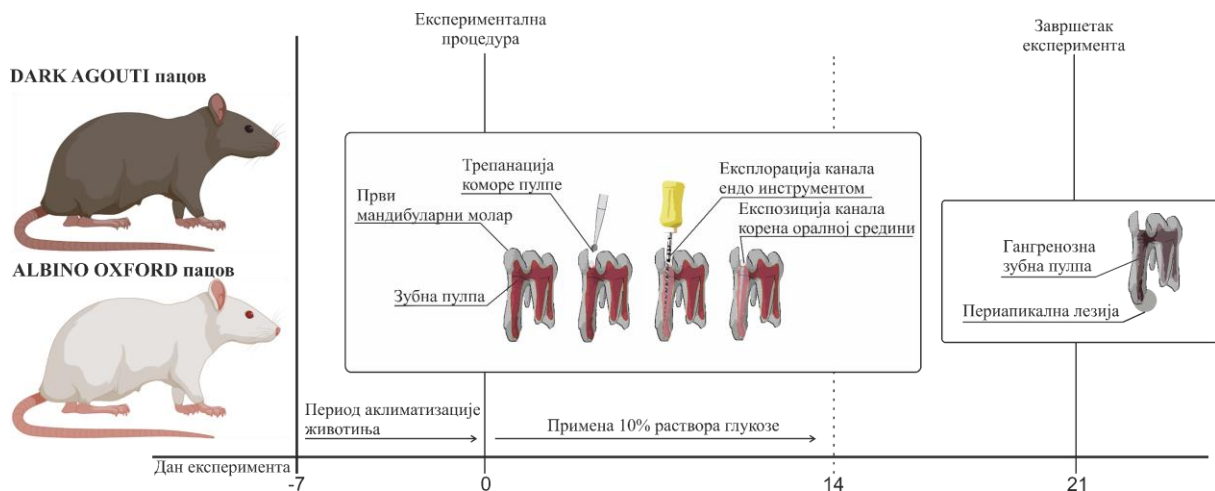


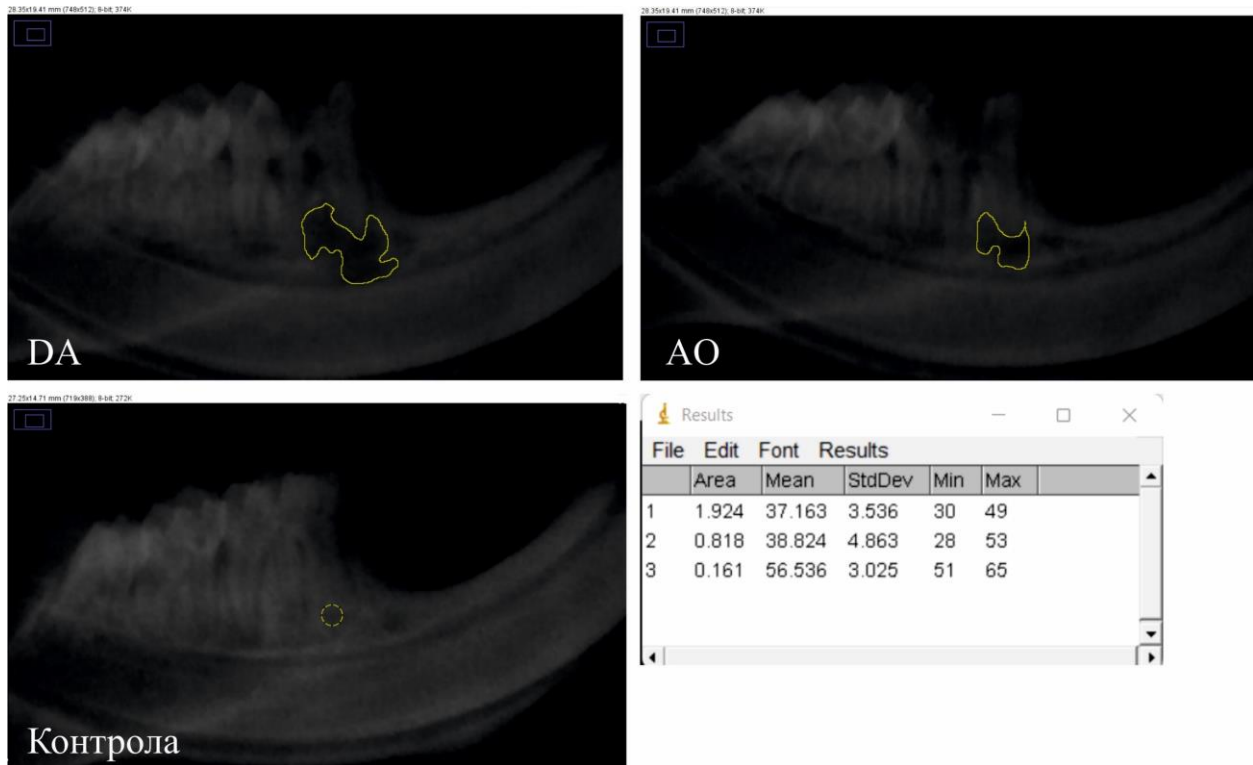
Схема 4. Хронолошки приказ експерименталне процедуре индукције периапикалних лезија. Схематски приказ индукције периапикалних лезија: од периода аклиматизације, трепанације коморе пулпе, примене 10% раствора глукозе у периоду од 14 дана и жртвовања животиња након 21 дана од индукције периапикалних лезија.

3.3.1. Жртвовање животиња и изолација периапикалних лезија и контрола

Према првом плану експеримента и према нашем претходном анималном моделу периапикалних лезија (161,162) пацови обе групе су жртвовани 14. и 28. дана експеримента. Жртвовањем 14. дана нисмо могли да потврдимо инфламацију у периапикалном региону алвеоларне кости, док 28. дана смо сматрали да је иницијална фаза инфламације завршена. Такође, према новијој литератури већина анималних модела периапикалних лезија жртвовање спроводи 21. дана од индукције болести (163,164). Из тих разлога, ми смо након пробног експеримента одлучили да жртвовање буде 21. дана. Животиње су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром (BETA NEM, Belgrade, Serbia) 21.-ог дана експеримента, након чега су им изоловане мандибуле. Малим маказама је уклоњено околно меко ткиво, мандибула је раздвојена у делу централних секутића, тако да се добију хеми-мандибуле.

3.4. РАДИОГРАФСКА АНАЛИЗА

Након изолације хеми-мандибула урађен је радиографски снимак (Sirona Dental Systems Bensheim, Germany). Коришћена је специјално направљена опрема за постављање мандибуле у исти угао и удаљеност од сензора како би се постигла униформност током радиографије. Време експозиције је постављено на 0,12 секунде (70kVp, 7mA). Сlike су анализирани помоћу софтвера *ImageJ* верзија 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)(165,166). Све слике су калибрисане помоћу скале познате дужине (ендодонтски инструмент од 21mm). Границе и величина периапикалних лезија на радиографским снимцима су обележене и израчунате у квадратним милиметрима. Измерена је и израчуната у пикселима радиолусцентна вредност подручја од интереса (периапикалне лезије и здраво периапикално ткиво) (Слика 1).



Слика 1. Приказ анализе радиографских снимка у програму *ImageJ* верзија 1.53. Приказ обележавања периапикалних лезија на радиографским снимцима DA и АО пацова, као и њихових здравих контрола. У доњем десном углу приказана је табела са подацима о површини, средњој, минималној и максималној вредности пиксела обележеног подручја периапикалних лезија.

3.5. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА

3.5.1. Фиксација и парафинизација ткивних узорака

Иzolоване хеми-мандибуле након радиографије фиксиране су у 4%-тни параформалдехид у трајању од 24 часа. Након тога, ткиво је испрано текућом водом, потопљено у 3%-тној мрављој киселини у циљу деминерализације кости. Након 45 дана ткиво је извађено из декалцината, испрано текућом водом и подвргнуто даљој процедури (дехидратација, елиминација алкохола ксилолом и импрегнација ткива течним парафином). Да би се ткиво импрегнирало парафином, неопходно је било да спроведемо процес дехидратације ткива, који подразумева стављање ткивних узорака у посуде са алкохолом у концентracији од мање ка већој (70%, 96% и 100%). Тако да се у ткиву уместо воде налази алкохол. Обзиром да би алкохол ометао процес парафинизације неопходно је да се замени медијумом који не омета парафинизацију, ксилолом. Ксилол не само да елиминира алкохол из ткива, већ и чини да ткиво транспарентним. Процес парафинизације даје ткивним узорцима потпору приликом сечења на микротому. Поступак се одвија на температури од 56-60°C. Након замене ксилола парафином, ткиво је укалупљено у парафинске блокове (постављањем ткивних узорака у металне посуде у који се налази смеша воска и парафина). Лонгитудинални пресеци дебљине 4µm добијени су сечењем на микротому. Ткивни пресеци су четкицом преношени у водено купатило (45°C), а затим су скупљани предметним стаклима. Након тога, предметна стакла са исечцима ткива су сушена у термостату (56°C) 12 сати. На сваком пресеку се налазио први мандибуларни молар у целости (круница и цео корен), као други молар и

на некима и трећи молар. Од сваке животиње обојен је сваки четврти пресек хематоксилин-еозин (енгл. *hematoxylin-eosin*, Н&Е) методом.

3.5.2. Бојење ткивних исечака хематоксилин-еозином (Н&Е)

Парафински ткивни исечци су бојени хематоксилином и еозином. Хематоксилин боји једра ћелија у плаво, а еозин боји екстрацелуларни матрикс и цитоплазму у благо црвену боју.

Процесу овог хистолошког бојења, претходио је процес депарафинизације ткива. Плочице са ткивним исечцима мандибула су биле изложене 60 минута температури од 58°C и након тога су потапане у посуде са ксилолом два пута по 10 минута. Када је депарафинизација исечака завршена уследио је поступак рехидратације ткива. Рехидратација ткива подразумева потапање ткива у алкохол (два пута у 100% алкохол, и по једном у 96%, 90% и 70% у временском интервалу од пет минута). После процеса рехидратације, уследило је бојење ткивних исечака у *Mayer*-овом раствору хематоксилина (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 10 минута, затим петоминутно испирање дестилованом и текућом водом. Ткивни исечци су даље бојени еозином (Sigma Aldrich, USA) у временском интервалу од два минута. Даље је спроведен поступак дехидратације ткивних исечака (60 секунди у 85% алкохолу, два пута у 96% и 100% по 50 секунди). Следећи корак у поступку Н&Е бојења је био просветљавање који је спроведен потапањем ткивних исечака 60 секунди у претходно припремљен раствор ксилола и алкохола у размери 1:1, и након тога два пута по 60 секунди само у ксилолу. Последњи поступак је био наношење канада балзама (Canada balsam, Centrohem, Србија) и постављање покровних стакала на ткивне исечке, након чега су остављени да се суше на собној температури 24 часа.

За даљу анализу препарати су снимани дигиталном камером која се налази на светлосном микроскопу (BX51; Olympus, Tokyo, Japan).

3.5.3. Хистоморфометријска анализа периапикалних региона

Хистоморфометријска анализа обухватала је периапикалне регионе првог десног мандибуларног молара (експериментална група) и првог левог мандибуларног молара (контролна група). Ткивни исечци су прво анализирани под светлосним микроскопом и под истим увећањем снимани дигиталном камером која се налази на светлосном микроскопу (BX51, Japan). Након фотографисања ткивних пресека, добијене фотографије су анализирани помоћу софтвера *ImageJ* 1.53. Мерена је величина ресорпције алвеоларне кости у периапикалном региону и интензитет инфламаторног инфилтратата првог десног мандибуларног молара где је индукована периапикална лезија као и ширина периодонталног лигамента првог левог мандибуларног молара у здравом периапикалном региону зуба. Код зуба где је индукована периапикална лезија границе исте су обележене у програму и селектованом региону је компјутерски одређена вредност у квадратним милиметрима која представља површину лезије. На исти начин је код првог левог мандибуларног молара мерена ширина периодонталног лигамента у периапикалном региону корена зуба.

Такође, број неутрофила је одређен уз помоћу софтвера *ImageJ* 1.53. Након што смо одредили величину периапикалних лезија и периодонталног лигамента одређиван је и укупан број неутрофила у периапикалним лезијама, али и у здравом периодонталном лигаменту. У програму је обележен један неутрофил и програм затим сам на основу задатог облика неутрофила препознаје све исте облике на фотографији, уколико смо сматрали да програм није препознао све неутрофиле на слици, сами смо их додатно

обележили. Број неутрофила смо приказали као број ћелија на квадратном милиметру на исто увеличању фотографисаних ткивних исечака.

Након добијених вредности површина периапикалних лезија, ширине периодонталног лигамента у периапикалном региону и броја неутрофила свих анализираних фотографија, резултати су анализирани у SPSS програму за статистичку обраду података.

3.6. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА АНАЛИЗА

Имунохистохемијско бојење је урађено да бисмо испитали фенотипске карактеристике инфилтрата периапикалних лезија и здравог периодонталног лигамента. Парафински ткивни исечци су бојени специфичним антипацовским антителима за CD3 и CD68 позитивне ћелије (Sigma Aldrich, USA).

За имунохистохемијско бојење коришћени су парафински пресеци дебљине 4µm. За даљи поступак, неопходно је био поступак депарафинизације, затим рехидратације који је описан у претходном поглављу. Након претходних поступака, уследило је откривање епитопа ткивних исечака кувањем у 10mM Na-цитрату 21 минут. Следећи поступак након хлађења ткивних исечака је био испирање три пута у PBS-у (енгл. *Phosphate buffered saline*, PBS). Инактивација активности ендогене пероксидазе је спроведена додавањем три капи *Hydrogen Peroxide Block-a* (Abcam, Cambridge, UK) на ткивне исечке. Ткивни исечци су инкубирани 10 минута на собној температури и након тога два пута испрани у PBS-у. Затим је на препарате додато по три капи *Protein Block-a* и поново су инкубирани 10 минута. Након завршене инкубације ткивни исечци су поново опрани у PBS-у. На ткивне исечке је додато 150µl раствора примарног антитела CD3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, каталошки број: PA5-88511) CD68 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, каталошки број: PA5-81594) у PBS-у са 1% BSA (енгл. *Bovine serum albumin*) концентрације 1:200. Ткивни исечци су након тога инкубирани 60 минута на собној температури у влажној комори. Када је завршена инкубација сви ткивни исечци су опрани три пута у PBS-у. На ткивне исечке је додато 100µl *Streptavidin Peroxidase-a*, након тога препарати су инкубирани, 10 минута и на крају три пута испрани у PBS-у. Следећи корак у имунохистохемијском бојењу је додавање три капи DAB реагенса (енгл. *3,3'-diaminobenzidine*, DAB) направљеног додавањем 20µl DAB *Chromogen-a* у 1ml DAB *Substrate-a* пуфера. Период инкубације зависи од врсте коришћеног примарног антитела. Временски период инкубације смо одређивали посматрање препарата под микроскопом брзину којом се препарати боје браон бојом. Након завршене инкубације уследило је испирање препарата у дестилованој води три пута.

Када је завршено испирање, ткивни исечци су потопљени у посуде са Mayer-овим раствором хематоксилина (Sigma Aldrich). Након два минута бојења ткивни исечци су опрани у дестилованој води. Поново је спроведен поступак дехидратације и просветљавања (описано у претходном поглављу). Ткивни исечци су прекривени воденим медијумом и прекривени покровним стаклом и сушени на собној температури 48 сати. Када су препарати потпуно осушени, анализирани су под светлосним микроскопом. Позитивно обојене ћелије су бројене на 10 различитих непреклапајућих видних поља, у програму *ImageJ* 1.53.

3.7. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ

Метода квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) је коришћена за одређивање експресије гена за цитокине и коштану ресорпцију у периапикалним лезијама и здравом периодонталном лигаменту DA и АО пацова.

3.7.1. Изолација RNA-а из периапикалних лезија и здравог периодонталног лигамента

Периапикалне лезије су изоловане из дисецираних десних мандибула 10 DA и 10 АО пацова и остављене у епрувети од 1,5mL (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) у којој се налазио *RNA later Stabilization* раствор (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) на -80°C до хомогенизације ткива. За здраву контролу коришћено је периапикално ткиво (лигамент) левог првог мандибуларног молара исте животиње. Узорци ткива су хомогенизовани у 1mL *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific) пипетом покретима “гњечења”. Када је ткиво добро хомогенизовано, узорци су након тога инкубирани на собној температури пет минута. Након периода инкубације додато је по 0,2mL хлороформа (Sigma Aldrich) на иницијално додатих 1mL *TRIzol Reagent*-а и 15 секунди енергично “мућкане” епрувете. Затим су узорци центрифугирани 15 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања јасно су се раздвојила три слоја, пажљиво су аспирирани безбојни водени слојеви у нове епрувете. У овај садржај је додато 0,5mL изопропанола (Sigma Aldrich) на иницијално додатих 1mL *TRIzol Reagent*-а. Узорци су поново инкубирани на собној температури 10 минута и након тога центрифугирани 10 минута на 12000rpm на +4°C. Када је завршено центрифугирање супернатант је аспириран и одстрањен, док је талог у епрувети испиран са 1mL 75% етанола на сваких 1mL иницијално додатих *TRIzol Reagent*-а. Узорци су благо вортексовани и затим центрифугирани пет минута на 7500rpm на +4°C. Супернатант је поново аспириран и одстрањен, епрувете су остављене отворене на собној температури 10 минута. Осушени талог у епруветама је ресуспендован у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water*, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Након тога, узорци су инкубирани у воденом купатилу у трајању од 15 минута на +55-60°C. Концентрације рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*, RNA) је измерена у 2µl узорка коришћењем микроволуменског спектрофотометра (*BioSpec-nano Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA).

3.7.2. Реверзна транскрипција RNA -а у комплементарну DNA -а и квантификација гена

Реверзна транскрипција је процес у коме се једноланчана RNA-а преводи у комплементарну дезоксирибонуклеинску киселину (енгл. *Deoxyribonucleic acid*, DNA)а. Од 1µg укупне RNA-а, синтетизована је комплементарна DNA-а помоћу кита *Thermo Scientific RevertAid and First Strand cDNA Synthesis kits* (Thermo Fisher Scientific) у присуству *oligo(dT)* прајмера према упутству произвођача. *TM SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) је коришћен за амплификацију одабраних региона гена, као и β-актин који се користи као *housekeeping* ген за нормализацију. Секвенце прајмера који су коришћене за mRNA (енг. *Messenger RNA*, mRNA) експресију IL-4, IL-17, TNF-α, INF-γ, IL-1β, RANKL и OPG су приказане у Табели 2. Коначни волумен реакције је 25µl, и садржао је *SYBR Green qPCR Master Mix*, 200 nmol L⁻¹ сваког прајмера и 2µl комплементарне DNA-а. Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*,

qRT-PCR) је изведена коришћењем *Line gene K fluorescence quantitative PCR detection system* (BIOER Technology Co, Hangzhou, China). qRT-PCR услови су били следећи: 50°C два минута, затим 95°C 10 минута, 45 циклуса 95°C 30 секунди, 55°C 30 секунди и последња фаза 72°C 10 минута. Извршена је анализа криве топљења како би се потврдило специфичност *PCR* продукта. Релативни нивои експресије израчунати су применом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ методе.

$$Ct (\text{циљани ген}) - Ct (\text{housekeeping ген}) = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct (\text{периапикална лезија}) - \Delta Ct (\text{здрав периодонтални лигамент}) = \Delta\Delta Ct$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} - \text{релативна промена нивоа експресије циљаног гена у периапикалној лезији у односу на здрав периодонтални лигамент исте животиње}$$

Резултати су изражени као средња вредност дупликата за сваки узорак, а релативни ниво експресије *mRNA* за сваки узорак представљен је као однос између експресије гена од интереса и експресије *housekeeping* гена.

Табела 2. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.

	Sense and antisense
IL-4	F: TGCACCGAGATGTTTGTACC R: GGATGCTTTTTAGGCTTTCC
IL-17	F: CTACCTCAACCGTTCCACT R: TTCTCAGGCTCCCTCTTC
TNF-α	F: GTAGCCACGTCGTAGCAAA R: CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
INF-γ	F: GCTAGATTCTGGTGACAGCTGGTG R: CACCAGCTGTCACCAGAATCTAGC
IL-1β	F: TGATGTTCCCATTAGACAGC R: GAGGTGCTGATGTACCAGTT
β-actin	F: ACGGTCAGGTCATCACTATCG R: GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
RANKL	F: CACAGCGCTTCTCAGGAGTT R: GATGGTGAGGTGAGCAAACG
OPG	F: ACAGTTTGCCTGGGACCAAA R: TCACAGAGGTCAATGTCTTGGA

3.8. АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА И ЗДРАВОГ ПЕРИОДОНТАЛНОГ ЛИГАМЕНТА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ

Сви пацови су жртвовани 21-ог дана од су индукције периапикалних лезија употребом диетилетра (BETA NEM, Serbia). Мононуклеарне ћелије су изоловане из периапикалних лезија и из здравог периодонталног лигамента исте животиње у циљу анализе методом проточне цитометрије. Применом проточне цитометрије одређена је процентуална заступљеност и апсолутан број мононуклеарних ћелија у периапикалним лезијама и здравом периодонталном лигаменту, али и фенотипске и функционалне карактеристике различитих ћелијских популација.

3.8.1. Изолација моноклеарних ћелија из експерименталних периапикалних лезија и здравог периодонталног лигамента

Након жртвовања, и након дисекције мандибуле, у пределу централних секутића мандибуле су одвојене на десну (експериментална - где је индукована периапикална лезија) и леву (контролна- здрав периодонтални лигамент) хеми-мандибулу. Са хеми-мандибула је одвојено околно ткиво и одвојен је блок кости у пределу првог мандибуларног молара (мезијалније и дисталније од третираног зуба) и затим је одмах блок кости стављен у петри шољу са 1mL некомплетног DMEM-а (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Thermo Fisher Scientific). Почетна хомогенизација ткива је спроведена у петри шољи, при чему смо се потрудили да блок кости што више исецкамо на ситне делове, при томе водећи рачуна да је узорак све време потопљен у медијуму. Након тога ткивни узорци су пребачени у епрувете од 50mL у којима је претходно сипано по 4mL DMEM-а који садржи 1mg/mL колагеназе тип IV (енгл. *collagenase type IV*; Life Technologies, Carlsbad, USA), 100µL говеђег феталног серума (енгл. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich) и 25µL EDTA (енгл. *ethylenediaminetetraacetic acid*; Sigma-Aldrich). Даље третирање ткива је настављена у воденом купатилу 60 минута на 37°C, при чему су епрувете на сваких 10 минута лагано промешане. Затим је у епрувете додато по још 5mL DMEM-а, и након тога на епрувете од 50mL стављено плаво ћелијско сито (енгл. *cellstrainer*, BDPharmingen, USA) и кроз њега је пропуштено ткиво које је дигестирано и испрано са још 5mL DMEM-а. На епрувете од 15mL је постављено зелено ћелијско сито и из претходне епрувете узорци су поново пропуштени кроз ћелијско сито, које је на крају испрано са 5mL DMEM-а. Након тога уследило је центрифугирање на 3000rpm, 10 минута. Када је завршено центрифугирање одливен је супернатант, талог ресуспендован у 1mL комплетног DMEM-а.

Након завршене изолације, а пре почетка анализе проточном цитометријом, одређена је вијабилност ћелија коришћењем *trypan blue*-а под светлосним микроскопом.

3.8.2. Фенотипска и функционална анализа изолованих моноклеарних ћелија

У овој методи коришћене су изоловане ћелија из периапикалних лезија и здравог периодонталног ткива на претходно описан начин. Да бисмо одредили различите површинске и интрацелуларне молекуле користили смо анти-пацовска моноклонска антитела (Табела 3). За анализу коришћено је 1×10^6 моноклеарних ћелија ресуспендованих у пуферу за бојење (BD Biosciences, SanJose, CA, USA) волумена 50µl.

3.8.3. Бојење површинских маркера и интрацелуларних цитокина

Процедура бојење површинских маркера и интрацелуларних цитокина је спроведена према протоколу *Cytofix/CytopermTM* (BD Biosciences). За стимулацију ћелија коришћени су 5µl PMA (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; Sigma Aldrich) и 5µl јономицина (енгл. *ionomycin*, Sigma Aldrich) и 0,8µl *GolgyStop* (BD Biosciences). Тачније јономицин и PMA су активатори транскрипције, док *GolgyStop* инхибира синтетисане протеине у органелама, што повећава број продукованих цитокина, а самим и тим шансу да се детектују ћелије које синтетишу циљане цитокине. Ћелије су инкубиране четири сата.

Након периода активације, уследило је центрифугирање: 1400rpm пет минута. Када је завршено центрифугирање супернатант је уклоњен без додиривања епрувете. а затим су ћелије ресуспендоване у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, BD Biosciences). Коначно разблажење моноклонских антитела коришћених за бојење површинских маркера је била 1:200. За бојење мембранских маркера у 50µl припремљених антитела

додате су ћелије 5×10^5 ресуспендоване у $50 \mu\text{l}$ пуфера за бојење. Овако припремљене ћелије су промешане и остављене 20 минута на температури од 4°C у одсуству светлости. Када је завршена инкубација, у ћелије је додато 2 mL хладног пуфера за бојење и затим су ћелије центрифугиране пет минута на 1400 rpm . Након центрифугирања, ћелије су фиксирани и пермеабелизоване $250 \mu\text{l}$ *Cytofix/CytopermTM* (BD Biosciences) при чему су узорци добро вортексовани, и након тога инкубирани на 4°C 20 минута. После инкубације ћелије су два пута испране у *Perm/WashTM* пуферу (BD Biosciences) и центрифугиране на 1400 rpm пет минута. Супернатант је одливан и ћелијски талог је ресуспендован у $50 \mu\text{l}$ *Perm/WashTM* пуферу који садржи претходно одређену концентрацију моноклонских антитела за интрацелуларно бојење цитокина. Узорци су инкубирани на 4°C 30 минута. Ћелије су опране у *Perm/WashTM* пуферу (BD Biosciences) и центрифугиране на 1400 rpm 15 минута. Ћелијски пелет је ресуспендован у $350 \mu\text{l}$ пуфера за бојење. Сви узорци су мерени на проточном цитометру *BD FACSAriaTM III Cell Sorter* (BD Biosciences, САД), а добијени резултати су анализирани у *Software Version 2.5* (Flowing Software Version 2.5; Informer Technologies, Roseau, Dominica).

Табела 3. Примарно конјугована моноклонска антитела

Назив	Клон	Изотип	Произвођач
FITC Mouse Anti-Rat CD3	1F4	IgM, κ	BD Pharmingen
APC Mouse Anti-Rat CD4	OX-35	IgG2a, κ	BD Pharmingen
PerCP-Cy TM 5.5 Mouse Anti-Rat IL-17	eBio17B7	IgG2a, κ	Thermo Fisher Scientific
PE Mouse Anti-Rat IL-10	A5-4	IgG2b, κ	BD Pharmingen
Alexa Flour 488 Mouse Anti-Rat INF- γ	2A 8F4	IgG, κ	Abcam

3.9. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ

Пацови обе експерименталне групе су жртвовани 21-ог дана експеримента. Животиње су анестезиране у атмосфери засићеној диетилетром (BETA NEM, Београд) и жртвоване декапитацијом, при чему је прикупљена крв у епрувете са антикоагулантним средством. Прикупљена крв је центрифугирана у трајању од 10 минута на 3000 rpm , након чега је добијена безбојна фаза која је серум. Концентрације IL-6 и TNF- α одређене су коришћењем комерцијалних китова *ELISA DuoSet Rat* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). По $100 \mu\text{l}$ *Capture* антитела је претходни дан апликовано у микротитар плочу и инкубирано на собној температури 18 сати. Када је завршена инкубација свако бунарче је три пута опрано са $250 \mu\text{l}$ *Wash Buffer*-а. Затим је *Block Buffer* стављен само у бунарчиће где смо одређивали концентрације цитокина TNF- α , док је у остале сипано по $150 \mu\text{l}$ *Reagent Diluent*-а након чега је фолија стављена преко микротитар плоче и остављена 60 минута на собној температури. Након 60 минута плоче су три пута опране *Wash Buffer*-ом. $200 \mu\text{l}$ одговарајућег стандарда је апликовано у свако прво бунарче за цитокине, а у остале бунарчиће прве колоне је сипано по $100 \mu\text{l}$ *Reagent Diluent*-а. Опадање концентрације стандарда је постигнуто тако што је из првог бунарчета прве колоне узето $100 \mu\text{l}$ стандарда одговарајуће концентрације и пребачено у друго бунарче исте колоне. Затим је из другог бунарчета опет узето $100 \mu\text{l}$ и сипано у треће бунарче, све тако до седмог бунарчета, да би на крају у осмом бунарчету се налазило $100 \mu\text{l}$ *Reagent Diluent*-а. У остале бунарчиће су апликовани узорци серума према већ одређеној шеми, при чему

је укупан волумен сваког бунарчета био 100 μ l (20 μ l серума и 80 μ l дестиловане воде), на крају су плоче покривене фолијом. Након инкубације од два сата на собној температури, садржај плоче је просут и плоча је три пута опрана са по 250 μ l Wash Buffer-а свако бунарче. Када је завршено прање у бунарчиће је додато по 100 μ l *Detection* антитела, плоча је поново покривена и остављена два сата на собној температури. Садржај плоче је опет просут и плоча је поново три пута опрана са по 250 μ l Wash Buffer-а свако бунарче. Када је то завршено у свако бунарче је апликовано по 100 μ l радног раствора *Streptavidin-HRP*-а (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*), плоче су покривене и поново је уследила инкубација (20 минута на собној температури у мраку). Након завршетка инкубације садржај плоче је поново просут и поново опран на горе објашњен начин. У свако бунарче сипано је по 100 μ l раствора са супстратом А и Б и остављено 20 минута на собној температури у мраку. Време инкубације је одређено интензитетом плаве боје. Када је завршена инкубација у свако бунарче је додато по 50 μ l стоп раствора и микротитар плоче су постављене пете минута на мешалицу на 100 обртаја. Апсорбанца је мерена на *ZENYTH 3100 apparatus* на 450nm. Добијени резултати су анализирани у програму *Software for Anthos Multimode Detectors* (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria).

3.10. БИОХЕМИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ СИСТЕМСКИХ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА

Током жртвовања животиња узорци крви за одређивање системских прооксиданаса и антиоксиданаса су сакупљени у тренутку жртвовања пацова. Прво, крв је центрифугирана да би се еритроцити (енгл. *red blood cells*, RBCs) раздвојили од плазме. У току центрифугирања, RBCs се скупљају на дну (црвени слој), док плазма остаје на површини као горња фаза (жути слој), RBCs се испирају и чувају у облику лизата.

У плазми мерени су нивои прооксидативних параметара: индекс липидне пероксидације (енгл. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), нитрити (NO₂⁻), супероксид анјон радикал (O₂⁻) и водоник пероксид (H₂O₂), док је у лизату еритроцита одређивана активност ензимског система одбране проценом концентрације каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), као и активност редукованог глутатиона (GSH). Сви наведени биохемијски параметри одређивани су спектрофотометријски, помоћу Shimadzu UV 1800 спектрофотометра (Kyoto, Japan).

3.10.1. Индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS)

За мерење липидне пероксидације у плазми, коришћена је индиректна метода. Користили смо 0,4ml плазме и 0,2ml 28% трихлорацетатне киселине. После пар секунди мешања и 15 минута инкубације на леду, узорци су центрифугирани при брзини од 6000rpm, 15 минута. Након тога је 0,4ml супернатанта издвојено и спојено са 0,1ml 1% тиобарбитуратне киселине у натријум хидроксида (NaOH). Затим је уследила инкубација у воденом купатилу на 100°C, 15 минута и 10 минута инкубације на собној температури.

На крају мерена је концентрација TBARS на таласној дужини од 530nm, на основу једначине:

$$\mu\text{mol TBARS/ml плазма} = \Delta A (As - Abt) / 1,56 \times 1,25$$

(ΔA – финална апсорбанца; As – апсорбанца узорка; Abt – апсорбанца слепе пробе; 1,56 и 1,25 су фактори корекције коришћени у овом есеју;)

За слепу пробу коришћена је дестилована вода.

3.10.2. Нитрити (NO_2^-)

Одређивање ослобођених нитрита представља индиректну методу за одређивање азот монооксида. Прво смо сипали у тубу 0,1ml перхлорне киселине, затим четири пута више етилендиаминтетраацетатне киселине (20 mM) и 0,2ml узорка плазме. Затим је уследило мешање и инкубација од 15 минута на -4°C , након чега узорци су центрифугирани 15 минута на 6000rpm. Када је завршено центрифугирање у талог је додато 220 μl калијум карбоната, а након неколико минута у нове епендорф тубе је пипетирано 220 μl тог узорка и додато 250 μl Griess-овог реагенса и 125 μl пуфера за NO.

Након 15 минута инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца на таласној дужини од 550nm. Дестилована вода је коришћена као слепа проба.

Како бисмо добили концентрацију ослобођеног NO_2^- , направљена је калибрациона крива тако што су познате концентрације NaNO_2 додаване у 1ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора, а апсорбанца је мерена на таласној дужини од 550 nm.

Стандардни фактор (F) прерачунао је из следеће једначине:

$$\text{(екстинкција стандарда – екстинкција слепе пробе)/концентрација NaNO}_2 \text{ у стандардима}$$

Ову једначину смо користили за сваки стандард (F1-F4), а коначна вредност (F), која се користила представља њихову аритметичку средину. Након чега је разлика екстинкција узорка и слепе пробе подељена са вредношћу која је добијена за стандарде:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml плазма} = \Delta E (E_s - E_{bt})/F$$

(ΔE – финална апсорбанца; E_s – апсорбанца узорка; E_{bt} – апсорбанца слепе пробе; F – аритметичка средина добијених стандарда;)

3.10.3. Супероксид анјон радикала (O_2^-)

У узорцима плазме супероксидни анјон радикал је мерен према следећем протоколу: у 50 μl плазме је додато 950 μl есејне смеше, након чега је апсорбанца мерена три пута на сваких 60 секунди на таласној дужини од 550nm. За слепу пробу користили смо дестиловану воду. Концентрација је одређена на основу следећих једначина:

$$\begin{aligned} \Delta E_s &= E_{2s} - E_{1s} \text{ (узорак)} \\ \Delta E_{bt} &= E_{2bt} - E_{1bt} \text{ (слепа проба)} \\ \Delta E &= \Delta E_s - \Delta E_{bt} \\ \text{nmol O}_2^-/\text{ml плазме} &= \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \end{aligned}$$

(ΔE – финална апсорбанца; E_s – апсорбанца узорка; E_{bt} – апсорбанца слепе пробе; 0,015 и 0,05 су корекциони фактори коришћени у овом есеју;)

3.10.4. Водоник пероксид (H_2O_2)

За мерење концентрације водоник пероксида, у 200 μl узорка плазме прво је потребно додати 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl пероксидазе (POD). После 10 минутне инкубације на собној температури, измерена је апсорбанца на 610nm. За слепу пробу користили смо дестиловану воду. Мерење је било у временском интервалу, од пет до 60 минута. Концентрација H_2O_2 у узорцима измерена је помоћу стандардне криве, која је направљена стандардним *Stock* раствором H_2O_2 . У три епрувете је сипано по 5, 10 и 20 μl стандарда H_2O_2 и додато је 200 μl дестиловане воде, 800 μl фенол-црвеног раствора и

10μl HRPO. Након периода инкубација измерене су финалне концентрације. Концентрација H₂O₂ у узорцима израчуната је према следећој једначини:

$$\begin{aligned} \Delta A &= A_s - A_{bt} \\ F &= \Delta A / \text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{cuv} \\ \text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{ml плазма} &= \Delta A / F \end{aligned}$$

(F је фактор апсорбанце/nmol H₂O₂; ΔA – коначна (финална) апсорбанца; A_s – апсорбанца узорка; A_{bt} – апсорбанца слепе пробе;)

3.10.5. Каталаза (CAT)

Активност каталазе је измерена у претходно разблаженим лизираним еритроцитима (удео воде 1:7 и етанола 0,1:1). У епруветама где је претходно сипано 50μl CAT пуфера је додато 100μl на претходни начин припремљених еритроцита и 1ml 10mM H₂O₂. Дестилована вода је коришћена за слепу пробу. Сви узорци су мерени 6 пута узастопно на таласној дужини од 360nm. Финалне вредности су добијене на основу формуле која подразумева одузимање, а затим и аритметичку средину добијених вредности.

3.10.6. Супероксид дисмутаза (SOD)

Како бисмо одредили активност SOD у 100μl лизираних еритроцита, додали смо 1000μl карбонатног пуфера, а после мешања додато је 100μl адреналина. Мерење SOD се заснива на епинефринској методи по *Beutler*-у. За слепу пробу, користили смо одговарајуће количине споменутих раствора. Сви узорци измерени су на таласној дужини од 470nm.

3.10.7. Редукован глутатион (GSH)

За одређивање активности GSH у лизату еритроцита, коришћена је спектрофотометријска метода заснована на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дителиобис-6,2-нитробензоевом киселином, методом према *Beutler*-у. У 50μl еритроцита сипано је 200μl 0,1% етилендиаминтетраацетата и 385μl преципитационог пуфера. После инкубације у трајању од 15 минута на -4°C, 10 минутног центрифугирања на 4000rpm, добија се екстракт. У 300μl екстракта апликовано је 750μl натријум дифосфата и 100μl 5,5-дителиобис-6,2-нитробензоеве киселине. После инкубације од 10 минута на собној температури, узорци су мерени на таласној дужини од 412nm. Дестилована вода у заједно са горе поменутих растворима је коришћена за слепу пробу. Како бисмо израчунали GSH концентрацију у узорцима, направљена је калибрациона крива помоћу четири стандарда са већ познатим концентрацијама глутатиона.

3.11. ОДРЕЂИВАЊЕ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА И ЗДРАВОМ ПЕРИОДОНТАЛНОМ ЛИГАМЕНТУ

Узорци периапикалних лезија и здравих периодонталних лигамената су хомогенизовани са 10% са 0,5ml 50mmol L⁻¹ PBS-а. Након ручне хомогенизације узорци су вортексовани и додатно хомогенизовани. Након тога узорци су центрифугирани на 10.000rpm, 10 минута. После центрифугирања добили смо талого и супернатант. Супернатант је коришћен за даље анализе, параметри оксидативног стреса у периапикалним лезијама и здравом периодонталног лигаменту су мерени на претходно описан начин.

3.12. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

Добијени резултати анализирани су у софтверском програму за статистичку анализу података *Statistical Package for Social Sciences v23.0* (SPSS Inc., САД). Непараметарски *Kruskal-Wallis H* и *Mann-Whitney U* тестови или параметарски *One-Way ANOVA* и *Independent Samples T-test* тестови су коришћени у зависности нормалности расподеле података. Резултати су изражени као медијана и распони (25. и 75. перцентил) или средње вредности $\pm SE$. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група је одређена на $p < .05$.



РЕЗУЛТАТИ

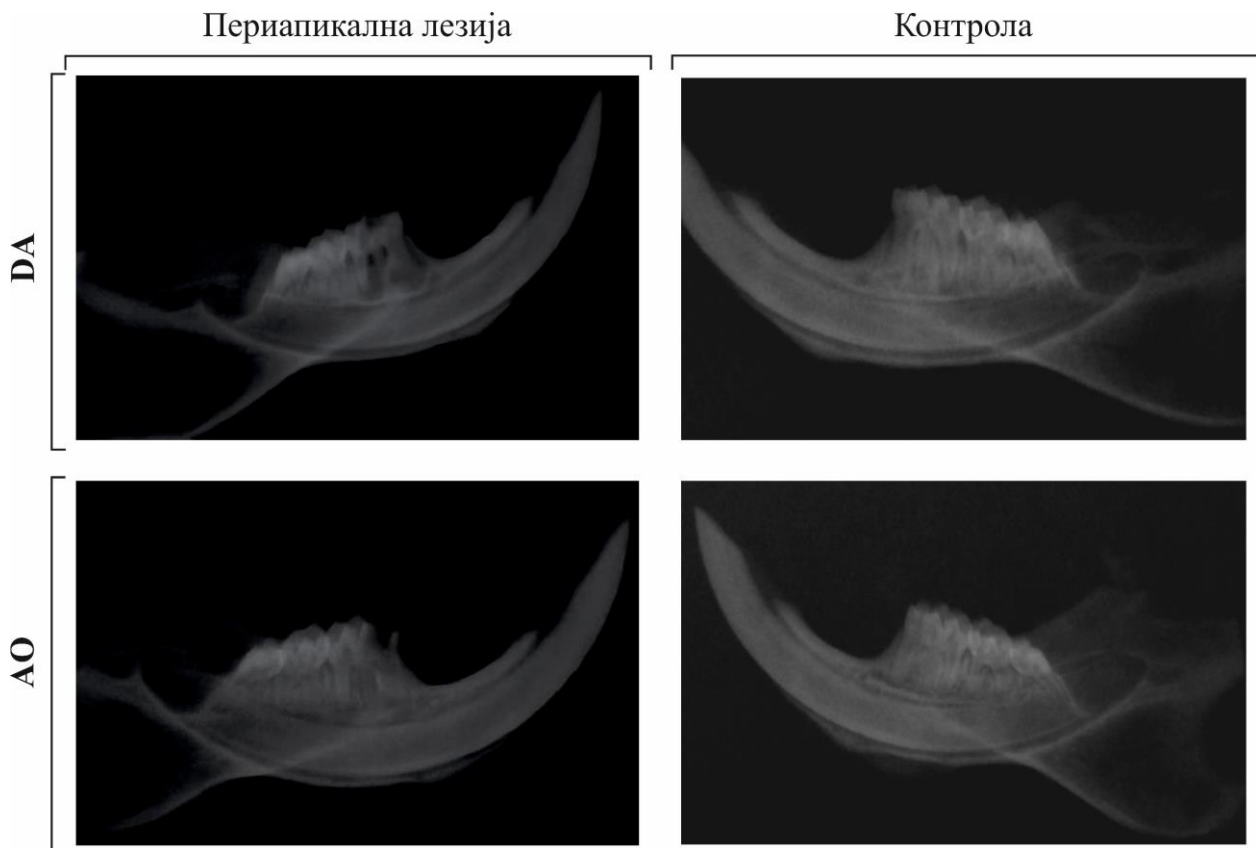
COUNTRY STATE UK 1234

4. РЕЗУЛТАТИ

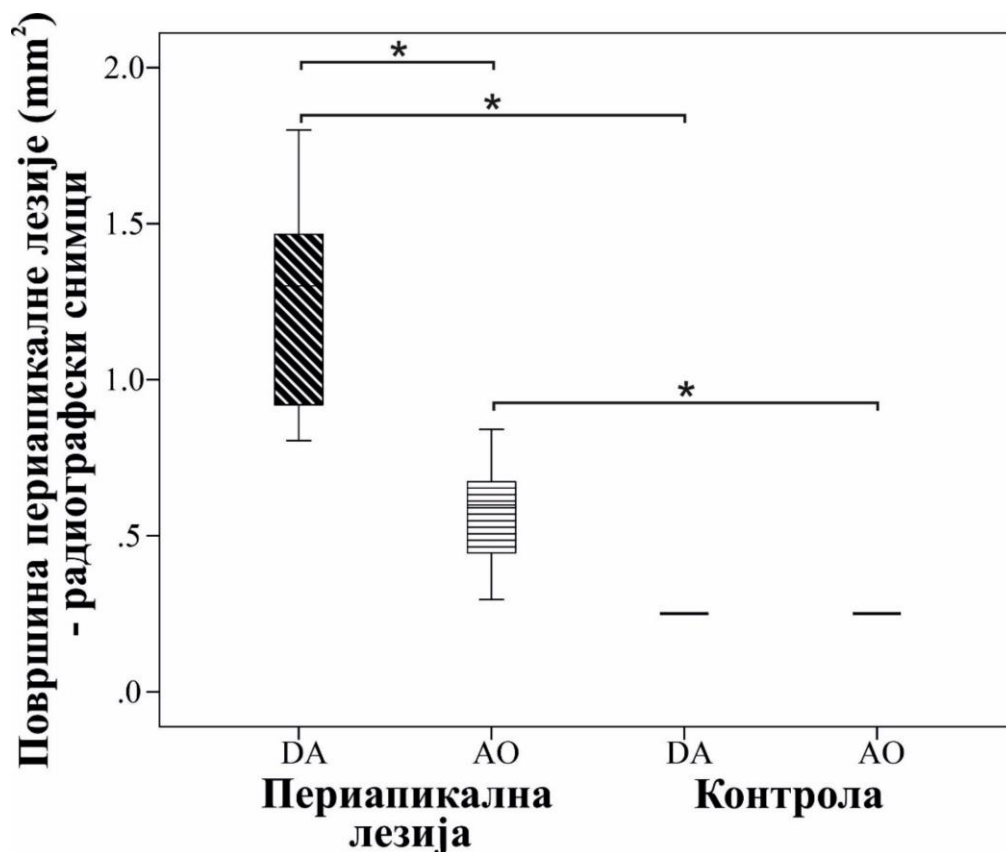
4.1. РАДИОГРАФСКА АНАЛИЗА ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА

Прва и најједноставнија метода дијагностиковања периапикалних лезија је радиографска метода. Поред ране детекције периапикалних лезија, радиографски налаз нам даје податке о величини лезије и степену радиолусценције (167,168). У претходним студијама радиографска анализа је коришћена за процену и дијагностиковање врста периапикалних лезија (гранулома и циста) (167–170), као и исхода различитих терапијских процедура (165). Међутим, у до сада познатој литератури нико није испитивао разлике у величини и радиолусценцији периапикалних лезија код ова два соја пацова.

Постојање периапикалних лезија првенствено смо потврдили радиографским снимцима вилица (Слика 2.). Површина периапикалних лезија мерена у програму *ImageJ* 1.53 је била статистички значајно већа код DA у односу на АО пацове (1,25 (0,90-1,56) vs 0,69 (0,42-0,72) mm²; p<.05; Слика 3.; Табела 4.). Детектовали смо статистички значајну разлику између све четири групе и експерименталних и контролних DA и АО пацова у величини лезије радиографским снимцима (p<.05).

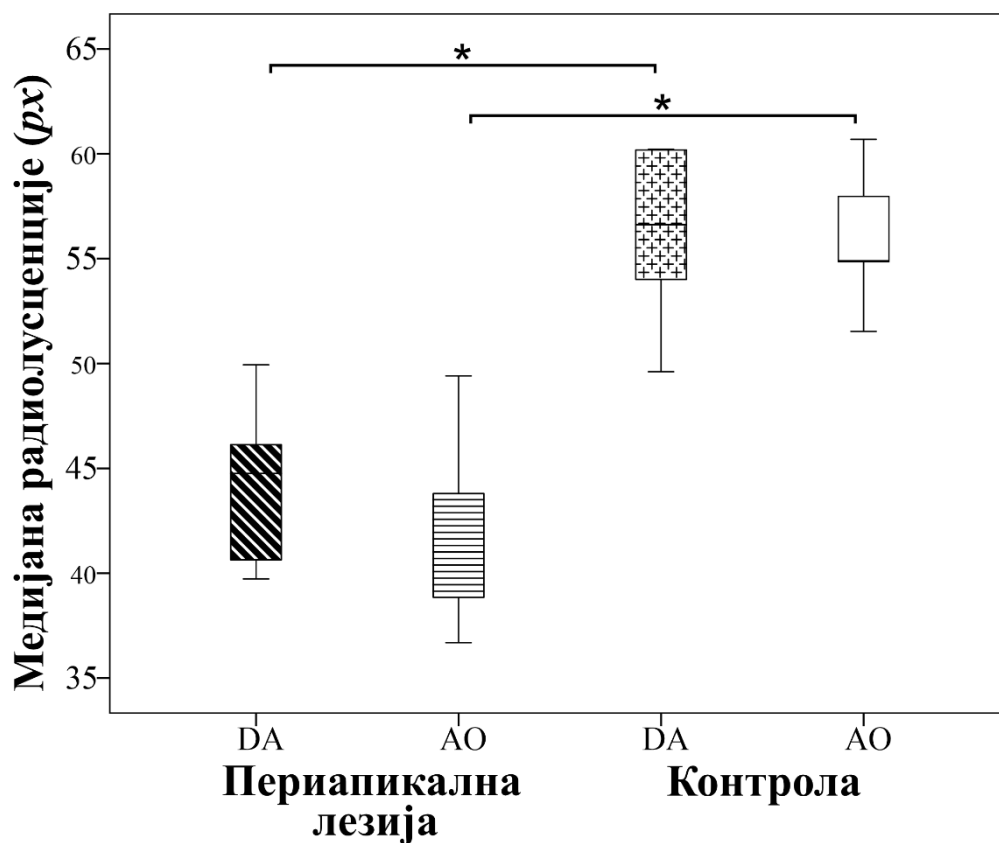


Слика 2. Радиографски приказ периапикалних лезија и здравих мандибуларних вилица DA и АО пацова. Репрезентативне фотографије радиографских снимака мандибуларних вилица DA и АО пацова. На левом панелу су фотографије радиографских снимака периапикалних лезија у пределу врха корена десног првог мандибуларног молара код DA (слика горе) и АО (слика доле) пацова. На десном панелу су фотографије радиографских снимака контрола (здрава лева мандибула исте животиње) DA (слика горе) и АО (слика доле).



Слика 3. Површина периапикалних лезија на радиографским снимцима. Постоји статистички значајна разлика у величини површине периапикалних лезије између DA и AO пацова ($p < .05$). Статистички значајна разлика је показана и између периапикалних лезија и контрола DA и AO пацова ($p < .05$). Све анализе и мерења величине периапикалних лезија и величине здравог периодонталног лигаментa исте животиње (контрола) су урађене у програму *ImageJ 1.53*. Вредности су приказане као медијана и опсег (25th – 75th) перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом (*Mann-Whitney U* и *Kruskal-Wallis H* тестови). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Медијане радиолусценције су статистички значајно мање код периапикалних лезија DA и AO пацова у поређењу са DA и AO здравим периапикалним ткивом, што указује на већу ресорпцију кости (43,93 (40,10-46,19) vs 58,74 (51,81-60,19) px и 41,26 (38,50-44,23) vs 54,61 (53,19-59,33) px ; $p < .05$, редом; **Слика 4.; Табела 3;**). Није детектована статистички значајна разлика у средњој вредности радиолусценције периапикалних лезија DA и AO пацова (43,93 (40,10-46,19) vs 41,26 (38,50-44,23); $p = 0.24$), и здравог периодонталног ткива оба соја пацова (58,74 (51,81-60,19) vs 54,61 (53,19-59,33); $p = 1.00$; **Слика 3.**).



Слика 4. Радиолусценција периапикалних лезија. Није детектована статистички значајна разлика у радиолусценцији површине периапикалних лезија између DA и AO пацова ($p > .05$). Међутим, статистички значајна разлика је детектована између периапикалних лезија и контрола DA и AO пацова ($p < .05$). Све анализе и мерења величине периапикалних лезија и величине здравог периодонталног лигамента исте животиње (контрола) су урађене у програму *ImageJ 1.53*. Вредности су приказане као медијана и опсег (25th – 75th) перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом (*Mann-Whitney U* и *Kruskal-Wallis H* тестови). $n = 9-10$ животиња по групи.

*Значајна разлика ($p < .05$)

Табела 4. Радиографска анализа периапикалних лезија

	Површина (mm ²)			Радиолусценција (рх)		
	медијана	25 и 75 перцентил	р	медијана	25 и 75 перцентил	р
DA – периапикална лезија	1,25	0,90-1,56	*<.05	43,93	40,10-46,19	>.05
AO – периапикална лезија	0,69	0,42-0,72		41,26	38,50-44,23	
DA – контрола	0,21	0,18-0,22	>.05	58,74	51,81-60,19	>.05
AO – контрола	0,23	0,19-0,24		54,61	53,19-59,33	

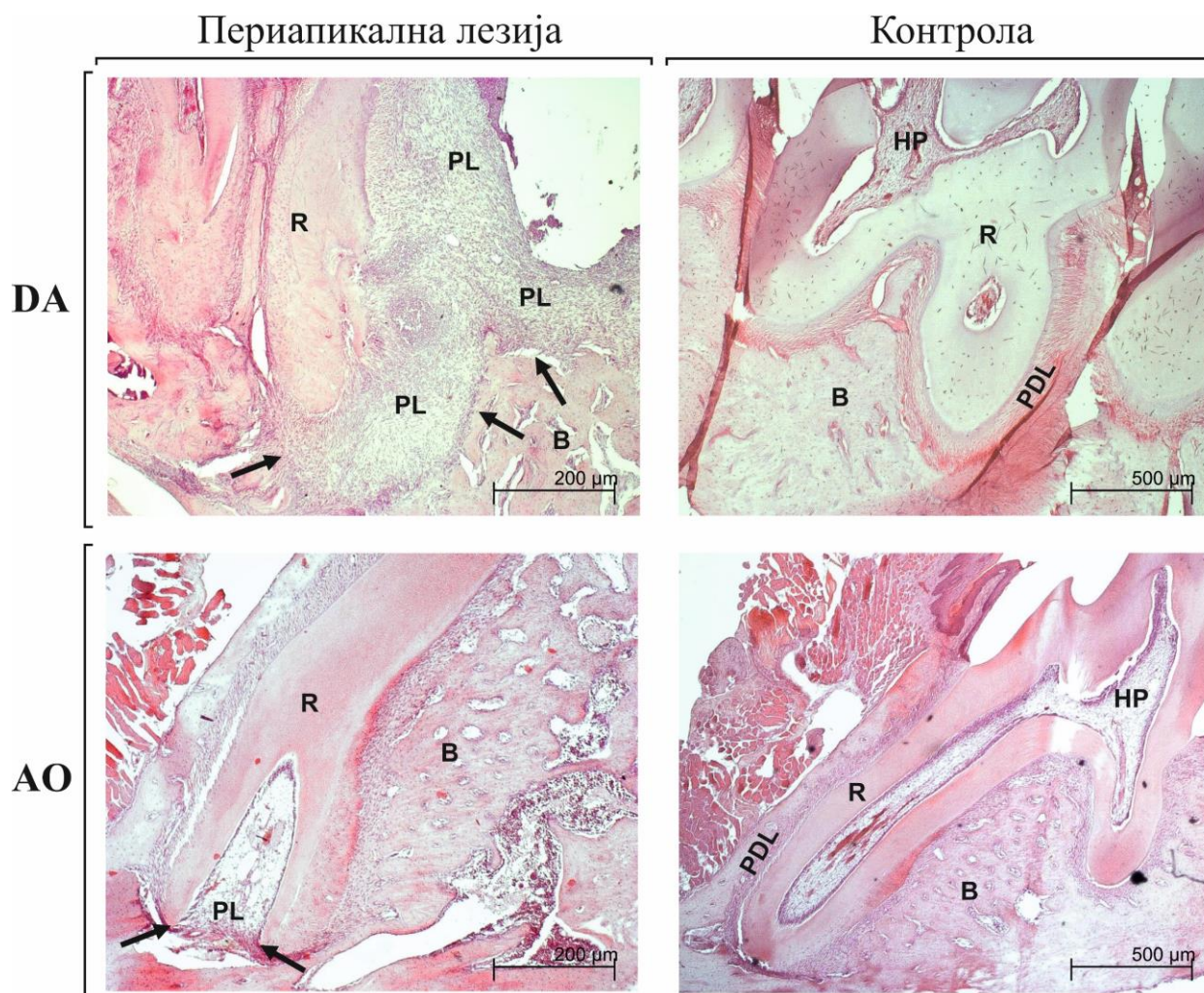
Вредности су приказане као средња вредност и опсег (25th – 75th) перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом (*Mann-Whitney U* и *Kruskal-Wallis H* тестови).

*Значајна разлика (р<.05)

4.2. ВЕЛИЧИНА ПЕРИАПИКАЛНЕ ЛЕЗИЈЕ И ИНФИЛТРАЦИЈА НЕУТРОФИЛА

У овом експерименталном моделу периапикална инфламација је индукована отварањем круница првог десног мандибуларног молара и након потврде да постоји комуникација пулпе и оралне средине, зуби су остављени “отворени” 21 дан. Како би одредили степен деструкције алвеоларне кости у периапикалном ткиву, урађена је патохистолошка и хистоморфометријска анализа. У бројним претходним студијама величине периапикалних лезија је анализирана на *H&E* пресецима (168,171,172), ипак не постоји стандардизована метода која је прихваћена за квантификацију лезија. Углавном су коришћене дескриптивне методе (мала, средња, велика периапикална лезија) (168,171), међутим да би избегли субјективност у хистоморфометријској анализи користили смо програм *ImageJ* 1.53.

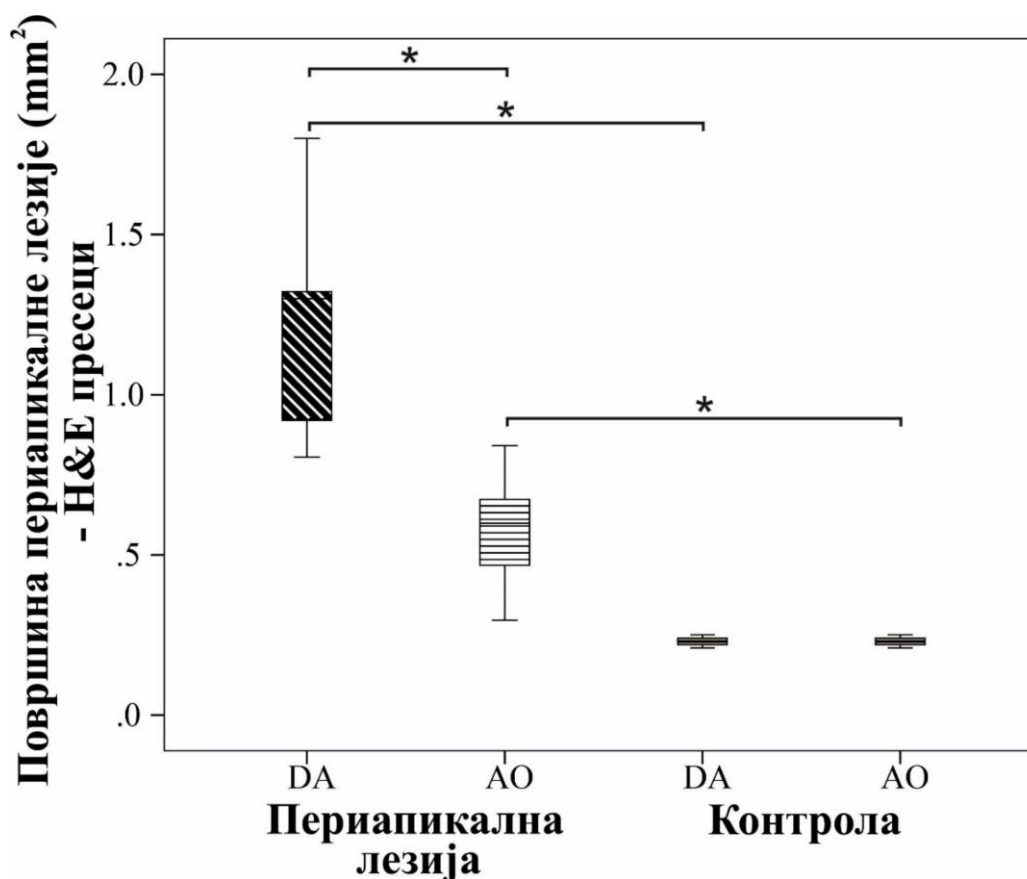
Анализом *H&E* пресека помоћу светлосне микроскопије показали смо да постоје разлике у величини периапикалних лезија између **DA** и **AO** пацова претходно потврђене и на радиографским снимцима. Инфилтрација инфламаторним ћелијама и ресорпција алвеоларне кости значајно су израженије код периапикалних лезија **DA** у поређењу са **AO** пацовима (Слика 4).



Слика 5. Периапикалне лезије и здраве мандибуларне вилице DA и АО пацова, H&E бојење.

Репрезентативне фотографије ткивних пресека мандибуларних вилица DA и АО пацова. На левом панелу су фотографије ткивних пресека периапикалних лезија у пределу врха корена десног првог мандибуларног молара код DA (слика горе) и АО (слика доле) пацова (стрелице, PL- периапикална лезија (енгл. *Periapical lesion*, PL), R - корен (енгл. *Root*, R), B- алвеоларна кост (енгл. *Bone*, B). На десном панелу су фотографије ткивних пресека контрола (здрава лева мандибула исте животиње) DA (слика горе) и АО (слика доле) пацова (PDL- периодонтални лигамент (енгл. *Periodontal ligament*, PDL), R-корен (енгл. *Root*, R), B-алвеоларна кост (енгл. *Bone*, B), HP-здрава пулпа (енгл. *Healthy pulp*, HP)

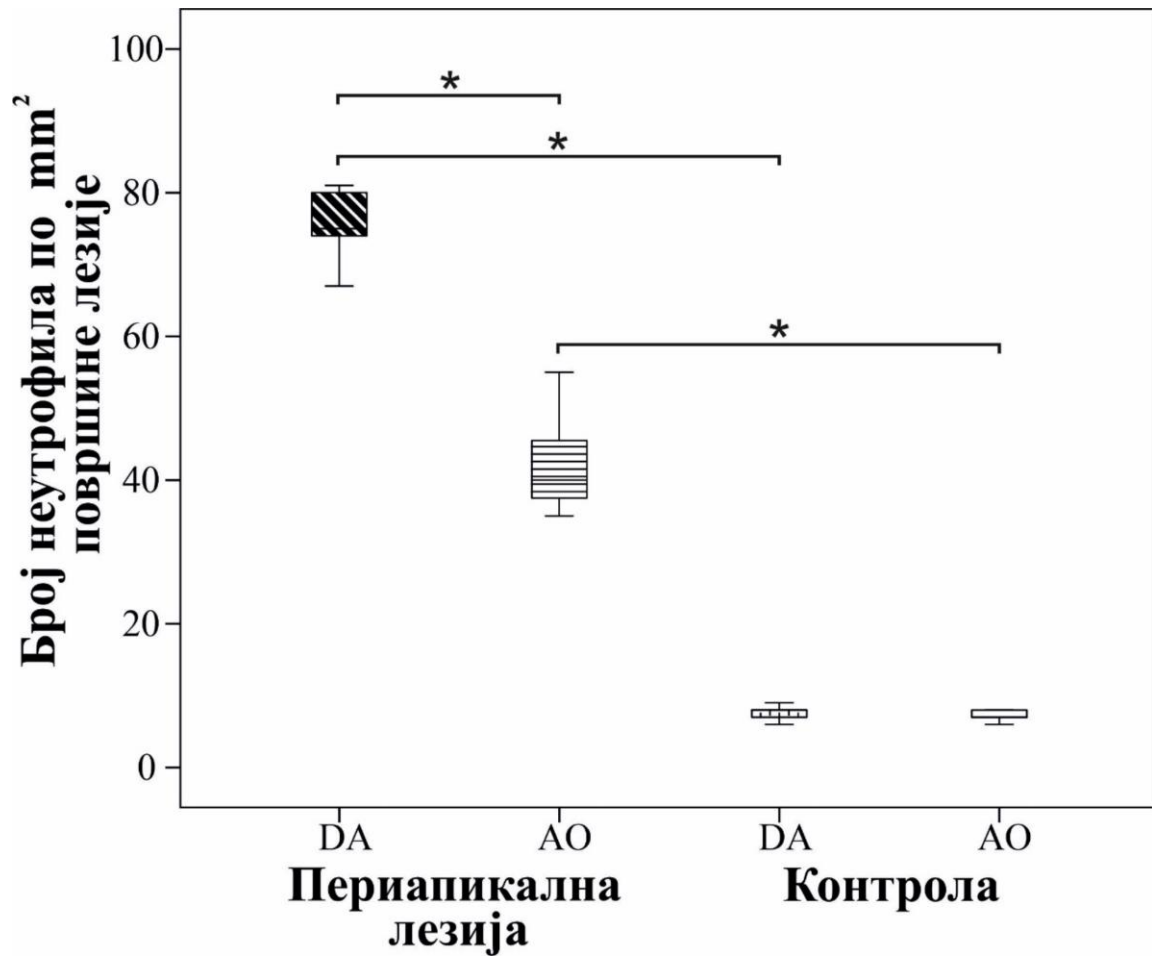
Резултати дескриптивне хистологије потврђени су и квантитативном методом коришћењем програма *ImageJ* 1.53. Просечна величина периапикалне лезије на H&E пресецима DA пацова је статистички значајно већа него код АО пацова (1.19 (0.81-1.80) vs 0.56 (0.30-0.84) mm², p<.05; Слика 6.; Табела 5.;). Разлике у величини периапикалних лезија између све четири групе и експерименталних и контролних DA 1.19 (0.81-1.80) vs 0.23 (0.21-0.25) mm² и АО пацова 0.56 (0.30-0.84) vs 0.23 (0.21-0.25) mm², су статистички значајне (p<.05) (Слика 6.).



Слика 6. Површина периапикалних лезија на ткивним пресецима Н&Е бојења. Постоји статистички значајна разлика у величини површине периапикалних лезије између DA и АО пацова ($p < .05$). Статистички значајна разлика је детектована и између периапикалних лезија и контрола DA и АО пацова ($p < .05$). Све анализе и мерења величине периапикалних лезија и величине здравог периодонталног лигаментa исте животиње (контрола) су урађене у програму *ImageJ 1.53*. Вредности су приказане као медијана и опсег (25^{th} – 75^{th}) перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом (*Mann-Whitney U* и *Kruskal-Wallis H* тестови). $n = 9-10$ животиња по групи.

*Значајна разлика ($p < .05$)

Показано је да су локални фокуси инфилтрације неутрофилима присутни у гранулатионом ткиву код хроничних периапикалних лезија (173). Стога смо, даљом хистолошком анализом квантификовали присуство неутрофила у инфламираном периапикалном ткиву. Резултати наше студије показују да је апсолутни број неутрофила био већи код DA пацова у поређењу са АО пацовима ($76 \pm 6,1$ vs $43 \pm 4,2$ ћелија по пољу, $p < .05$; Слика 7.; Табела 5.).



Слика 7. Број неутрофила по mm^2 површине периапикалних лезија на ткивним пресецима. Постоји статистички значајна разлика у броју неутрофила по mm^2 површине периапикалних лезија између DA и АО пацова ($p < .05$). Статистички значајна разлика је детектована и између периапикалних лезија и контрола (здрав периодонтални лигамент) DA и АО пацова ($p < .05$). Одређивање броја неутрофила је урађено у програму *ImageJ 1.53*. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*- тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Табела 5. Величина периапикалне лезије и инфилтрација неутрофилима

	Површина (mm ²)			Неутрофили (број по mm ² површине)	
	медијана	25 и 75 перцентил	р	средња вредност ± SE	р
ДА – периапикална лезија	1,19	0,81-1,80	* < .05	76 ± 6,1	> .05
АО – периапикална лезија	0,56	0,30-0,84		43 ± 4,2	
ДА – контрола	0,23	0,21-0,25	> .05	7 ± 0,4	> .05
АО – контрола	0,23	0,21-0,25		8 ± 0,3	

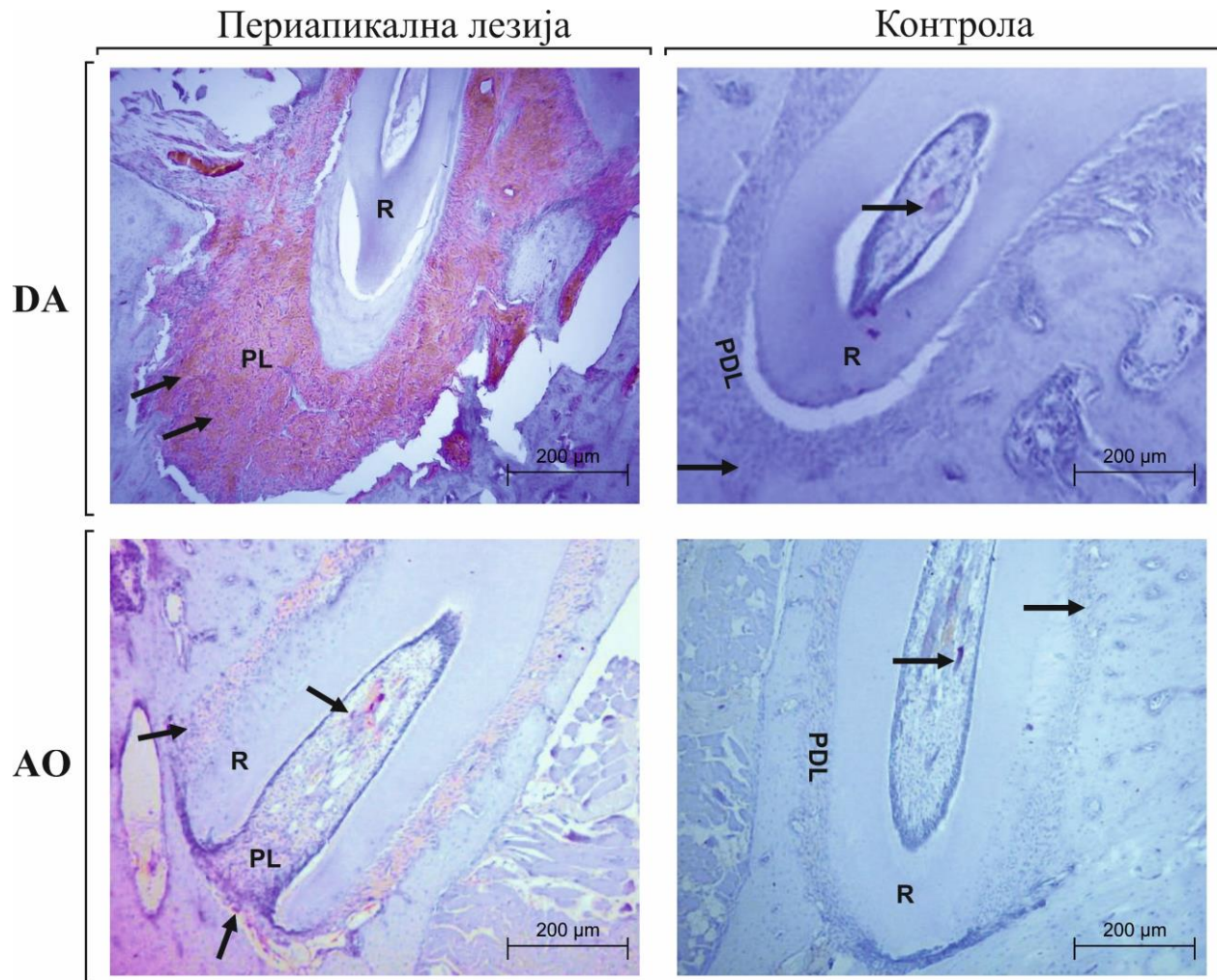
Вредности су приказане као медијана и опсег (25th – 75th) перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом (*Mann-Whitney U* и *Kruskal-Wallis H* тестови) за површину лезије. Вредности за број неутрофила су приказане као средња вредност, ± SE (*Independent Samples T*-тест).

*Значајна разлика (p < .05)

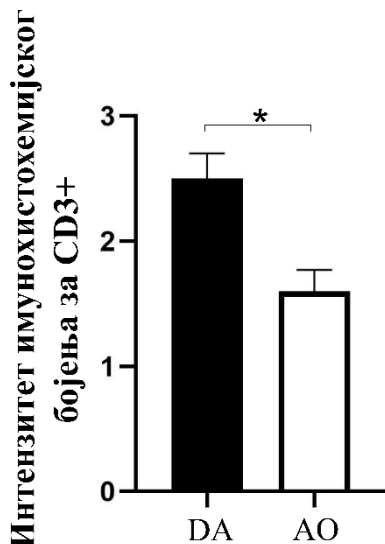
4.3. ТКИВНА ЕКСПРЕСИЈА CD3 И CD68 МАРКЕРА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА

Макрофаги (CD68) и лимфоцити (CD3) су поред неутрофила најбројније имунске ћелије у периапикалним лезијама (34). Макрофаги имају централну улогу у урођеном, неспецифичном имунском одговору, али и у регулацији деструкције и репарације везивног ткива (174). Осим тога, показано је да рана колонизација макрофагима код ДА пацова може бити одговорна за повећану осетљивост на развој ЕАЕ у односу на АО пацове (175). До сада није анализирана експресија маркера CD3 и CD68 у периапикалним лезијама ова два соја пацова.

Патохистолошка анализа инфламације на основу ткивне експресије CD3 и CD68 маркера је спроведена имунохистохемијским бојењем. Експресија CD68+ ћелија у периапикалним лезијама је већа код ДА пацова у односу на АО пацове (*data not shown*). Анализом је показано да CD3+ ћелија има у већем броју у периапикалним лезијама ДА пацова у поређењу са периапикалним лезијама АО пацова (Слика 8.). У здравом периодонталном лигаменту заступљеност CD3+ ћелија је била минимална код оба соја пацова (Слика 8.).



Слика 8. Експресија CD3 молекула у периапикалним лезијама DA и АО пацова, имунохистохемијско бојење. Репрезентативне фотографије ткивних пресека мандибуларних вилица DA и АО пацова. На левом панелу су фотографије експресије CD3 молекула у периапикалним лезијама у пределу врха корена десног првог мандибуларног молара код DA (слика горе) и АО (слика доле) пацова (стрелице - експресија CD3, PL- периапикална лезија (енгл. *Periapical lesion*, PL), R - корен (енгл. *Root*, R). На десном панелу су фотографије ткивних пресека контрола (здрава лева мандибула исте животиње) DA (слика горе) и АО (слика доле) пацова (стрелице - експресија CD3, PDL- периодонтални лигамент (енгл. *Periodontal ligament*, PDL), R-корен (енгл. *Root*, R).



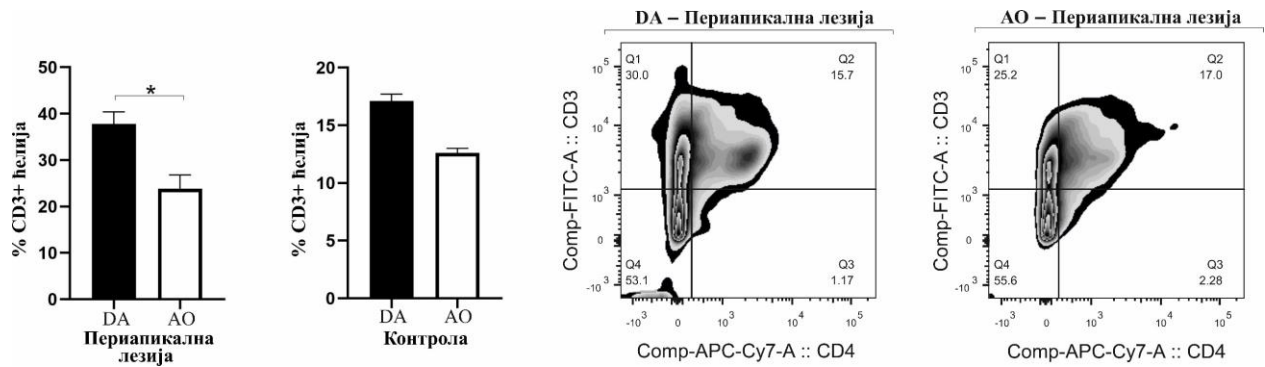
Интензитет имунохистохемијског бојења за CD3+ ћелије био је значајно већи код периапикалних лезија DA пацова у поређењу са АО пацовима ($2,5 \pm 0,2$ скор vs $1,6 \pm 0,13$ скорa експресије, $p < .05$; Слика 9.).

Слика 9. Интензитет имунохистохемијског бојења CD3 у периапикалним лезијама DA и АО пацова. Постоји статистички значајна разлика у експресији CD3 између DA и АО пацова ($p < .05$). Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T-тест*). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

4.4. ЗАСТУПЉЕНОСТ Th1/Th17 И T_{regs} СУБПОПУЛАЦИЈА ЋЕЛИЈА У ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА

Периапикалне лезије могу имати различиту заступљеност појединих субпопулација имунских ћелија и њихових проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина. Показано је да имунски профил инфламаторног инфилтрата и последична секреција цитокина утичу на величину, степен деструкције алвеоларне кости и клиничке симптоме периапикалних лезија. Познато је да Th1/Th17 лимфоцити повећавају инфламацију, а цитокини који они секретују доведе до последичног повећања периапикалних лезија, услед иницијације остеокластогенезе. Супротно, имуносупресивни лимфоцити секрецијом IL-10 утичу на смањење периапикалних лезија тако што смањује продукцију главних Th1/Th17 проинфламаторних цитокина: IL-17 и INF- γ (60,61). Такође, претходно је показано да су Th1/Th17 DA пацови осетљивији на развој ЕАЕ-а и дијабетес мелитуса тип I него Th2 АО пацови и да за то могу бити одговорни различити типови имунских одговора између ова два соја (150,152,159). Да би утврдили да ли су различити типови имунских одговора између ова два соја, одговорни и за детектоване разлике у периапикалним лезијама, у наставку истраживања методом проточне цитометрије испитали смо ћелијски састав и цитокински профил у периапикалним лезијама ова два соја пацова.

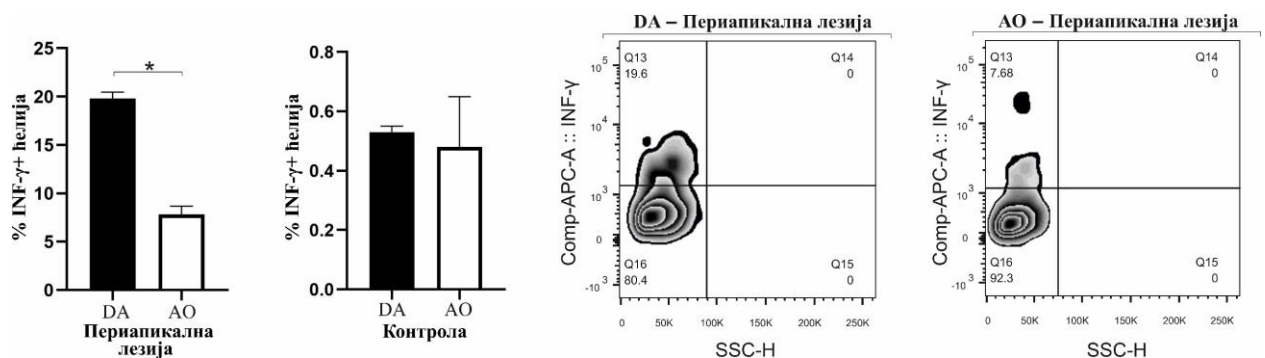
Анализом добијених података детектовали смо статистички значајно већу заступљеност CD3+ ћелија код DA пацова у поређењу са АО пацовима ($37,89 \pm 2,89$ vs $23,87 \pm 2,62$ % ћелија, $p < .05$; Слика 10.; Табела 6.).



Слика 10. Фенотипска анализа CD3+ ћелија у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Детектована је статистички значајна разлика између DA и АО пацова у заступљености CD3+ ћелија у периапикалним лезијама ($p < .05$). На десном панелу су фотографије репрезентативних dot plot-ова периапикалних лезија DA и АО пацова анализираних у *Flowing Software Version 2.5* програму. Није показана статистички значајна разлика у проценту CD3+ ћелија у здравом периодонталном ткиву ($p > .05$). Проточна цитометрија. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.

*Значајна разлика ($p < .05$)

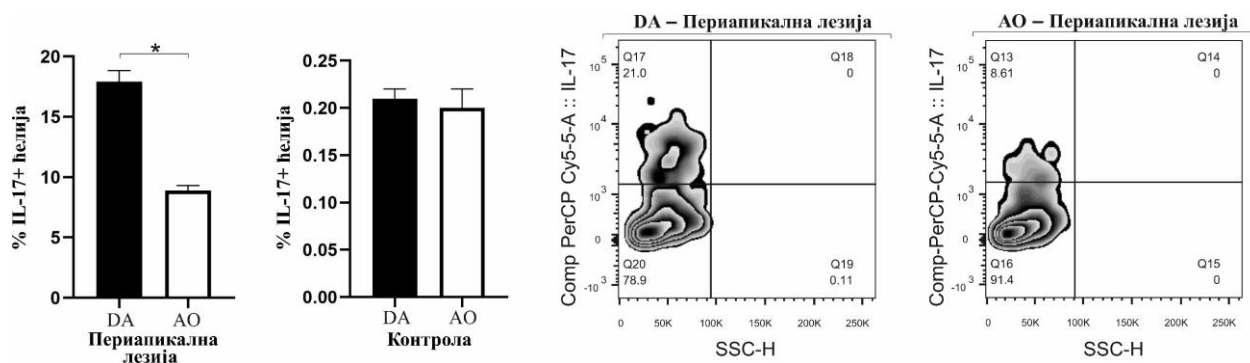
Испитивањем цитокинског профила двоструко позитивних ћелија детектовали смо значајно већу заступљеност CD3+CD4+ ћелија које продукују INF- γ у периапикалним лезијама DA и АО пацова у поређењу са здравим контролама ($19,80 \pm 0,67$ vs $0,53 \pm 0,02$ % ћелија и $7,82 \pm 0,86$ vs $0,48 \pm 0,17$ % ћелија, $p < .05$, редом). Није показна статистички значајна разлика између здравих контрола DA и АО пацова ($p > .05$). Заступљеност INF- γ продукујућих CD3+CD4+ ћелија био је значајно већи у периапикалним лезијама DA у поређењу са АО пацовима ($19,80 \pm 0,67$ vs $7,82 \pm 0,86$ % ћелија $p < .05$; **Слика 11.**; **Табела 5.**).



Слика 11. Фенотипска анализа CD3+CD4+INF- γ + ћелија у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Показана је статистички значајна разлика између DA и АО пацова у проценту CD3+CD4+INF- γ + ћелија у периапикалним лезијама ($p < .05$). На десном панелу су фотографије репрезентативних dot plot-ова периапикалних лезија DA и АО пацова анализираних у *Flowing Software Version 2.5* програму. Није показана статистички значајна разлика у заступљености CD3+CD4+INF- γ + ћелија у здравом периодонталном ткиву ($p > .05$). Анализа проточном цитометријом. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.

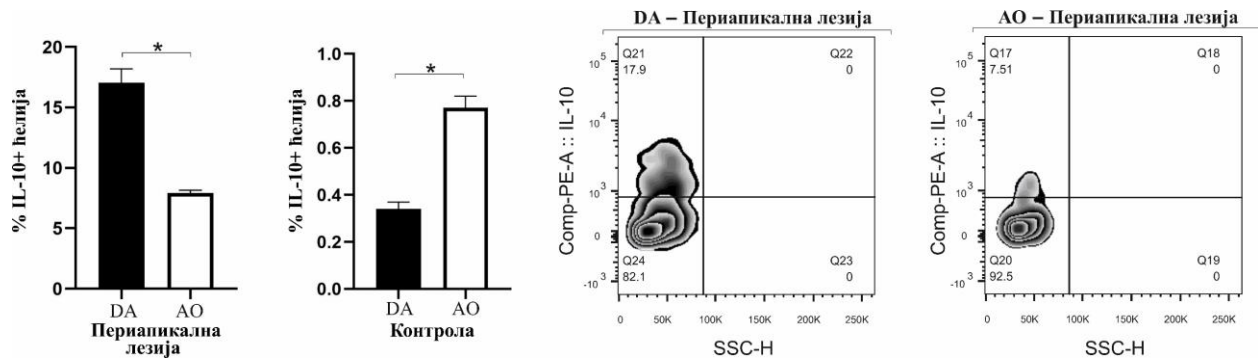
*Значајна разлика ($p < .05$)

Након детектоване разлике у продукцији Th1 цитокина, у наставку истраживања анализирали смо заступљеност двоструко позитивних CD3+CD4+ ћелија које продукују IL-17. Утврђена је статистички значајна разлика у заступљености CD3+CD4+IL-17+ ћелија између периапикалних лезија и здравих контрола у оба соја пацова (17,90±0,93 vs 0,21±0,01% ћелија и 8,89±0,41 vs 0,2±0,02% ћелија, $p < .05$, редом). Није детектована статистички значајна разлика између здравих контрола DA и АО пацова ($p > .05$). Међутим, детектована је статистички значајно већа заступљеност CD3+CD4+IL-17+ ћелија у периапикалним лезијама DA пацова у поређењу са АО пацовима (17,90± 0,93 vs 8,89 ± 0,41% ћелија; **Слика 12.**; **Табела 5.**).



Слика 12. Фенотипска анализа CD3+CD4+IL-17+ ћелија у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Показана је статистички значајна разлика између DA и АО пацова у проценту CD3+CD4+IL-17+ ћелија у периапикалним лезијама ($p < .05$). На десном панелу су фотографije репрезентативних dot plot-ова периапикалних лезија DA и АО пацова анализираних у *Flowing Software Version 2.5* програму. Није показана статистички значајна разлика у проценту CD3+CD4+IL-17+ ћелија у здравом периодонталном ткиву ($p > .05$). Анализа проточном цитометријом. Вредности су приказане као средња вредност, ± SE (*Independent Samples T*- тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Показано је да прекомерна продукција проинфламаторних цитокина последично индукује секрецију антиинфламаторних и имуносупресивних цитокина, што представља биолошки одговор ткива у циљу ограничавања инфламације. У том циљу у наставку истраживања испитивали смо да ли постоји разлика у заступљености CD3+CD4+IL-10+ ћелија у периапикалних лезија DA и АО пацова. Као прво, детектована је статистички значајна разлика у проценту CD3+CD4+IL-10+ ћелија између DA и АО пацова периапикалним лезијама и њихових здравих контрола (17,05 ± 1,14 vs 0,34±0,07 и 7,92 ± 0,23 vs 0,77 ± 0,13% ћелија, редом, $p < .05$). Затим, није детектована статистички значајна разлика између здравих контрола DA и АО пацова ($p > .05$). Међутим, заступљеност CD3+CD4+ ћелија које продукују IL-10 је био статистички значајно већи код DA пацова у поређењу са АО пацовима са периапикалним лезијама (17,05 ± 1,14 vs 7,92 ± 0,23 % ћелија, $p < .05$; **Слика 13.**; **Табела 5.**).

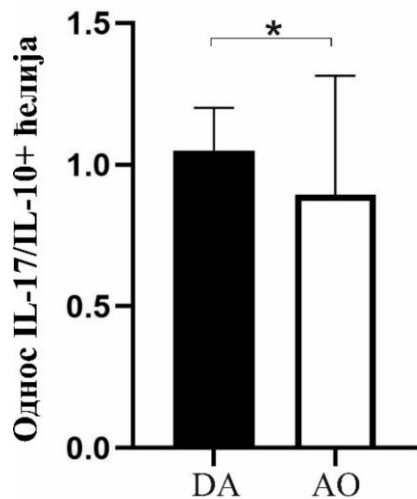


Слика 13. Фенотипска анализа CD3+CD4+IL-10+ ћелија у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Показана је статистички значајна разлика између DA и АО пацова у проценту CD3+CD4+IL-10+ ћелија у периапикалним лезијама ($p < .05$). На десном панелу су фотографије репрезентативних dot plot-ова периапикалних лезија DA и АО пацова анализираних у *Flowing Software Version 2.5* програму. Постоји статистички значајна разлика у проценту CD3+CD4+IL-10+ ћелија у здравом периодонталном ткиву између DA и АО пацова ($p < .05$). Анализа проточном цитометријом. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*- тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Табела 6. Th1/Th17 и T_{regs} ћелије у периапикалним лезијама

	CD3+ (% ћелија)		INF- γ + (% ћелија)		IL-17+ (% ћелија)		IL-10+ (% ћелија)	
	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p
DA – периапикална лезија	37,89 \pm 2,89	* $<$.05	19,80 \pm 0,67	* $<$.05	17,90 \pm 0,93	* $<$.05	17,05 \pm 1,14	* $<$.05
АО – периапикална лезија	23,87 \pm 2,62		7,82 \pm 0,86		8,89 \pm 0,41		7,92 \pm 0,23	
DA – контрола	17,10 \pm 0,60	$>$.05	0,53 \pm 0,02	$>$.05	0,21 \pm 0,01	$>$.05	0,34 \pm 0,07	$<$.05
АО – контрола	12,60 \pm 0,40		0,48 \pm 0,17		0,20 \pm 0,02		0,77 \pm 0,13	

Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*- тест). *Значајна разлика ($p < .05$)



Узевши заједно добијене податке о продукцији проинфламаторних и имуносупресивних цитокина, може се рећи да је у периапикалним лезијама DA пацова повећана заступљеност оба типа цитокина. Објашњење за то може бити да T ћелије могу производити више IL-10 као одговор на прекомерну продукцију проинфламаторног цитокина IL-17 (176). Због тога смо одредили однос ова два цитокина код оба соја пацова, како бисмо установили да ли повећана продукција IL-10 прати прекомерну продукцију IL-17.

Анализом односа детектовали смо статистички значајно већи IL-17/IL-10 однос у периапикалним лезијама DA у поређењу са AO пацовима ($1,05 \pm 0,37$ vs $0,894 \pm 0,1$, $p < .05$; **Слика 14.**)

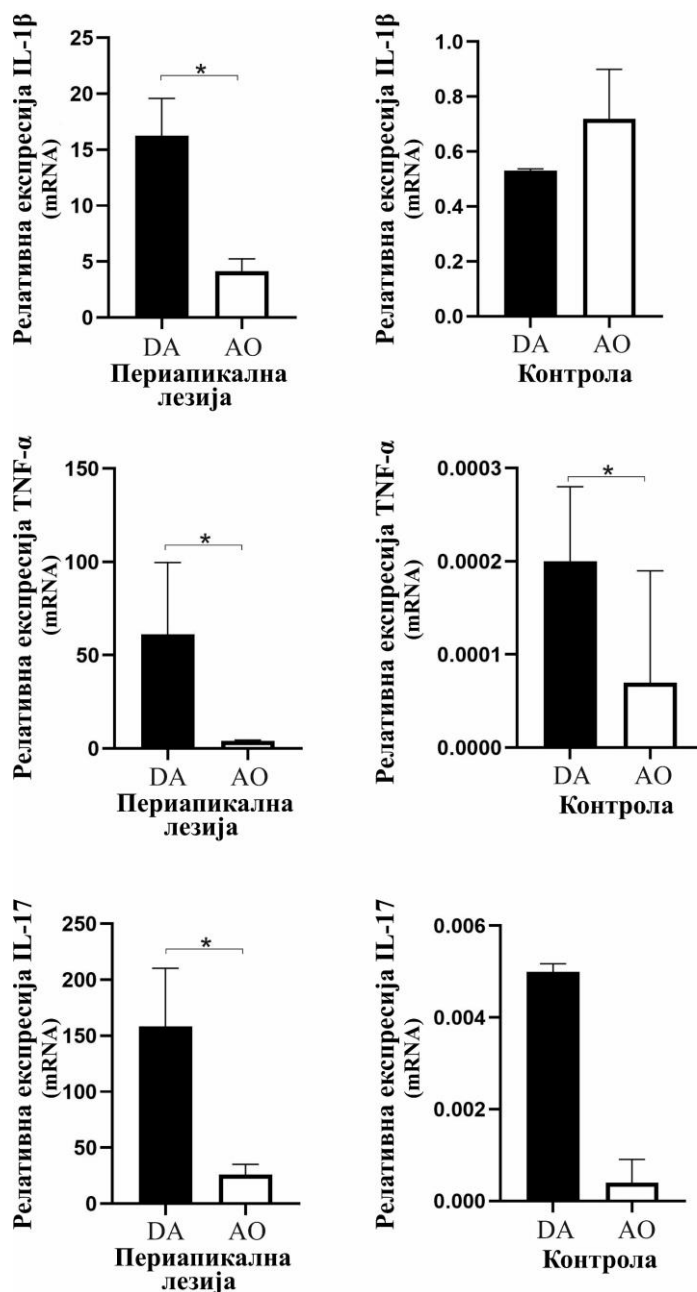
Слика 14. Однос IL-17/IL-10 ћелија у периапикалним лезијама DA и AO пацова. Детектована је статистички значајна разлика између DA и AO пацова односа IL-17/IL-10 ћелија у периапикалним лезијама ($p < .05$). Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.

*Значајна разлика ($p < .05$)

4.5. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА КОЈИ УЧЕСТВУЈУ У РАЗВОЈУ И ВЕЛИЧИНИ ПЕРИАПИКАЛНИХ ЛЕЗИЈА И РЕСОРПЦИЈИ АЛВЕОЛАРНЕ КОСТИ

Претходним анализама показано је постоји разлика у величини, ћелијском саставу и продукцији цитокина код ова два соја пацова којима је индукована периапикална лезија. Осетљивост на развој периапикалних лезија није у потпуности разјашњена (1), али показана је повезаност између полиморфизама гена за IL-1 α и IL-1 β и повећања ризика за развој већих периапикалних лезија (125). Присуство специфичних генетских маркера се доводи у везу са повећаном продукцијом одређених цитокина (128). Због тога смо у наставку истраживања, методом qRT-PCR-а анализирали да ли је експресија специфичних гена који кодирају инфламаторне молекуле утицала на развој периапикалних лезија и претходно детектоване разлике истих код ова два соја пацова.

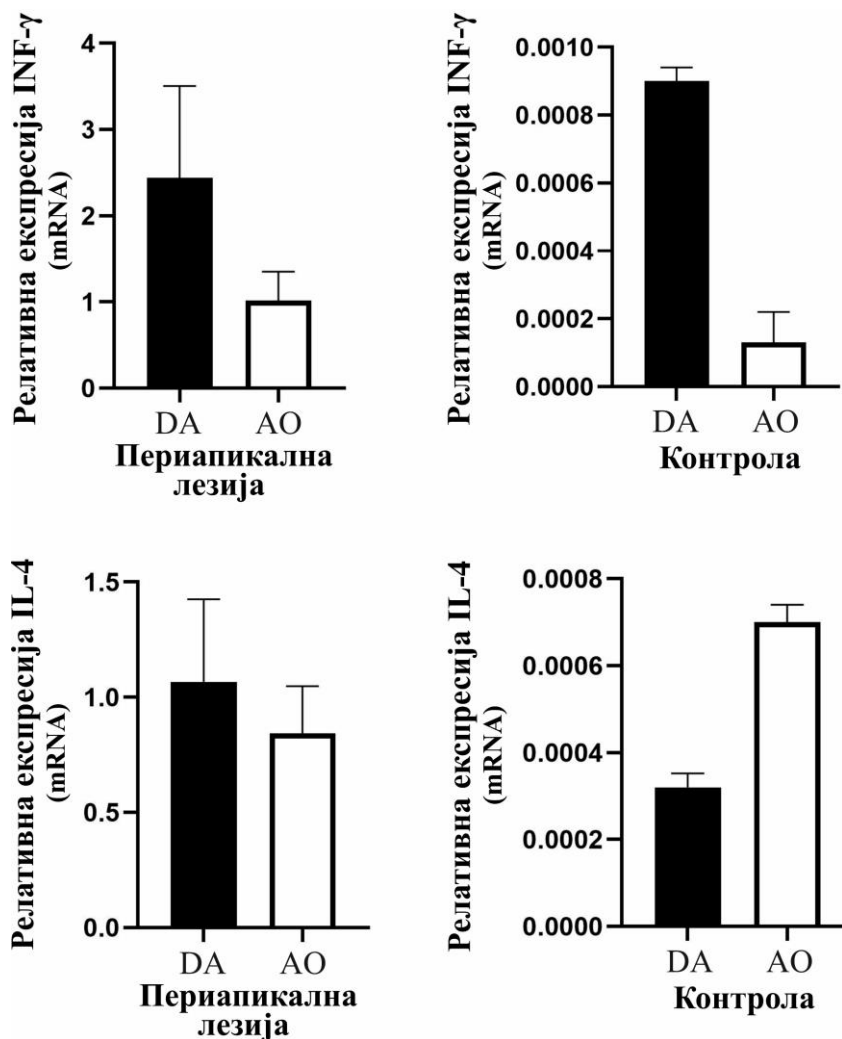
Детектована је статистички значајно већа експресија гена за IL-1 β , TNF- α и IL-17 у периапикалним лезијама DA у поређењу са AO пацовима, рачунато као $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (IL-1 β $16,23 \pm 3,36$ vs $4,15 \pm 1,08$, TNF- α $61,18 \pm 38,51$ vs $4,02 \pm 0,51$ и IL-17 $158,49 \pm 51,91$ vs $25,98 \pm 9,1$, сви $p < .05$; **Слика 15.**). Нису детектоване значајне разлике између здравих контрола DA и AO пацова у експресији гена за IL-1 β и IL-17 ($p > .05$), док постоји статистички значајна разлика у експресији гена за TNF- α између испитиваних група ($p < .05$) (**Табела 7.**)



Слика 15. Експресија гена за IL-1 β , TNF- α и IL-17 у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и AO пацова. Детектована је статистички значајна разлика у експресији гена за IL-1 β , TNF- α и IL-17 између DA и AO пацова у периапикалним лезијама ($p < .05$). Постоји статистички значајна разлика у експресији гена за TNF- α у здравом периодонталном ткиву између DA и AO пацова ($p < .05$). Није показана статистички значајна разлика у експресији гена за IL-1 β и IL-17 у здравом периодонталном ткиву ($p > .05$). Анализа qRT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Нису детектоване значајне разлике у експресији гена за IL-4 и INF- γ између узорка периапикалних лезија DA и AO пацова, рачунато као $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (IL-4 $1,06 \pm 0,35$ vs $0,84 \pm 0,20$ и INF- γ $2,43 \pm 1,06$ vs $1,01 \pm 0,33$, све $p > .05$). Експресија гена за IL-4 је била статистички

значајно већа код здравих контрола АО у поређењу са DA пацовима ($p < .05$), за разлику од експресије гена за $INF-\gamma$ код где није детектована значајна разлика између свих испитиваних група ($p > .05$) (Слика 16.) (Табела 7.).



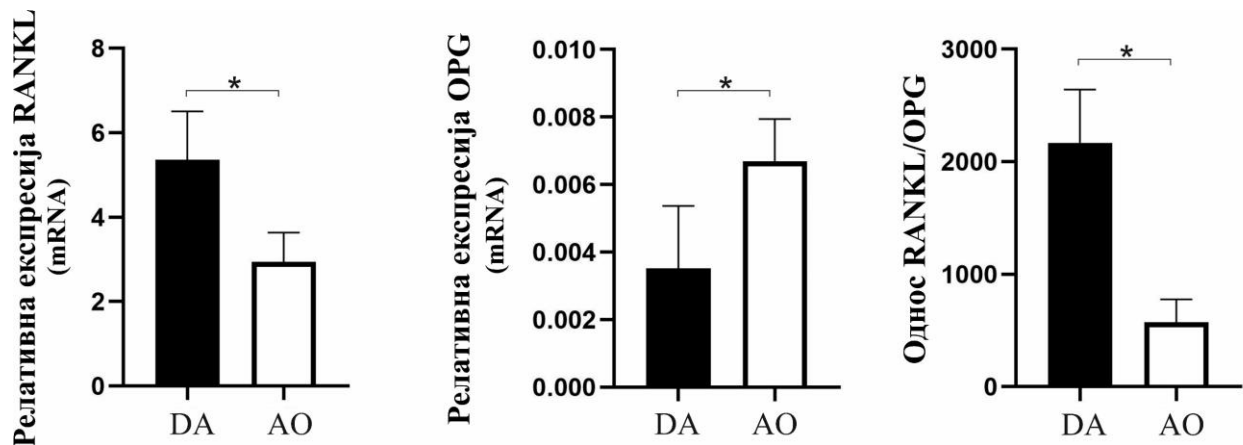
Слика 16. Експресија гена за IL-4 и $INF-\gamma$ у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Није детектована статистички значајна разлика у експресији гена за IL-4 и $INF-\gamma$ између DA и АО пацова у периапикалним лезијама ($p > .05$). Такође, није детектована статистички значајна разлика у експресији гена у здравом периодонталном ткиву ($p > .05$). Анализа qRT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Табела 7. Анализа експресије гена који учествују у развоју и величини периапикалних лезија (qRT-PCR)

	IL-1 β (mRNA)		TNF- α (mRNA)		IL-17 (mRNA)		IL-4 (mRNA)		INF- γ (mRNA)	
	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p	средња вредност \pm SE	p
DA – периапикална лезија	16,23 \pm 3,36	* $<$.05	61,1 \pm 38,51	* $<$.05	158,49 \pm 51,9 1	* $<$.05	1,06 \pm 0,35	$>$.05	2,43 \pm 1,06	$>$.05
АО – периапикална лезија	4,15 \pm 1,08		4,02 \pm 0,51		25,98 \pm 9,1		0,84 \pm 0,20		1,01 \pm 0,33	
DA – контрола	0,53 \pm 0,01	$>$.05	0,0007 \pm 0,00 008	* $<$.05	0,005 \pm 0,000 17	$>$.05	0,00032 \pm 0,0 0003	$>$.05	0,009 \pm 0,0 004	$>$.05
АО – контрола	0,73 \pm 0,05		0,00007 \pm 0,0 00012		0,0004 \pm 0,00 05		0,000 \pm 0,13		0,00013 \pm 0 ,00009	

Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). *Значајна разлика ($p < .05$)

Обзиром да смо детектовали значајно већу експресију гена за TNF- α и IL-1 β у периапикалним лезијама DA пацова, а имајући у виду да резултати претходних студија показују њихову значајну улогу у ресорпцији околне кости, у наставку истраживања испитивали смо да ли постоји корелација између маркера за ресорпцију кости (RANKL и OPG) и проинфламаторних цитокина. Детектована је статистички значајно већа експресија гена за RANKL-а у периапикалним лезијама DA у поређењу са АО пацовима ($5,35 \pm 1,15$ vs $2,94 \pm 1,70$, $p < .05$). Осим тога, у периапикалним лезијама DA пацова детектована је значајно нижа експресија гена за OPG у поређењу са периапикалним лезијама АО пацова ($0,004 \pm 0,001$ vs $0,007 \pm 0,001$, $p < .05$; **Слика 17.**). За процену ресорпцију кости неопходно је одредити однос ова два маркера, стога смо у наставку истраживања одредили однос ова два маркера код DA и АО пацова. Анализом овог односа израчунат је значајно већи RANKL/OPG однос у периапикалним лезијама DA пацова у поређењу са периапикалним лезијама АО пацовима ($2169,06 \pm 472,87$ vs $571,19 \pm 205,72$, $p < .05$; **Слика 17.**).

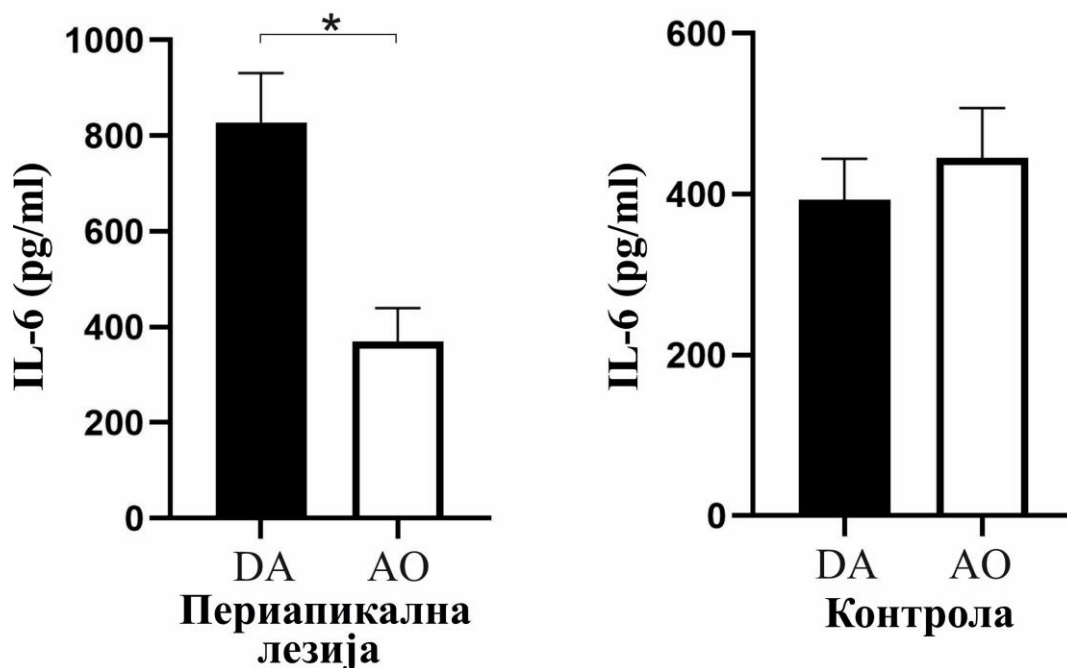


Слика 17. Експресија гена за RANKL и OPG и њихов однос у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву (контрола) DA и АО пацова. Детектована је статистички значајна разлика у експресији гена за RANKL и OPG између DA и АО пацова у периапикалним лезијама ($p < .05$). Такође, показана је и статистички значајна разлика у односу експресије гена за RANKL и OPG у периапикалним лезијама ($p < .05$). Анализа qRT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.

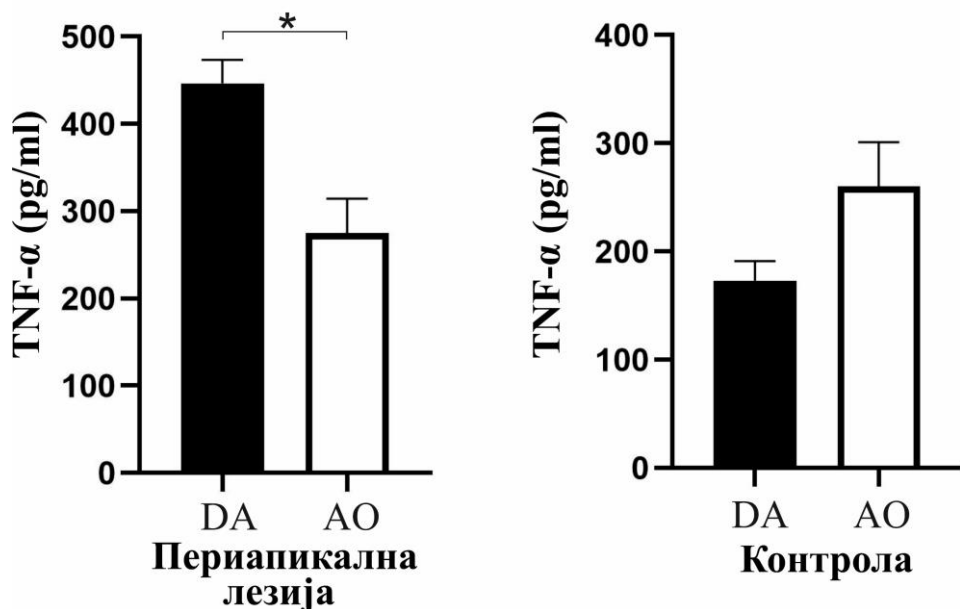
*Значајна разлика ($p < .05$)

4.6. КВАНТИФИКАЦИЈА СЕРУМСКИХ НИВОА ПРОИНФЛАМАТОРНИХ IL-6 И TNF- α ЦИТОКИНА

За разлику од TNF- α који има проинфламаторну улогу, IL-6 може бити проинфламаторни и антиинфламаторни цитокин (68,76). Претходним анализама смо показали да се локални ниво ових цитокина у периапикалним лезијама разликују између DA и АО пацова. У складу са тим одлучили смо да испитамо да ли разлике у сојевима утичу и на системску производњу проинфламаторних цитокина, код пацова са периапикалним лезијама. Нивои TNF- α и IL-6 били су значајно већи у DA у поређењу са АО пацовима ($446,33 \pm 27,45$ vs $275,05 \pm 39,15$ pg/ml и $828,27 \pm 102,69$ vs $369,75 \pm 69,95$ pg/ml, $p < .05$, редом; **Слика 18.** и **19.**). Није детектована статистички значајна разлика између здравих контрола у системској производњи TNF- α и IL-6 код DA и АО пацова ($173,2 \pm 18$ vs $260,1 \pm 41$ pg/ml и $393,1 \pm 51,61$ vs $445,3 \pm 62,01$ pg/ml, $p > .05$, редом; **Слика 17.** и **18.**).



Слика 18. Серумске концентрације цитокина IL-6 код DA и АО пацова. Детектована је статистички значајна разлика у концентрацији цитокина IL-6 у серуму код DA и АО пацова са периапикалним лезијама ($p < .05$). Није детектована статистички значајна разлика у концентрацији цитокина IL-6 у серуму код пацова којима није индукована периапикална лезија (контрола) ($p > .05$). *ELISA assay*. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)



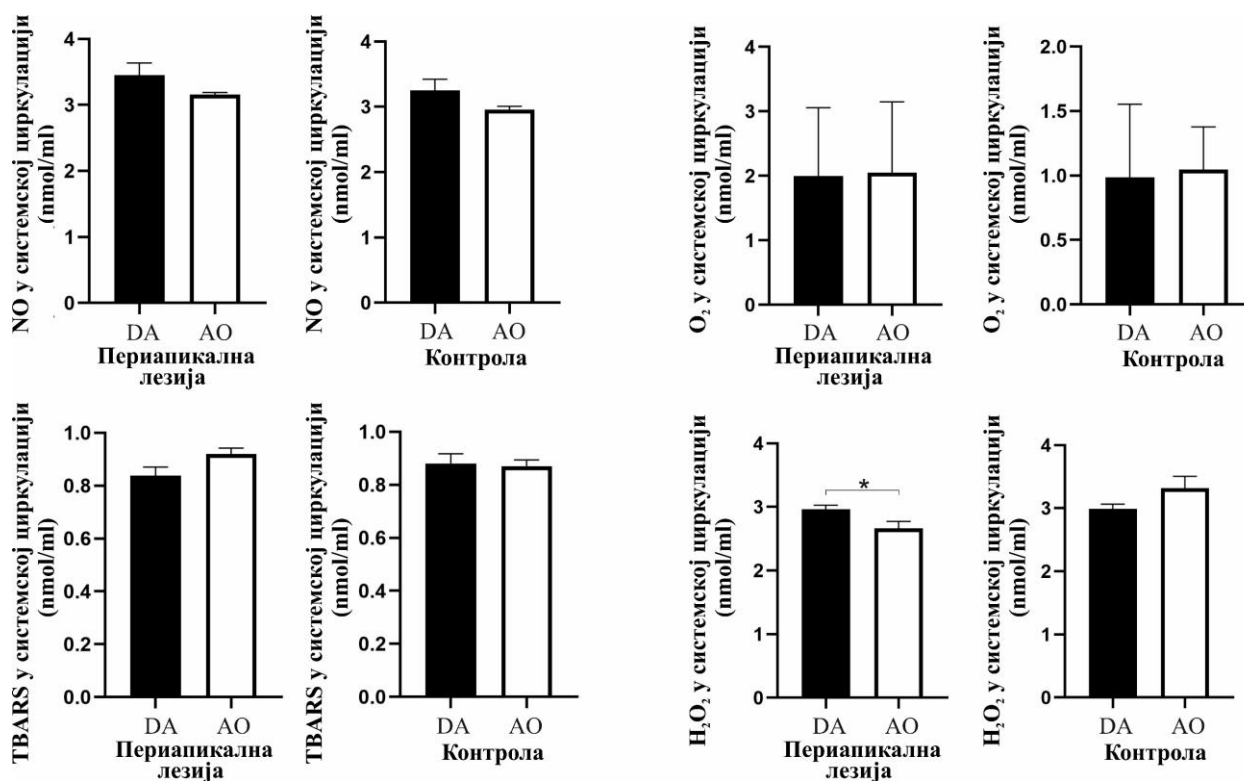
Слика 19. Серумске концентрације цитокина TNF- α код DA и АО пацова. Показана је статистички значајна разлика у концентрацији цитокина TNF- α у серуму код DA и АО пацова са периапикалним лезијама ($p < .05$). Није показана статистички значајна разлика у концентрацији цитокина TNF- α у серуму код пацова којима није индукована периапикална лезија (контрола) ($p > .05$). *ELISA assay*. Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

4.7. ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ И ПЕРИАПИКАЛНИМ ЛЕЗИЈАМА ДА И АО ПАЦОВА

4.7.1. Системски нивои параметара оксидативног стреса

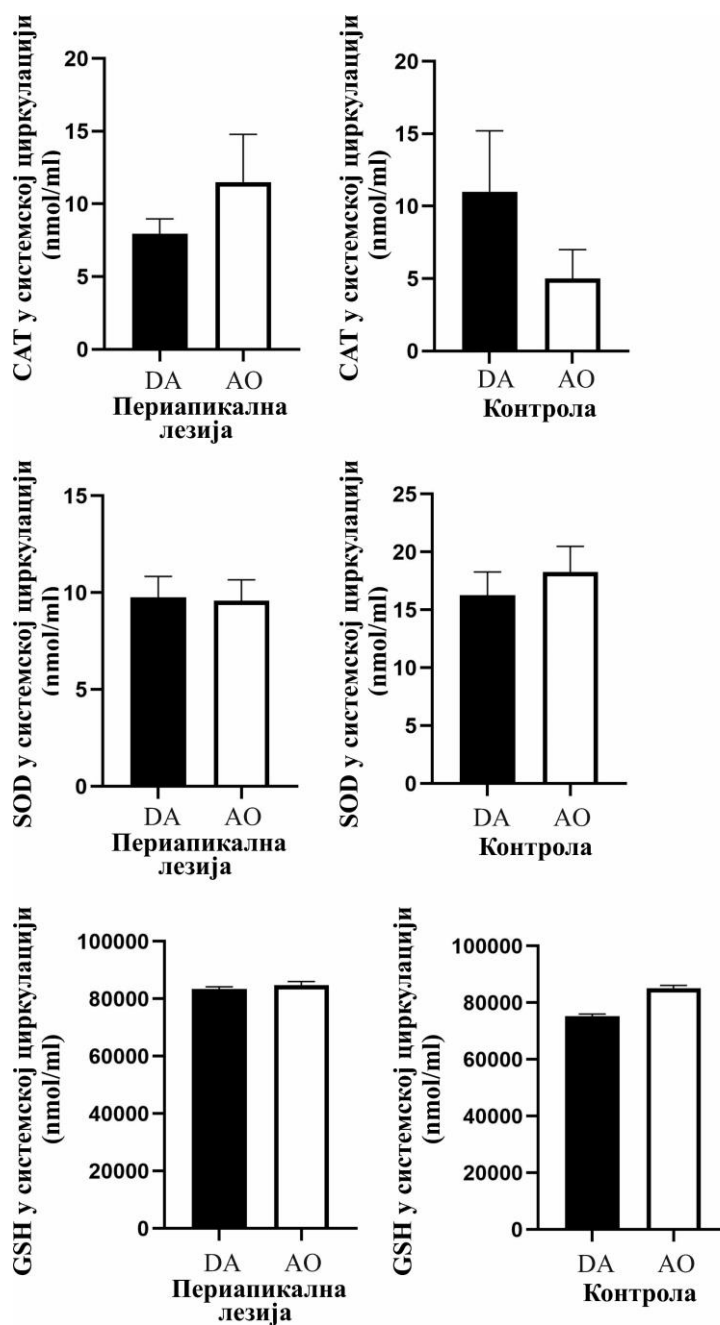
Оксидативни стрес може директно имати утицај у деструкцији периапикалног ткива или индиректно активацијом NF- κ B који повећава продукцију проинфламаторних цитокина (117). Генерално, инфламација узрокује повећање оксидативног стреса, како на ћелијском тако и на системском нивоу. Оксидативни стрес може бити повезан са ресорпцијом алвеоларне кости која се дешава у инфламаторној каскади периапикалних лезија, чиме се повећава инфилтрација имунских ћелија. Недостатак или присуство маркера оксидативног може бити знак тренутног стања периапикалне лезије код људи (акутна или хронична периапикална лезија) (177). Међутим, до сада није показано да ли сојне разлике могу утицати на параметре оксидативног стреса код периапикалних лезија.

Из горе наведених сазнања и резултата претходних студија, у наставку истраживања одређиван је ниво прооксидативних и антиоксидативних маркера у периапикалним ткивима и системској циркулацији. У системској циркулацији ниво прооксидативних маркера (NO, TBARS, O₂, H₂O₂) је одређиван у узорцима плазме. Детектована је статистички значајна разлика у нивоу H₂O₂ у системској циркулацији, виши ниво је измерен код ДА пацова са периапикалним лезијама у поређењу са АО пацовима (2,96 ± 0,07 vs 2,61 ± 0,12 nmol/ml, p<.05; **Слика 20.**). Међутим, значајно већи ниво NO у системској циркулацији пронађен је у АО пацовима са периапикалним лезијама у поређењу са здравом контролом (3,16 ± 0,31 vs 2,96 ± 0,13 nmol/ml, p<.05), док код ДА пацова није било значајних разлика између експерименталних и контролних група (3,23 ± 0,19 vs 3,26 ± 0,11 nmol/ml, p>.05.). У системској циркулацији није забележена статистички значајна разлика у нивоима TBARS и O₂ између ова два соја пацова (p>.05) (**Слика 20.**) (**Табела 8.**).



Слика 20. Нивои прооксидативних маркера (NO, TBARS, O₂, H₂O₂) у узорцима плазме DA и AO пацова. Детектована је статистички значајна разлика H₂O₂ у серуму код DA и AO пацова са периапикалним лезијама ($p < .05$). Није детектована статистички значајна разлика у NO, TBARS, O₂ у плазми код DA и AO пацова са периапикалним лезијама ($p > .05$). Није показана статистички значајна разлика у концентрацији NO, TBARS, O₂, H₂O₂ у плазми код пацова којима није индукована периапикална лезија (контрола) ($p > .05$). Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Системски нивои антиоксидативних маркера (CAT, SOD, GSH) су мерени у лизату еритроцита. У системској циркулацији није било значајних разлика у нивоима CAT, SOD, GSH између DA и AO пацова са периапикалним лезијама (Табела 8.), као ни код здравих контрола ($p > .05$) (Слика 21.).



Слика 21. Нивои антиоксидативних маркера (CAT, SOD, GSH) у лизату еритроцита DA и AO пацова. Није детектована статистички значајна разлика у CAT, SOD, GSH у лизату еритроцита код DA и AO пацова са периапикалним лезијама ($p > .05$). Није детектована статистички значајна разлика у нивоу CAT, SOD, GSH у лизату еритроцита код пацова којима није индукована периапикална лезија (контрола) ($p > .05$). Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.
*Значајна разлика ($p < .05$)

Табела 8. Ниво прооксидативних и антиоксидативних маркера у системској циркулацији

	DA – периапикална лезија	АО – периапикална лезија	p
	средња вредност ± SE	средња вредност ± SE	
NO (nmol/ml)	3,41 ± 0,18	3,156 ± 0,03	>.05
TBARS (nmol/ml)	0,84 ± 0,03	0,91 ± 0,02	>.05
O₂ (nmol/ml)	1,99 ± 1,06	2,04 ± 1,34	>.05
H₂O₂ (nmol/ml)	2,96 ± 0,07	2,66 ± 0,11	*<.05
CAT (nmol/ml)	7,95 ± 1,02	11,51 ± 3,28	>.05
SOD (nmol/ml)	9,77 ± 1,11	9,61 ± 1,0	>.05
GSH (nmol/ml)	83393,24 ± 846	84824,56 ± 1223	>.05

Вредности су приказане као средња вредност, ± SE (*Independent Samples T*- тест). *Значајна разлика (p<.05)

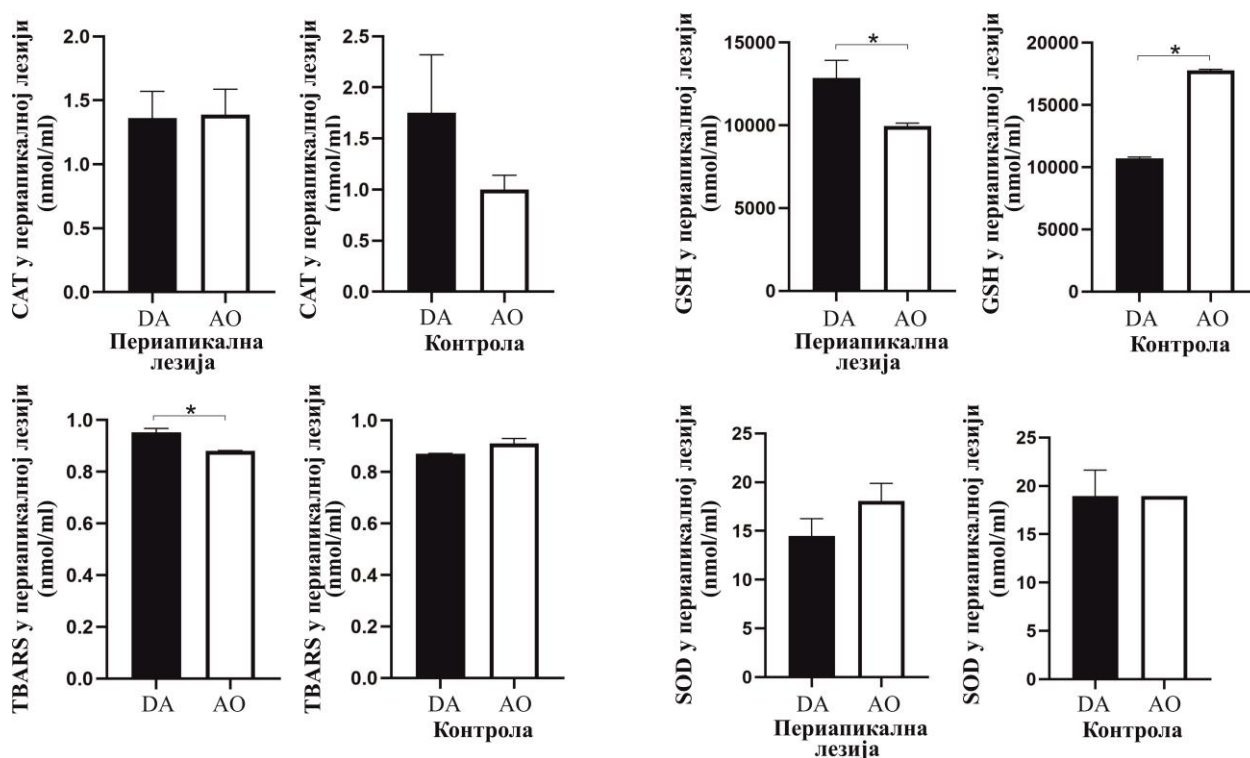
4.7.2. Нивои параметара оксидативног стреса у периапикалним лезијама

Значајно нижи ниво GSH-а детектована је у периапикалним ткивима здравих контролних DA пацова у поређењу са АО пацовима (10706,33 ± 0,001 vs 17763,86 ± 0,001 nmol/ml, p<.05; **Слика 22.**; **Табела 9.**). Такође, значајне разлике између периапикалних лезија и здравих контрола детектоване су и код DA и АО пацова (12850,70 ± 1061,96 vs 10706,33 ± 0,001 nmol/ml, и 9938,16 ± 199,11 vs 17763,86 ± 0,001 nmol/ml, p<.05, редом; **Слика 22.**; **Табела 9.**). Ниво GSH је био значајно већи код периапикалних лезија DA у поређењу са АО пацовима (12850,70 ± 1061,96 vs 9938,16 ± 199,11 nmol/ml, p<.05). Такође, ниво TBARS у периапикалним лезијама био је значајно већи у DA у поређењу са АО пацовима (0,95 ± 0,02 vs 0,90 ± 0,002 nmol/ml, p<.05). Статистички значајна разлика није детектована у нивоу TBARS у супернатанту здравог периапикалног ткива DA и АО пацова (p>.05). Измерен ниво TBARS код DA пацова је био значајно већи у периапикалној лезији него у здравом периапикалном ткиву (0,95 ± 0,02 vs 0,88 ± 0,01 nmol/ml, p<.05; **Слика 22.**; **Табела 9.**).

Табела 9. Ниво прооксидативних и антиоксидативних маркера у супернатанту периапикалних лезија

	DA – периапикална лезија	АО – периапикална лезија	p
	средња вредност ± SE	средња вредност ± SE	
TBARS (nmol/ml)	0,95 ± 0,02	0,90 ± 0,002	*<.05
CAT (nmol/ml)	1.36 ± 0.21	11,38 ± 0,20	>.05
SOD (nmol/ml)	14,47 ± 1,80	18,08 ± 1,81	>.05
GSH (nmol/ml)	12850,70 ± 1061,96	9938,16 ± 199,11	*<.05

Вредности су приказане као средња вредност, ± SE (*Independent Samples T*- тест). *Значајна разлика (p<.05)



Слика 22. Маркери оксидативног стреса (CAT, GSH, TBARS, SOD) у супернатанту периапикалних лезија и здравом периодонталном лигаменту DA и AO пацова. Детектована је статистички значајна разлика у вредности GSH-а и TBARS-а у супернатанту периапикалних лезија DA и AO пацова ($p < .05$). Детектована је статистички значајна разлика у вредности GSH-а у супернатанту здравог периодонталног лигамента (контрола) DA и AO пацова ($p < .05$). Није детектована статистички значајна разлика CAT-а и SOD-а у супернатанту периапикалних лезија DA и AO пацова ($p > .05$). Није детектована статистички значајна разлика CAT-а, SOD-а и TBARS-а у супернатанту у здравом периодонталног лигамента (контрола) ($p > .05$). Вредности су приказане као средња вредност, \pm SE (*Independent Samples T*-тест). $n = 9-10$ животиња по групи.

*Значајна разлика ($p < .05$)



ДИСКУСИЈА

COUNTRY STATE UK 1234

5. ДИСКУСИЈА

У овом истраживању први пут су поређене карактеристике имунских одговора у периапикалним лезијама два генетски високородна соја пацова. Резултати нашег истраживања јасно показују постојање корелације између генетски условљене различитости имунског одговора и патогенезе периапикалних лезија DA и AO пацова. Бројним претходним студијама је покушано да се разјасни како се одвија прогресија или регресија периапикалних инфламаторних процеса (45,178,179). Бољим разумевањем комплексне патогенезе периапикалних лезија и фактора који утичу на погоршање болести може се утицати на правилан одабир терапије. Познато је да периапикалне лезије могу бити стабилне, смањити се или се повећати током времена, на шта може утицати варијабилност фенотипа инфилтришућих ћелија и имунског одговора домаћина (112).

5.1. Разлике у величини периапикалних лезија и саставу ћелијског инфилтрата

Периапикалне лезије су инфламаторна, остеолитичка стања која захватају периапикална ткива (апикални форамен и латералне излазе канала корена, апикални део корена зуба, периодонтална влакна и алвеоларну кост). Током развоја, периапикалне лезије пролазе кроз процес инфламације који може бити покренут микроорганизмима или неки другим агенсима из канала корена зуба, што за крајњу последицу има ресорпцију алвеоларне кости (180). Обзиром да се периапикалне лезије налазе у алвеоларној кости, настале ресорпцијом исте, присуство и величину периапикалне лезије можемо најбрже и најједноставније одредити радиографским снимком.

У нашем истраживању смо показали да DA пацови развијају веће периапикалне лезије од AO пацова (**Слика 3.; Табела 4.**). До сада у нама доступној литератури величина лезије на радиографским снимцима је мерена и упоређивана само током развоја периапикалног инфламаторног процеса, а не између различитих индивидуа или експерименталних сојева глодара (11,165,168). Радиографским снимцима је проверавана величина лезије, у циљу да се утврди стабилност лезије (да ли се повећава током времена, смањује или је стабилна) приликом примене неке терапије (147,165,181). Анализом радиографских снимака, поред величине лезије добијамо и податак о броју пиксела. Смањење броја пиксела нам показује да постоји ресорпција кости у одређеном анализираном региону (168). Резултати наше студије показују да се број пиксела у периапикалним лезијама не разликује између ова два соја пацова (**Слика 4.; Табела 4.**). Овај резултат можемо објаснити чињеницом да ова радиографска метода представља дводимензионални приказ тродимензионалних ткива и да не може верно приказати стање у алвеоларној кости. Иако је радиографски детектована значајно већа лезија у DA пацовима, овом методом нисмо успели да покажемо, да уочене разлике постоје и у степену деструкције алвеоларне кости. Због тога смо у наставку истраживања извели патохистолошку анализу периапикалних лезија као златни стандард у детекцији деструктивних процес у ткиву (165,168).

Патохистолошком анализом је потврђен радиографски налаз да су периапикалне лезије код DA пацова веће него код AO пацова (**Слика 5.**). Као и претходне радиографске налазе и H&E пресеке смо анализирали у *Image 1.53* програму, како бисмо дескриптиван налаз величине периапикалних лезија потврдили и морфометријским анализама. Медијана величине периапикалних лезија DA пацова је статистички значајно већа у поређењу са AO пацовима (**Табела 5.**). На H&E пресецима DA пацова је уочен већи ћелијски инфилтрат и интензивнија ресорпција алвеоларне кости (**Слика 5.**). Анализом ћелијског инфилтрата периапикалних лезија уочено је присуство великог броја неутрофила. Број неутрофила је очекивано био већи код DA пацова, обзиром да је

присутна већа инфламација и деструкција ткива него код АО пацова (**Слика 5. и 7.; Табела 5.**). У инфламацији периапикалног ткива, неутрофили представљају прву линију одбране. Ефикасна фагоцитоза у већини случајева зауставља ширења инфекције даље у околна ткива (14). Улога неутрофила поред фагоцитозе је и продукција проинфламаторних цитокина (IL-1, IL-6 TNF- α) и RANKL-а који активирају остеокласте (18), и чија је продукција повећана у периапикалним лезијама DA пацова (**Слика 15. и 17.**). Број неутрофила у периапикалним лезијама је у складу са повећаном продукцијом проинфламаторног цитокина IL-17 код DA пацова. Резултати наше студије су у складу са резултатима истраживања у коме је показано постојање позитивне корелације између симптоматске периапикалне лезије (велика поља инфламације и деструкција ткива) и повећаног броја неутрофила као и изражене продукције IL-17 (182). Последица повећања броја неутрофила огледа се у повећаној деструкцији ткива, зато што се изумирањем неутрофила ослобађају протеолитички ензими који додатно повећавају деструкцију околног ткива (18).

Поред неутрофила, макрофаги су врло заступљене ћелије у инфламацији периапикалног ткива, али њихова инфилтрација на место запаљења је спорија од неутрофила (39). Активацијом макрофага у периапикалним лезијама имамо две линије фагоцитних ћелија: неутрофили који се налазе близу врха корена зуба и макрофаги који се налазе на спољашњој страни лезије (183). Имунохистохемијском анализом CD68+ ћелија (макрофага) детектован је већи број ових ћелија код DA у поређењу са АО пацовима. Обзиром да су DA пацови развили веће периапикалне лезије у односу на АО пацове (**Слика 3. и 5.**), можемо претпоставити да и макрофаги имају улогу у патогенези периапикалних лезија. Макрофаги су главни извор проинфламаторних цитокина: IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , али и простагландина, колагеназа и еластаза. Неки од ових продуката макрофага директно врше деструкцију ткива, док други цитокини активирају ћелије које имају улогу у ресорпцији кости и поларизацији Th ћелијског имунског одговора (174).

Обзиром да смо детектовали значајно већу заступљеност CD68+ ћелија, даљом имунохистохемијском анализом испитивали смо степен експресије CD3+ ћелија (Т лимфоцита) и тип имунског одговора. Статистички значајно више CD3+ ћелија детектовано у периапикалним лезијама DA у односу на АО пацове (**Слика 8. и 9.**). Да CD3+ лимфоцити и цитокини који они секретују, заиста значајно утичу на прогресију периапикалних лезија и ресорпцију алвеоларне кости показују и резултати претходних студија (184–187). Субпопулације Т ћелија (Th1, Th2, Th17, и T_{regs}) имају различите улоге у имунорегулацији, зависно од врсте ћелије њихове улоге могу бити од деструкције ткива до заштитне улоге у инфламацији. Неким правилом се сматра да су проинфламаторни медијатори одговорни за деструкцију ткива и прогресију инфламације, а антиинфламаторни медијатори заустављају и ограничавају прогресију болести (90).

5.2. Цитокини у периапикалним лезијама

Клинички исход периапикалних лезија у многеме зависи од поларизације имунског одговора. Цитокини Th1 имунског одговора (IFN- γ , TNF- α , IL-1 и IL-6) учествују у прогресији болести, инфламацији ткива и повећавању ресорпције алвеоларне кости. Док Th17 имунски одговор (IL-17) има улогу у акутизацији и егзацербацији периапикалних лезија. Супротно, Th2 цитокини (IL-4, IL-5, IL-10) имају антиинфламаторну и репараторну улогу у инфламираном периапикалном ткиву (39,182).

Ћелијски инфилтрат периапикалних лезија се формира на почетку инфламације у циљу да елиминише микроорганизме и спречи њихову дисеминацију и прогресију лезије. Начин на који имунске ћелије остварују ово дејство је продукцијом медијатора инфламације (162).

Стога смо у наставку истраживања испитивали да ли генетске разлике између ова два соја пацова утичу на поларизацију Th ћелијског имунског одговора. Анализом цитокиноског миљеа инфилтрата периапикалних лезија детектована је статистички значајно већа заступљеност CD3⁺ CD4⁺ INF- γ (Th1) продукујућих ћелија у DA у поређењу са АО пацовима (**Слика 11.**) (**Табела 6.**). INF- γ је кључни цитокин Th1 имунског одговора, главни активатор M1 макрофага и утиче на продукцији других цитокина и хемокина (82). Проинфламаторни ефекат INF- γ у периапикалним лезијама може бити директан или индиректан повећањем продукције TNF- α и IL-1 β , што збирно утиче на повећање остеокластогенезе у алвеоларној кости. Остеокластичан ефекат INF- γ се остварују не смо преко активације проинфламаторних T ћелија већ и путем хемотактичног ефекта на RANKL⁺ ћелије (91). Ове тврдње су у складу са резултатима наше студије, који показују да је повећана продукција INF- γ (**Слика 11.**; **Табела 6.**) у позитивној корелацији са већом ресорпцијом алвеоларне кости и последично већом периапикалном лезијом (**Слика 3. и 5.**; **Табела 4. и 5.**) у DA пацовима. У складу са тим, код АО пацова је мања продукција овог цитокина, као и величина периапикалне лезије (**Слика 3. и 5.**). Овај резултат добијен проточном цитометријом потврђен је и qRT-PCR где је детектована већа експресија гена за INF- γ у периапикалним лезијама DA у поређењу са АО пацовима (**Слика 16.**; **Табела 7.**). Супротно нашим и горе наведеним резултатима студија о улози INF- γ у остеокластогенези, показана је и његова улога у инхибицији исте. Показано је да INF- γ директно блокира формирање остеокласта, индукујући брзу деградацију RANK-а, што доводи до инхибиције RANKL-ом активираних NF- κ B (188). Такође, продукцијом O₂⁻ у остеокластима INF- γ узрокује апоптозу прогенитора остеокласта и инхибира њихову активност (189).

Међу првим цитокинима продукованим у периапикалном ткиву након колонизације микроорганизмима је и TNF- α (90,190). TNF- α има улогу у процесу миграције ћелија имунског одговора на место инфламације (75). У инфламраним периодонталним ткивима ниво TNF- α је врло висок и у корелацији је са RANKL-ом и матрикс металопротеиназама, што указује и на његову улогу у ресорпцији алвеоларне кости и деструкцији ткива (191). Резултати нашег истраживања показују да је експресија гена за TNF- α већа у периапикалним лезијама DA у поређењу са АО пацовима (**Слика 16.**; **Табела 7.**). Индиректно можемо закључити да повећана експресија INF- γ и TNF- α у већим периапикалним лезијама са израженијом деструкцијом кости у DA пацовима утиче на прогресију болести. Поред свог директног утицаја TNF- α има улогу и стимулацији продукције цитокина IL-1 β и IL-6 (73,78,79).

У основи периапикалне лезије настају као последица деструкције ткива дејством микроорганизма и реакције имунског одговора домаћина. Један од продуката ћелија имунског одговора на инфекцију изазвану микроорганизмима је IL-1 (62). IL-1 β је једна од две форме овог цитокина (63), углавном га продукују макрофаги и дендритске ћелије. Такође, продукција овог цитокина је детектована у гингивалним фибробластима, ћелијама периодонцијума, али и остеобластима (110). У нашем истраживању смо показали да је експресија гена за IL-1 β статистички значајно већа у периапикалним лезијама DA у односу на АО пацове (**Слика 15.**; **Табела 7.**). У периапикалним лезијама IL-1 β повећава активност колагеназа и матрикс металопротеиназа који учествују у деградацији екстрацелуларног матрикса и доводе до остеокластогенезе и деструкције

тквива (192,193). Улогу у остеоκластогенези IL-1 β остварује и преко повећане регулације RANKL-а (194). Такође, *Popovaska* и сарадници (195) су показали да је највећи ниво овог цитокина пронађен код хроничних периапикалних лезија људи, а најмањи ниво је пронађен код стабилних форми гранулома и циста. Осим тога, резултати студије спроведене на становништву Бразила су показали да полиморфизам гена за IL-1 β може бити фактор ризика за настанак хроничних периапикалних лезија (128).

Поред TNF- α , IL-1 β и IL-17 се налази у ниским нивоима у здравом гингивалном ткиву, али тај ниво се значајно повећава у инфламацији периодонцијума (196). Као и два претходна цитокина и IL-17 је био тема нашег истраживања. У ћелијском инфилтрату периапикалних лезија детектована је већа заступљеност CD3+CD4+IL-17 продукујући ћелија код DA у односу на АО пацове (**Табела 6.**). Већи ниво IL-17 је пронађен у симптоматским периапикалним лезијама, и овај ниво је у корелацији са бројем неутрофила (42). Такође, у нашој студији смо показали да је број неутрофила већи код DA пацова као и заступљеност IL-17 у односу на периапикалне лезије АО пацова (**Слика 5. и 7.; Табела 5.**) и (**Слика 12.; Табела 6.**). Позитивна корелација IL-17 и INF- γ је пронађена само у симптоматским лезијама, указујући на њихову заједничку улогу у егзацербацији хроничних периапикалних лезија и њиховој прогресији (42). Корелација ова два цитокина у нашој студији није посебно анализирана. Међутим, наши резултати се слажу са тврдњом да ова два цитокина имају улогу у прогресији лезији, обзиром да је заступљеност CD3+CD4+IL-17 и CD3+CD4+INF- γ већа у периапикалним лезијама DA пацова који су развили веће лезије него код АО пацова.

У физиолошким условима, проинфламаторни механизми су строго контролисани да би се спречила прекомерна деструкција ткива и иницирање аутоимунских процеса. Један од кључних имунорегулаторних цитокина у периапикалним лезијама је IL-10 (197). Поред макрофага овај цитокин продукују и дендритске ћелије и различите субпопулације Т ћелија (198). Анализом ћелијског инфилтрата периапикалних лезија детектовали смо значајно већу заступљеност овог цитокина код DA у поређењу са АО пацовима (**Слика 13.; Табела 6.**). Једна од улога IL-10 је супресије функције макрофага и дендритских ћелија, ограничавајући Th1 и Th2 имунски одговор. Међутим, утицај IL-10 у многоме зависи од места и времена његове продукције и ћелија које га продукују (197). Показано је да у периапикалним лезијама када је повишен ниво продукције INF- γ , као регулаторни механизам имунског одговора долази до повећане продукције IL-10 (199). Овај налаз може објаснити резултате повећане продукције IL-10 у периапикалним лезијама DA пацова. У складу са нашим резултатима су и резултати студије *Colic* и сарадника (199) који показују да када је повећана продукција INF- γ у периапикалним лезијама праћена повећаном продукцијом антиинфламаторних и регулаторних цитокина. Додатно, у нашој студији посебно је анализиран однос IL-17 и IL-10 и забележен је значајно већи IL-17/IL-10 у периапикалним лезијама DA у односу на АО пацове (**Слика 14.**). *Stumhofer* и сарадници (200) су показали да дупло позитивна IL-17+IL-10+ ћелијска популација има протективну улогу ограничавајући инфламацију и деструкцију ткива изазвану прекомерном продукцијом IL-17. Обзиром да је у периапикалним лезијама DA повећана продукција IL-17 у односу на АО пацове, повећана продукција IL-10 може бити покушај имунског одговора домаћина да ограничи инфламацију.

Равнотежа у инфламацији периапикалних ткива може бити успостављена балансом проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора, да не би дошло до прекомерне деструкције ткива. Цитокин који има улогу у стимулацији хуморалног имунског одговора и инхибицији Th1 проинфламаторног одговора је IL-4 (107). У нашем истраживању нисмо детектовали статистички значајну разлику у експресији гена за IL-4

између DA и АО пацова (**Слика 16.; Табела 7.**). Поред антиинфламаторне улоге IL-4 показана је и улога у смањењу ресорпције кости, инхибицијом RANKL-а и повећаном активацијом OPG-а (198). Показано је да IL-4 може имати протективну улогу у развоју периапикалних лезија, анти-остеокластичним дејством (201). Супротно томе, резултати студије *Sasaki* и сарадника (104) су показали да је IL-10 битан ендогени супресор ресорпције кости изазване инфламацијом, док IL-4 има мали ефекат на инхибицију ресорпције инфламације.

Узевши заједно наши резултати показује да је имунски одговор у периапикалним лезијама регулисан комплексном мрежом цитокина. Када продукција Th1 и Th17 цитокина доминира над продукцијом Th2 цитокина, последично долази до развоја периапикалне лезије. Повећана продукција проинфламаторних цитокина је одговорна за инфламацију и ресорпцију алвеоларне кости, као што смо показали у периапикалним лезијама DA пацова. Такође, познато је да су Th2 цитокини антиинфламаторни и да имају улогу у смањењу инфламације и ресорпције кости (42). Међутим, повећана продукција Th2 цитокина код DA пацова који су развили веће периапикалне лезије од АО пацова (**Слика 2. и 5.**) може бити одговор на инфламацију и покушај да се она ограничи.

5.3. RANKL/OPG у периапикалним лезијама

Као што је познато, у развоју периапикалних лезија прво долази до активације имунских ћелија у одговору на дејство микроорганизама у периапикалном ткиву. Ове ћелије продукују различите медијаторе инфламације који утичу на процес остеокластогенезе. Процес ресорпције алвеоларне кости је главни механизам у развоју периапикалних лезија. Ресорпција кости у овим лезијама је последица пролиферације и диференцијације прекурсора остеокласта у зреле остеокласте који имају главну улогу у остеокластогенези (98,198). RANK, RANKL и OPG су главни молекули одговорни за активност остеокласта и метаболизма кости. Познато је да су однос RANKL/OPG и утицај проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина одговорни за развој остеолитичких лезија, њихову стабилност и прогресију (106). Управо због улоге ових молекула у ресорпцији кости ми смо у наставку истраживања анализирали и експресију гена за RANKL и OPG, и њихов однос.

Експресија RANKL-а је статистички значајно већа у периапикалним лезијама DA у односу на АО пацове (**Слика 17.**). *Kawashima* и сарадници (202) су показали да је експресија RANKL-а повишена одмах на почетку ресорпције кости у моделу периапикалних лезија пацова. Константно повећање експресије RANKL-а је у складу са повећањем ресорпције кости и самим тим величине периапикалне лезије (203). У нашој студији већа експресија RANKL-а код DA пацова одговара развоју већих периапикалних лезија у односу на АО пацове (**Слика 2. и 5.**). Показан је утицај проинфламаторних цитокина на експресију RANKL-а (45). TNF- α је један од проинфламаторних цитокина за који се сматра да има улогу у остеокластогенези директним дејством на RANKL (78,102). Такође, студија *Araujo-Pires* и сарадника (107) је показала да је висок ниво проинфламаторних цитокина TNF- α и INF- γ у корелацији са експресијом RANKL-а у активним периапикалним лезијама. Сматра се да INF- γ има улогу у остеокластогенези, јер његовом инхибицијом у инфекцији коштаног ткива долази до заустављања ресорпције кости (91). Повећана продукција TNF- α и INF- γ у периапикалним лезијама DA пацова у нашој студији може бити одговорна за већу експресију RANKL-а. Обзиром да су у нашој студији експресија оба цитокина (TNF- α и INF- γ) (**Слика 15. и 11.**) и

експресија RANKL-а статистички значајно виши у периапикалним лезијама DA пацова, па можемо закључити да је њихов синергистички ефекат одговоран за развој већих лезија у DA пацова (Слика 2. и 5.).

Као одговор на инфламацију, али и у физиолошким условима у организму В ћелије су најзначајнији извор OPG-а који је главни инхибитор остеокласта (204). Улога OPG-а је спречавање ресорпције кости везивањем за RANKL, чиме се омета интеракција RANK/RANKL (100). У нашој студији статистички значајно већа експресија OPG-а је у периапикалним лезијама АО пацова у односу на DA пацове (Слика 17.). Повећана експресија OPG-а (Слика 17.) је у складу са мањим периапикалним лезијама АО пацова у односу на периапикалне лезије DA пацова (Слика 2. и 5.). Као што је претходно поменуто, медијатори инфламације имају улогу у ресорпцији кости (198). Антиинфламаторни цитокин IL-10 има улогу у инактивацији RANKL-а, чиме остварују синергистички ефекат са OPG-ом у инхибицији ресорпције кости (202). Поред IL-10, још један антиинфламаторни цитокин који има улогу у инхибицији коштане ресорпције је IL-4 (205).

Добијени резултати експресије RANKL-а и OPG-а у периапикалним лезијама DA и АО пацова омогућили су анализу њиховог односа. Без обзира да ли се у ткиву дешава ресорпција или апозиција кости важнији је RANKL/OPG однос него појединачне вредности RANKL-а и OPG-а (206). У нашој студији RANKL/OPG однос је статистички значајно већи код DA у односу на АО пацове са периапикалним лезијама (Слика 17.). Различити RANKL/OPG односи се повезује или са прогресивним или са стабилним периапикалним лезијама (45). Статистички значајно већи однос RANKL/OPG је показан у периапикалним лезијама DA пацова у односу на АО пацове, што је у складу са већим периапикалним лезијама DA пацова (Слика 13. и 16.). Резултат наше студије је у складу са податком да је овај однос одговоран за прогресију лезије и уколико је RANKL/OPG однос велики периапикалне лезије су прогресивније (45). *Bostanci* и сарадници (207) су показали да овај односу у гингивалној течности може бити индикатор степена прогресије периодонталне болести.

5.4. Утицај периапикалних лезија на ниво IL-6 и TNF- α у системској циркулацији

Периапикалне лезије су честа обољења усне дупље која карактерише јака инфламаторна реакција ткива и ресорпција алвеоларне кости и повећана продукција медијатора инфламације (208). Претходним студијама је показано да су болести периодонталног ткива повезане са повећаном продукцијом цитокина који имају значајну улогу у разним системским болестима (209,210). Резултати наше студије показују статистички значајно већи ниво IL-6 и TNF- α измерених у системској циркулацији DA пацова у односу на АО пацове са периапикалним лезијама (Слика 18. и 19.). Да повећана локална продукција инфламаторних цитокина може имати и системске ефекте показано је у студији на пацијентима који су имали апикални периодонтитис без придружених болести тако што им је детектовано повећање IL-6 у системској циркулацију (208). Такође, високи вредности проинфламаторних цитокина у првом реду детектоване су и код пацијента који су осим инфламације у периодонталном ткиву имали и неку придружену болест (гојазност, кардиоваскуларна обољења, хроничне опструктивне болести плућа и Алцхајмерове болести) (209–212). На основу претходно поменутих студија и резултата наше студије, можемо претпоставити да локална инфламација у периапикалном ткиву може имати утицај на здравље целокупног организма. Такође, теоријом “фокус

инфекција” је сугерисано да периапикалне лезије могу бити узрок развоја системских болести. Према овој теорији, дуготрајна хронична инфламација у периапикалном ткиву може узроковати запаљење неког удаљеног органа: метастатском инфекцијом услед транзиторне бактеријемеије или појачаним имунским одговором услед инфекције (131,213).

5.5. Параметри оксидативног стрес у периапикалним лезијама

Оксидативни стрес настаје поремећајем равнотеже између продукције реактивних кисеоничних врста и антиоксидативних молекула у организму (132,214). Хомеостаза у коштаном ткиву је резултат равнотеже у стварању и ресорпцији коштаног ткива (215). Показано је да реактивне кисеоничне врсте смањују стварање алвеоларне кости, инхибицијом диференцијације остеобласта и стимулацијом остеоκластогенезе (216). Потврђено је да периодонтитис као локална инфламација у алвеоларној кости може бити повезана са системским оксидативним стресом и смањеним антиоксидативним капацитетима организма (214).

У нашој студији ниво прооксидативног H_2O_2 у системској циркулацији је био статистички значајно већи код DA пацова са периапикалним лезијама у односу на АО пацове (**Слика 20.**; **Табела 8.**). *Kook* и сарадници (217) су показали да H_2O_2 у директном контакту са фибробластима из периодонталног лигамента доводи до смањења пролиферације и диференцијације у остеобласте или чак до њихове апоптозе. Резултати ове студије су у складу са нашим резултатима, обзиром да DA пацови имају већи ниво H_2O_2 и развили су веће периапикалне лезије од АО пацова (**Слика 2.** и **5.**). Улога NO у периапикалним лезијама огледа се у регулисању инфламаторне реакције тако што утиче на продукцији цитокина (218). Показано је да постоји статистички значајно већи ниво NO код АО пацова са периапикалним лезијама у односу на здраве АО пацове (**Слика 20.**). Такође, код DA пацова са периапикалним лезијама ниво NO је повишен, али не постоји статистички значајна разлика у односу на здраве DA пацове (**Слика 20.**). Можемо претпоставити да NO има улогу у инфламацији периапикалног ткива, али неопходно је спровести додатна истраживања како бисмо дефинисали његову тачну улогу у овој болести. *Inchingolo* и сарадници (219) су показали да људи са хроничним периапикалним лезијама могу имати повећан ниво параметара оксидативног стреса у системској циркулацији и да то може угрозити опште здравље, поготово уколико је удружено са неким системским обољењем.

У нашем истраживању анализирали смо и ниво антиоксидативних маркера у системској циркулацији (CAT, SOD, GSH). Није показана статистички значајна разлика у нивоу антиоксидативних маркера између DA и АО пацова са периапикалним лезијама (**Слика 21.**; **Табела 8.**), иако резултати неких студија показују да су нивои антиоксидативних маркера нижи у системској циркулацији код испитаника са развијеним периапикалним лезијама у односу на здраве контроле (220). Међутим, када смо поредили ниво антиоксидативних маркера (CAT и SOD) између DA пацова са периапикалним лезијама и здравих контрола, детектовали смо нижи ниво антиоксидативних маркера у DA пацовима са периапикалним лезијама, што је у складу са резултатима претходно наведене студије.

Локални ниво маркера оксидативног стреса мерен је у периапикалним лезијама и здравом периодонталном ткиву. Значајно нижи ниво GSH је пронађен у здравим периапикалним ткивима DA у поређењу са АО пацовима. Супротно, ниво GSH је био значајно већи код периапикалних лезија DA у поређењу са АО пацовима (**Слика 22.**;

Табела 9.) Занимљиво, ниво антиоксидативног маркер GSH је већи код DA пацова са већим периапикалним лезијама и јачим имунским одговором у поређењу са АО пацовима. Детектоване разлике код DA пацова супротне су резултатима студије у којој је детектован нижи ниво GSH у периапикалним лезијама у поређењу са здравим периодонталним ткивима (221), али су у складу са резултатима добијеним анализирањем нивоа овог маркера између АО пацова са периапикалним лезијама и здравих контрола. Овај резултат нам донекле може објаснити развој већих периапикалних лезија код DA пацова и већу продукцију имуномодулаторних цитокина обзиром да је показано да мале промене у нивоу GSH могу имати значајну улогу у имунском одговору, као и да недостатак овог маркера доводи до преласка са Th1 на Th2 имунски одговор (222).

Ниво прооксидативног маркера TBARS је статистички значајно већи у периапикалним лезијама DA пацова у поређењу са АО пацовима. Студија *Acquier* и сарадника (223) је показала да је ниво TBARS значајно већи код пацијента са агресивним периодонтитисом у поређењу са хроничним лезијама и здравим контролама. Резултат ове студије је у складу са резултатима наше студије, обзиром да је ниво TBARS повишен код DA пацова који су развили веће периапикалне лезије са већом ресорпцијом алвеоларне кости и израженијом инфламацијом у односу на АО пацове (**Слика 2. и 5.**).

5.6. Разлике у имуногенетској основи њихов утицај на патогенезу периапикалних лезија DA и АО пацова

Карактеристике имунског одговора и оксидативног стреса на развој периапикалних лезија два високородна соја пацова су испитиване у овом истраживању. Као што је већ поменуто на почетку, периапикалне лезије немају увек исте карактеристике и не развијају се код свих људи са истим степеном каријесних лезија, због чега се претпоставља да генетске разлике које одређују имунски одговор могу имати утицај на њихов развој. Познато је да постоје генетске разлике одговорне за специфичан имунски одговор код одређених сојева животиња (150). Претходним студијама је показано да се DA и АО пацови разликују у осетљивости на инфламаторне стимулусе у различитим ткивима и индукцији експерименталних аутоимунских болести (150,224–227). Сојне разлике DA и АО пацова и примена модела периапикалних лезија код њих пружа нам могућност да додатно расветлимо да ли су сојне разлике одговорне за осетљивост на развој периапикалних лезија (**Схема 5.**).

У нашој студији смо показали да су DA пацови развили веће периапикалне лезије него АО пацови (**Слика 2. и 5.**). Код DA пацова је показана већа ресорпција алвеоларне кости, као и инфилтрација ћелијама имунског одговора у поређењу са АО пацовима (**Слика 3., 6. и 7.; Табела 4. и 5.**). Можемо претпоставити на основу ових резултата да су DA пацови осетљивији на развој великих периапикалних лезија у односу на АО пацове. Поред величине периапикалне лезије, показана је и разлика у броју неутрофила (**Слика 6.**).

Број неутрофила је статистички значајно већи код DA пацова, што је у складу са разликама у величини периапикалних лезија ова два соја пацова. Повећан број неутрофила код DA пацова у односу на АО пацове је показан и у моделу запаљења плућа пацова изазваним гљивом *Aspergillus fumigatus* (227). Обзиром, да је број неутрофила повећан код запаљења плућа изазваним *Aspergillus fumigatus* и код периапикалних лезија које у већини случајева настају дејством микроорганизама, претпостављамо да је појачана колонизација неутрофила код обе инфламације карактеристичан одговор DA пацова на инфекцију изазвану различитим микроорганизмима. Претходном студијом је показано да рана колонизација макрофагима може бити један од главних фактора

одговорних код DA пацова за осетљивост на развој ЕАЕ за разлику од АО пацова (175). У нашој студији, DA пацови су развили веће периапикалне лезије у односу на АО пацове и показан је већи број макрофага у њиховим лезијама.

Поред разлика у величини лезије и саставу ћелијског инфилтрата, показане су разлике и у продукцији медијатора инфламације. У овој студији је показана разлика у продукцији проинфламаторних цитокина (INF- γ , TNF- α , IL-1 β и IL-17), али и антиинфламаторних (IL-10, IL-4). Као што је у претходним студијама за аутоимунске и системске инфламаторне болести код DA пацова показано да су претежно развили Th1/Th17 имунски одговор (150, 224–227), тако је и у нашој студији детектована значајно већа продукција Th1/Th17 цитокина у периапикалним лезијама DA пацова (**Слика 11. и 12.; Табела 6.**).

Повећана продукција једног од главних цитокина у патогенези периапикалних лезија TNF- α код DA пацова са периапикалном лезијом је у складу са резултатима студије где је такође повећана продукција овог цитокина код DA пацова у моделу ЕАЕ у поређењу са АО пацовима (228). У до сада нама познатој литератури продукција цитокина IL-1 β није проучавана код ова два соја пацова. Међутим, показана је повезаност генетског полиморфизма за IL-1 β на развој денталног апсцеса код људи (128). Можемо претпоставити да овај цитокин има значајну улогу у осетљивости на развој периапикалних лезија између DA и АО пацова.

Продукција имунорегулаторног цитокина IL-10 је била изненађујуће већа у периапикалним лезијама DA пацова у односу на АО пацове (**Слика 13.; Табела 6.**). Студија *Vasilev* и сарадника (225) је показала повећану продукцију овог цитокина код DA пацова у одговору на инфекцију *Trichinella spiralis*. Како бисмо објаснили овај резултат одредили смо однос IL-17 и IL-10, који је статистички значајно већи код DA пацова у поређењу са АО пацовима (**Слика 14.**). Такође, студија *Stanisavljevic* и сарадника (226) је показала повећану продукцију IL-10 у моделу ЕАЕ код DA пацова. Додатно, ова студија је показала и статистички значајно већи однос IL-17/IL-10 и IL-1FN- γ /IL-10 код DA пацова у односу на АО пацове (226). На основу тога, повећану продукцију IL-10 можемо објаснити одговором на прекомерну продукцију проинфламаторних цитокина (176).

Ниво продукције антиинфламаторног цитокина IL-4 се није разликовао у периапикалним лезијама DA и АО пацова (**Слика 16.; Табела 7.**). Резултат наше студије је у складу са претходним студијама које су такође истраживале имунски одговор ова два соја пацова и њихову осетљивост на развој болести, где није показана разлика у продукцији овог цитокина или чак није ни детектована његова продукција (227,229). Ипак, резултати неких студија које су испитивале улогу IL-4 у развоју периапикалних лезија су опречни, од тога да нема никакву улогу до тога да спречава развој периапикалних лезија (201,230).

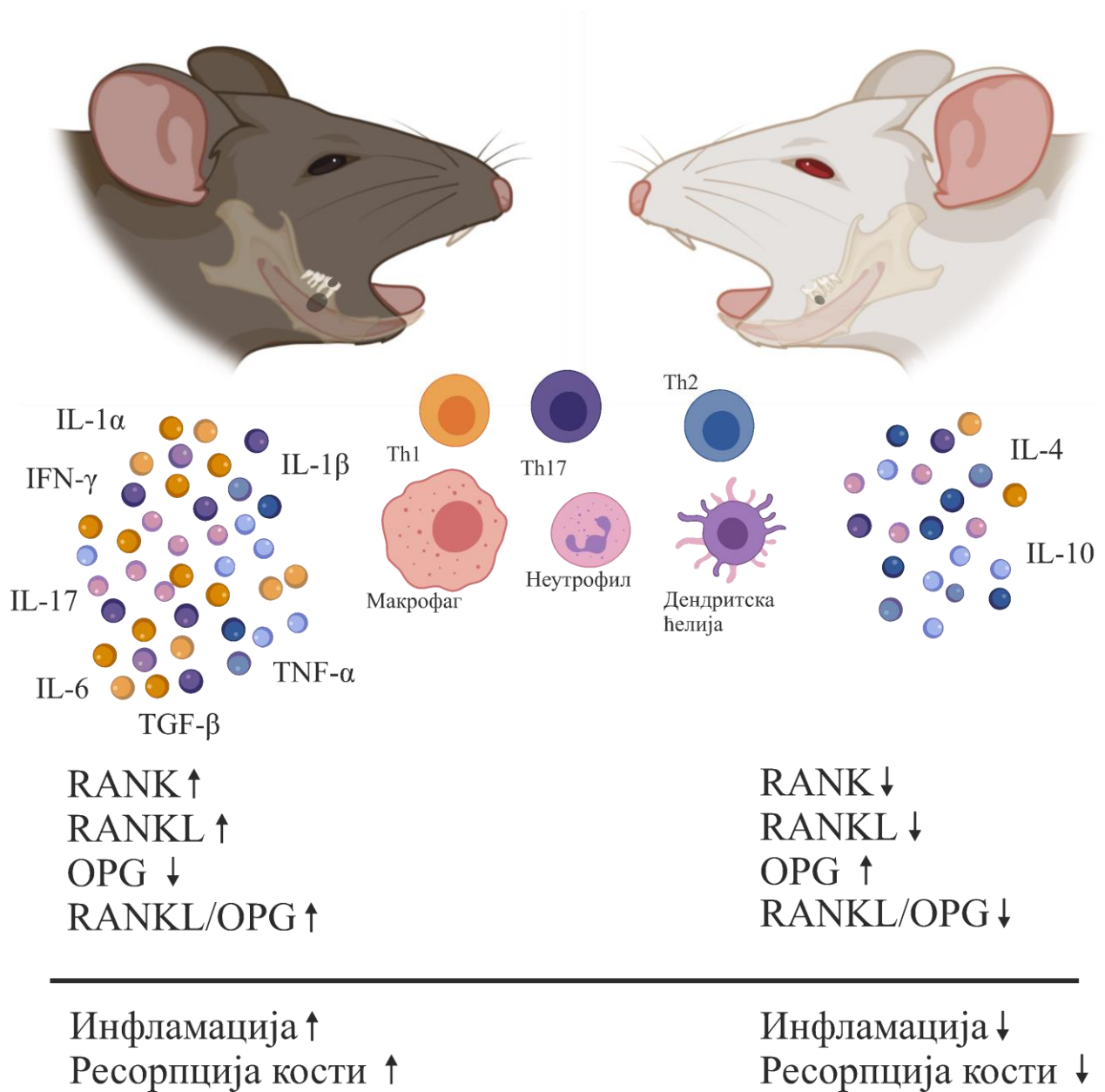


Схема 5. Иmunски одговор DA и AO пацова у периапикалним лезијама. DA пацови су развили веће периапикалне лезије, са доминантним Th1/Th17 имунским одговором и последичном већом ресорпцијом алвеоларне кости. AO пацови су развили мале периапикалне лезије са значајно мањом инфламацијом и ресорпцијом алвеоларне кости.



ЗАКЉУЧАК

COUNTRY STATE UK 1234

6. ЗАКЉУЧАК

Главни закључак овог истраживања је да генетски условљена разлика у имунолошкој реактивности снажно утиче на патогенезу експерименталних периапикалних лезија.

Овај закључак је изведен анализом развоја периапикалних лезија у Dark Agouti и Albino Oxford пацова на основу следећих добијених резултата:

- Радиографска анализа двадесет првог дана након отварања коморе пулпе и експозиције оралном окружењу и микроорганизмима усне дупље је показала знатно већи степен ресорпције алвеоларне кости у DA пацова.
- Хистолошка и имунохистохемијска анализа показује статистички значајно већи број инфламаторних ћелија у периапикалном ткиву, укључујући неутрофиле, макрофаге и лимфоците код DA пацова.
- Анализа лимфоидних ћелија проточном цитометријом је такође показала већи проценат Т ћелија који луче проинфламаторне цитокине (CD3+CD4+IL-17+ и CD3+CD4+INF- γ) у периапикалним лезијама DA пацова. CD3+CD4+IL-10+ ћелије су такође бројније код DA пацова, вероватно као одговор који ограничава инфламацију.
- Експресија гена одређивана qRT-PCR методом такође је показала већу експресију проинфламаторних цитокина урођене имуности (IL-1 β и TNF- α) и цитокина стечене имуности (IL-17 и INF- γ) у DA пацова.
- Експресија рецептора за универзални стимулатор инфламаторних цитокина (RANKL) је већа у DA пацова, док је остеопротегерин (OPG) регулаторни фактор, “*decoy*” рецептор за RANKL, је мање експримиран у DA пацовима. Појачана инфламација у периапикалним лезијама DA пацова се огледа и у већем RANKL/OPG односу у поређењу са периапикалним лезијама АО пацова.
- Инфламаторни процеси у периапикалним ткивима утичу и на системски ниво цитокина: ниво IL-6 и TNF- α одређен ELISA методом је већи у DA пацовима.
- Спектрофотометријска анализа параметара оксидативног стреса у системској циркулацији и супернатанту периапикалних лезија указује на виши ниво прооксидативних маркера: H₂O₂ и TBARS-а у DA пацовима, али и антиоксидативног GSH-а маркера.

Познавање генетских разлика може допринети разумевању механизмима који су одговорни за различиту патогенезу и ниво инфламације у периапикалним лезијама људи и указати на значај имунопатолошких фактора у превенцији и терапији.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Nibali L, Di Iorio A, Tu YK, Vieira AR. Host genetics role in the pathogenesis of periodontal disease and caries. *J Clin Periodontol*. 2017;44:S52–78.
2. Robert H Selwitz, Amid I Ismail NBP. Dental Caries. *Lancet*. 2007;369:51–59.
3. Wu SC, Ma XX, Zhang ZY, Lo ECM, Wang X, Wang B, Tai BJ, Hu DY, Lin HC, Wang CX, Liu XN, Rong WS, Wang WJ, Si Y, Feng XP, Lu HX. Ethnic Disparities in Dental Caries among Adolescents in China. *J Dent Res*. 2020;
4. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020;83:26–39.
5. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93:1045–53.
6. Ansari G, Golpayegani MV, Welbury R. Histology and Embryology of the Teeth and Periodontium. *Atlas Pediatr Oral Dent Dev Anomalies*. 2018;13–6.
7. Nanci A. Ten Cate 's Oral Histology Development , Structure , and Function. Elsevier. 2018;824.
8. Torabinejad M, Bakland LK. Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. A review. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1978;46:685–99.
9. Boeddinghaus R, Whyte A. The many faces of periapical inflammation. *Clin Radiol*. 2020;75:675–87.
10. Ramachandran PN. Apical periodontitis : a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*. 1997;13:121–48.
11. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;18:422–6.
12. Torabinejad M, Cotti E, Jung T. Concentrations of leukotriene B4 in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod*. 1992;18:205–8.
13. Bar-Shavit Z. Taking a Toll on the bones: Regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity*. 2008;41:195–203.
14. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod*. 2014;40:155–63.
15. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Are D Etermined By the N Ature. 2002;17–34.
16. Nair PNR, 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;81:93–102.
17. Nair PNR, Schmid-Meier E. An apical granuloma with epithelial integument. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1986;62:698–703.
18. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Vol. 15, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2004. 348–381 p.
19. Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH. Evolution and development of Hertwig's Epithelial

- Root Sheath. *Dev Dyn.* 2006;235:1167–80.
20. Odell E. Cysts of the oral and maxillofacial regions. Vol. 53, *Histopathology.* 2008. 113–113 p.
 21. Simon JHS. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod.* 1980;6:845–8.
 22. Torabinejad M, Kettering J. Identification and Relative Concentration of B and T Lymphocytes in Human Chronic Periapical Lesions Identification y Concentracion Relativa de Linfocitos B y T en Lesiones Periapicales Cronicas en Humanos. *J Endod* [Internet]. 1985;11:122–5. Available from: [papers3://publication/uuid/058C3DE4-7E4E-44C2-B901-0A0CB1527FA0](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3301000/)
 23. Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1987;22:335–41.
 24. Rotstein I. Interaction between endodontics and periodontics. *Periodontol* 2000. 2017;74:11–39.
 25. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod* [Internet]. 2018;44:1616-1625.e9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.07.016>
 26. Bronzato JD, Bomfim RA, Hayasida GZP, Cúri M, Estrela C, Paster BJ, Gomes BPFA. Analysis of microorganisms in periapical lesions: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2021;124:105055. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105055>
 27. Siqueira JF, Rôçac IN. Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88:969–81.
 28. FIGDOR D, GULABIVALA K. Survival against the odds: microbiology of root canals associated with post-treatment disease. *Endod Top.* 2008;18:62–77.
 29. Bronzato JD, Bomfim RA, Edwards DH, Crouch D, Hector MP, Gomes BPFA. Detection of Fusobacterium in oral and head and neck cancer samples: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol.* 2020;112:13–20.
 30. SJÖGREN U, HÄNSTRÖM L, HAPPONEN RP, SUNDQVIST G. Extensive bone loss associated with periapical infection with *Bacteroides gingivalis*: a case report. *Int Endod J.* 1990;23:254–62.
 31. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2000;35:3–16.
 32. Sabeti M, Simon JH, Nowzari H, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus active infection in periapical lesions of teeth with intact crowns. *J Endod.* 2003;29:321–3.
 33. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:15–8.
 34. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31:311–25.
 35. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical

- lesions. *J Endod.* 1987;13:535–40.
36. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical Inflammatory Responses. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9:498–521.
37. Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand* [Internet]. 2019;77:173–80. Available from: <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1521005>
38. Máton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:139–50.
39. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *J Oral Maxillofac Res.* 2011;2:1–15.
40. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone.* 2003;33:28–37.
41. Shimauchi H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod.* 2001;27:749–52.
42. Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009;47:101–13.
43. Bracks IV, Armada L, Gonçalves LS, Pires FR. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J Endod.* 2014;40:63–8.
44. Andrade ALDL De, Nonaka CFW, Gordón-Núñez MA, Freitas RDA, Galvão HC. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box p3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod.* 2013;39:990–4.
45. Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira R de C, Sogayar MC, Granjeiro JM, Garlet GP. 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* [Internet]. 2008;34:932–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.002>
46. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:2334–46.
47. Kaneko T, Okiji T, Zhao L, Esgeurra R, Suda H. Heterogeneity of dendritic cells in rat apical periodontitis. *Cell Tissue Res.* 2008;331:617–23.
48. Kopitar AN, Ihan Hren N, Ihan A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:1–5.
49. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000;18:767–811. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>

50. López-Bravo M, Ardavin C. In Vivo Induction of Immune Responses to Pathogens by Conventional Dendritic Cells. *Immunity*. 2008;29:343–51.
51. Nilsen R, Johannessen AC, Skaug N, Matre R. In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1984;58:160–5.
52. Structures MB, Akamine, A., Hashinguchi, I., Toriya, Y., & Maeda, K. (1994). Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Dental Traumatology*, 10(3), 121–128. doi:10.1111/j.1600-9657.1994.tb00536.x.
53. Stashenko P, Yu SM. T Helper and T Suppressor Cell Reversal During the Development of Induced Rat Periapical Lesions. *J Dent Res*. 1989;68:830–4.
54. Mielke MEA, Peters C, Hahn H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev*. 1997;158:79–93.
55. Kuntz DD, Genco RJ, Guttuso J, Natiella JR. Localization of immunoglobulins and the third component of complement in dental periapical lesions. *J Endod*. 1977;3:68–73.
56. Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun A -K, Williams DM, Cruchley AT. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med*. 1988;17:84–90.
57. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Dent Traumatol*. 1990;6:89–96.
58. De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26:289–307.
59. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*. 2008;28:445–53.
60. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44:55–66.
61. Čolić 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;115:315–20.
62. 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.
63. Martinez ZRA, Naruishi K, Yamashiro K, Myokai F, Yamada T, Matsuura K, Namba N, Arai H, Sasaki J, Abiko Y, Takashiba S. Gene Profiles during Root Canal Treatment in Experimental Rat Periapical Lesions. *J Endod*. 2007;33:936–43.
64. Tani-Ishii N, Wang C -Y, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10:213–9.
65. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 2007;13:851–6.

66. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod* [Internet]. 2012;38:740–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.02.021>
67. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod* [Internet]. 2011;37:455–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.009>
68. 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.
69. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990;75:40–7.
70. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* [Internet]. 1992;76:42–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1628899> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1421732>
71. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimi M, Maid R, Feldmann M, Kishimoto T. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 1988;18:1797–802.
72. Huang GTJ, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92:83–8.
73. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10:45–65.
74. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* [Internet]. 2000;118:503–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
75. Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF- α stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14⁺ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2006;21:193–206.
76. Graves DT, Cochran D. The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol*. 2003;74:391–401.
77. Garlet GP, Martins W, Fonseca BAL, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31:671–9.
78. Graves D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol*. 2008;79:1585–91.
79. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:49–60.

80. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:933–44.
81. Appay V, Van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom Part A.* 2008;73:975–83.
82. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol.* 2009;39:2076–82.
83. Garlet GP, Martins W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003;38:210–7.
84. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 1999;67:2804–9.
85. Teng YTA, Mahamed D, Singh B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun.* 2005;73:3453–61.
86. Garlet GP, Cardoso CRB, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The essential role of IFN- γ in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.* 2008;10:489–96.
87. Ji J-D, Park-Min K-H, Shen Z, Fajardo RJ, Goldring SR, McHugh KP, Ivashkiv LB. Inhibition of RANK Expression and Osteoclastogenesis by TLRs and IFN- γ in Human Osteoclast Precursors. *J Immunol.* 2009;183:7223–33.
88. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.* 2005;208:181–93.
89. Sommer MEL, Dalia RA, Nogueira AVB, Cirelli JA, Vinolo MAR, Fachi JL, Oliveira CA, Andrade TAM, Mendonça FAS, Santamaria M, Felonato M. Immune response mediated by Th1 / IL-17 / caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. *Arch Oral Biol [Internet].* 2019;97:77–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.009>
90. Garlet GP. Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010;89:1349–63.
91. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. IFN- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007;117:122–32.
92. Dong C. TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:337–48.
93. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203:2673–82.
94. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004;35:21–41.

95. Lappin DF, Macleod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol*. 2001;123:294–300.
96. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:454–65.
97. Naundorf S, Schröder M, Höflich C, Suman N, Volk HD, Grütz G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN- γ but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39:1066–77.
98. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. 2014;142:5050–5.
99. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12:17–25.
100. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:139–46.
101. Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J*. 2013;46:99–111.
102. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest*. 2000;106:1481–8.
103. O' Gradaigh D, Ireland D, Bord S, Compston JE. Joint erosion in rheumatoid arthritis: Interactions between tumour necrosis factor α , interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:354–9.
104. Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang C-Y, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, But Not IL-4, Suppresses Infection-Stimulated Bone Resorption In Vivo. *J Immunol*. 2000;165:3626–30.
105. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: Possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:2162–6.
106. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol*. 2014;5:1–12.
107. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, Trombone APF, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of t helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*. 2014;22:336–46.
108. Bi CS, Sun LJ, Qu HL, Chen F, Tian BM, Chen FM. The relationship between T-helper cell polarization and the RANKL/OPG ratio in gingival tissues from chronic periodontitis patients. *Clin Exp Dent Res*. 2019;5:377–88.
109. Lee SY, Min HK, Lee SH, Kwok SK, Ju JH, Cho M La, Park SH. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)-Fc ameliorate autoimmune arthritis by regulation of the Th17 cells/Treg balance and arthrogenic cytokine activation. *Immunol Lett [Internet]*.

- 2016;172:56–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.011>
110. Yen-Chun G, Liu UHL & Y-TAT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*. 2010;52:163–206.
 111. Zhuang Z, Yoshizawa-Smith S, Glowacki A, Maltos K, Pacheco C, Shehabeldin M, Mulkeen M, Myers N, Chong R, Verdellis K, Garlet GP, Little S, Sfeir C. Induction of M2 Macrophages Prevents Bone Loss in Murine Periodontitis Models. *J Dent Res*. 2019;98:200–8.
 112. Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 2021;100:29–36.
 113. Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8:1–8.
 114. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160:1–40.
 115. Lin SK, Kok SH, Lin LD, Wang CC, Kuo MYP, Lin CT, Hsiao M, Hong CY. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:24–9.
 116. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. 2001;7:2–10.
 117. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160–232.
 118. Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng W Sen, Cheng BL, Luo SQ. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*. 2005;280:17497–506.
 119. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003;57:145–55.
 120. Grant MM, Brock GR, Matthews JB, Chapple ILC. Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. *J Clin Periodontol*. 2010;37:17–23.
 121. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, van der Molen RG, van Rijssen E, van Cranenbroek B, Oosting M, Smeekens S, Jaeger M, Zorro M, Withoff S, van Herwaarden AE, Sweep FCGJ, Netea RT, Swertz MA, Franke L, Xavier RJ, Joosten LAB, Netea MG, Wijmenga C, Kumar V, Li Y, Koenen HJPM. Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Rep* [Internet]. 2016;17:2474–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.053>
 122. Matsuo G, Rozier RG, Kranz AM. Dental caries: Racial and ethnic disparities among North Carolina kindergarten students. *Am J Public Health*. 2015;105:2503–9.
 123. Schluter PJ, Lee M. Water fluoridation and ethnic inequities in dental caries profiles of New Zealand children aged 5 and 12–13 years: Analysis of national cross-sectional registry databases for the decade 2004–2013. *BMC Oral Health* [Internet]. 2016;16:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12903-016-0180-5>
 124. Van Der Tas JT, Kragt L, Veerkamp JJS, Jaddoe VWV, Moll HA, Ongkosuwito EM,

- Elfrink MEC, Wolvius EB. Ethnic Disparities in Dental Caries among Six-Year-Old Children in the Netherlands. *Caries Res.* 2016;50:489–97.
125. Kornman KS. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. Vol. 24, *Journal of Clinical Periodontology.* 1997. p. 72–7.
126. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998;3:327–38.
127. Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic Polymorphisms of the IL-1 α and IL-1 β Genes in African-American LJP Patients and an African-American Control Population. *J Periodontol.* 2000;71:723–8.
128. Moreira PR, De Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2005;40:306–11.
129. De Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J.* 2007;40:563–72.
130. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: Connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J.* 2015;48:933–51.
131. Sasaki H, Hirai K, M. Martins C, Furusho H, Battaglino R, Hashimoto K. Interrelationship Between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. *Curr Pharm Des.* 2016;22:2204–15.
132. Berar AM, David DC, Lascu L, Matros L, Campian RS. Analysis of hematological and oxidative stress parameters in the evaluation of experimentally induced periapical lesions. *Hum Vet Med.* 2015;7:162–7.
133. Tani-Ishii N, Wang C -Y, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9:129–35.
134. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340–9.
135. Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegrin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *J Oral Pathol Med.* 2012;41:186–93.
136. Yang W, Gao Y, Qian Y, Li J, Hu Q. iTRAQ-based quantitative analysis of alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol [Internet].* 2017;82:180–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.05.017>
137. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T, Yoshikai Y. Gene Expression of Osteoclast Differentiation Factor Is Induced by Lipopolysaccharide in Mouse Osteoblasts Via Toll-Like Receptors. *J Immunol.* 2001;166:3574–9.
138. 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;33:162–9.
139. Qian H, Guan X, Bian Z. FSH aggravates bone loss in ovariectomised rats with experimental periapical periodontitis. *Mol Med Rep.* 2016;14:2997–3006.
 140. Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, Kobayashi M, Gomes Filho JE, Sano K. Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. *J Endod.* 2015;41:2002–7.
 141. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RCM, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PCT, Yamanri GH, Lodi CS, Dezan-Júnior E, Cintra LTA. Effect of Raloxifene on Periapical Lesions in Ovariectomized Rats. *J Endod.* 2015;41:671–5.
 142. Xiong H, Peng B, Wei L, Zhang X, Wang L. Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical Lesions in Rats. *J Endod.* 2007;33:1304–8.
 143. Kohsaka T. Periapical lesions in rats with streptozotocin induced diabetes. *J Endod.* 1996;22:418–21.
 144. Claudino M, Nunes IS, Gennaro G, Cestari TM, Spadella CT, Garlet GP, De Assis GF. Diabetes triggers the loss of tooth structure associated to radiographical and histological dental changes and its evolution to progressive pulp and periapical lesions in rats. *Arch Oral Biol [Internet].* 2015;60:1690–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.08.015>
 145. Wolle CFB, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, Campos MM. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: Refractoriness to systemic antioxidant therapy. *J Endod.* 2013;39:643–7.
 146. Allareddy V, Lin CY, Shah A, Lee MK, Nalliah R, Elangovan S, Allareddy V, Karimbux NY. Outcomes in patients hospitalized for periapical abscess in the United States: An analysis involving the use of a nationwide inpatient sample. *J Am Dent Assoc [Internet].* 2010;141:1107–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2010.0341>
 147. Brilhante Wolle CF, De Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Endod [Internet].* 2012;38:191–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.007>
 148. Milojevic Samanovic A, Jakovljevic V, Vasovic M, Mitrovic S, Rankovic M, Mihajlovic K, Bolevich S, Zivkovic V. Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2021;54:1581–96.
 149. Martins CM, Sasaki H, Hirai K, Andrada AC, Gomes-Filho JE. Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vitro and in vivo study. *Braz Oral Res.* 2016;30:e78.
 150. Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Resistance to the induction of EAE in AO rats: Its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clin Exp Immunol.* 1982;50:311–7.
 151. Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in

- response to high-fat feeding. *PLoS One*. 2015;10:1–21.
152. Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with TH1 and TH17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol*. 2009;47:141–6.
153. Milovanovic M, Volarevic V, Ljujic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *PLoS One*. 2012;7:1–13.
154. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm 1. *J Immunol*. 2000;164:6166–73.
155. Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of Enhanced Macrophage-Mediated Prostaglandin E 2 Production and Its Suppressive Role in Th1 Activation in Th2-Dominant BALB/c Mice . *J Immunol*. 2003;170:757–64.
156. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22:460–6.
157. Lukić M, Mostarica-Stojković M, Kostić M, Tucić N, Vukmanović S. Cellular and genetic basis of the strain differences in IL-2 production in rats. *Transplant Proc*. 1987;19:3137–9.
158. Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol*. 2009;47:141–6.
159. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol*. 2011;232:68–74.
160. Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JAP, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, Silva RM, Dummer PMH. PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *Int Endod J*. 2021;54:848–57.
161. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice. *J Endod* [Internet]. 2015;41:369–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.017>
162. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, Jetic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2016;45:70–6.
163. Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54:1342–52.
164. 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;53:84–96.
165. Sarıtekin E, Üreyen Kaya B, Aşçı H, Özmen. Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J.* 2019;52:1466–78.
166. Xiong B, Shirai K, Matsumoto K, Abiko Y, Furuichi Y. The potential of a surface pre-reacted glass root canal dressing for treating apical periodontitis in rats. *Int Endod J.* 2021;54:255–67.
167. Rózyło-Kalinowska I. Digital radiography density measurements in differentiation between periapical granulomas and radicular cysts. *Med Sci Monit.* 2007;13 Suppl 1:129–36.
168. Teixeira RC, Rubira CMF, Assis GF, Lauris JRP, Cestari TM, Rubira-Bullen IRF. Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats. *J Appl Oral Sci.* 2011;19.
169. Love RM, Firth N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. *Int Endod J.* 2009;42:198–202.
170. Farhadi F, Mirinezhad SS, Zarandi A. Using Periapical Radiography to Differentiate Periapical Granuloma and Radicular Cysts. *Avicenna J Dent Res.* 2016;8:1–5.
171. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun.* 2001;69:744–50.
172. Milena V, Slobodanka M, Tatjana K, Gordana R, Sladjana P, Aleksandra L. Gradation criteria for experimentally induced periapical lesions in mice. *Serbian J Exp Clin Res.* 2013;14:71–6.
173. Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of Periapical Lesions Obtained During Apical Surgery. *J Endod.* 2009;35:634–42.
174. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Dent Traumatol.* 2000;16:1–8.
175. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol [Internet].* 2011;232:68–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.010>
176. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:87–113.
177. Georgiou AC, Cornejo Ulloa P, Van Kessel GMH, Crielaard W, Van der Waal S V. Reactive oxygen species can be traced locally and systemically in apical periodontitis: A systematic review. *Arch Oral Biol [Internet].* 2021;129:105167. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105167>
178. Yu VSH, Messer HH, Shen L, Yee R, Hsu CYS. Lesion progression in post-treatment persistent endodontic lesions. *J Endod [Internet].* 2012;38:1316–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.040>
179. Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Sugaya T, Kawanami M, Suzuki F, Takahashi K, Abe Y, Sato S, Makino-Oi A, Saito A, Takano S, Minabe M, Nakayama Y, Ogata Y, Kobayashi H, Izumi Y, Sugano N, Ito K, Sekino S, Numabe Y, Fukaya C, Yoshinari N, Fukuda M, Noguchi T, Kono T, Umeda M, Fujise O, Nishimura F, Yoshimura A,

- Hara Y, Nakamura T, Noguchi K, Kakuta E, Hanada N, Takashiba S, Amitani Y, Yoshie H. Site-level progression of periodontal disease during a follow-up period. *PLoS One*. 2017;12:1–16.
180. Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova LA, Hernández M, Heymann D, Garlet GP, Sorsa T, Pärnänen P, Lee HM, Golub LM, Vernal R, Kantarci A. Osteoimmunology of oral and maxillofacial diseases: Translational applications based on biological mechanisms. *Front Immunol*. 2019;10:1–24.
181. Metzger Z, Klein H, Klein A, Tagger M. Periapical lesion development in rats inhibited by dexamethasone. *J Endod*. 2002;28:643–5.
182. Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009;47:101–13.
183. Lin SK, Hong CY, Chang HH, Chiang CP, Chen CS, Jeng JH, Kuo MYP. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor- β 1 in induced rat periapical lesions. *J Endod*. 2000;26:335–40.
184. Weber M, Ries J, Büttner-Herold M, Geppert CI, Kesting M, Wehrhan F. Differences in Inflammation and Bone Resorption between Apical Granulomas, Radicular Cysts, and Dentigerous Cysts. *J Endod*. 2019;45:1200–8.
185. Duka M, Eraković M, Dolićanin Z, Stefanović D, Čolić M. Production of soluble receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand and osteoprotegerin by apical periodontitis cells in culture and their modulation by cytokines. *Mediators Inflamm*. 2019;2019.
186. AlShwaimi E, Purcell P, Kawai T, Sasaki H, Oukka M, Campos-Neto A, Stashenko P. Regulatory T Cells in Mouse Periapical Lesions. *J Endod* [Internet]. 2009;35:1229–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.006>
187. Colić M, Gazivoda D, Vučević D, Majstorović I, Vasilijić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res*. 2009;88:997–1002.
188. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res*. 2002;4:S227–32.
189. Yang S, Madyastha P, Ries W, Key LL. Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: Effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation. *J Cell Biochem*. 2002;84:645–54.
190. Fouad AF. IL-1 α and TNF- α expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res*. 1997;76:1548–54.
191. Graves DT, Li J, Cochran DL. Critical review in oral biology & medicine: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*. 2011;90:143–53.
192. Rai B, Kaur J, Jain R, Anand SC. Levels of gingival crevicular metalloproteinases-8 and -9 in periodontitis. *Saudi Dent J* [Internet]. 2010;22:129–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2010.04.006>
193. Schett G, Dayer JM, Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease.

- Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2016;12:14–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166>
194. Nakamura I, Jimi E. Regulation of Osteoclast Differentiation and Function by Interleukin-1. *Vitam Horm.* 2006;74:357–70.
 195. Popovska L, Dimova C, Evrosimoska B, Stojanovska V, Muratovska I, Cetenović B, Marković D. Relationship between IL-1 β production and endodontic status of human periapical lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2017;74:1134–9.
 196. Beklen A, Ainola M, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are Regulated by IL-17 in Periodontitis. *J Dent Res.* 2007;(4):347–51.
 197. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 2008;180:5771–7.
 198. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3:0–15.
 199. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med.* 2010;39:690–6.
 200. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJM, O'Shea JJ, Hunter CA. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8:1363–71.
 201. Freire MS, Oliveira NG, Lima SMF, Porto WF, Martins DCM, Silva ON, Chaves SB, Sousa M V., Ricart CAO, Castro MS, Fontes W, Franco OL, Rezende TMB. IL-4 absence triggers distinct pathways in apical periodontitis development. *J Proteomics.* 2021;233.
 202. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, Suda H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007;103:707–11.
 203. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3540–5.
 204. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood.* 2007;109:3839–48.
 205. Bilbao NJ, Sánchez CA, Gil-Antuñano PS. Bone metabolism regulation through RANK-RANKL-OPG system. *Revis / Rev Osteoporos Metab Min.* 2011;2:105–12.
 206. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001;79:243–53.
 207. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 2007;34:370–6.
 208. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF,

- Reynolds MA. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2013;39:1205–17.
209. Akram Z, Abduljabbar T, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Cytokine profile in chronic periodontitis patients with and without obesity: A systematic review and meta-analysis. *Dis Markers.* 2016;2016.
210. Kampits C, Montenegro MM, Ribeiro IWJ, Furtado M V., Polanczyk CA, Rösing CK, Haas AN. Periodontal disease and inflammatory blood cytokines in patients with stable coronary artery disease. *J Appl Oral Sci.* 2016;24:352–8.
211. Rosa EP, Murakami-Malaquias-da-Silva F, Palma-Cruz M, de Carvalho Garcia G, Brito AA, Andreo L, Kamei SK, Negreiros RM, Rodrigues MFDSSD, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK, Fernandes KPS, Ligeiro-de-Oliveira AP, Lino-Dos-Santos-Franco A, Horliana ACRT. The impact of periodontitis in the course of chronic obstructive pulmonary disease: Pulmonary and systemic effects. *Life Sci [Internet].* 2020;261:118257. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118257>
212. Sochocka M, Sobczyński M, Sender-Janeczek A, Zwolińska K, Błachowicz O, Tomczyk T, Ziętek M, Leszek J. Association between Periodontal Health Status and Cognitive Abilitie s. The Role of Cytokine Profile and Systemic Inflammation. *Curr Alzheimer Res.* 2017;14:978–90.
213. Li X, Kollteveitt KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic disease caused by oral infection. *Clinical Microbiologi reviews. Clin Med Res.* 2000;13:547–58.
214. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 2010;89:1241–6.
215. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J. Matrix Metalloproteinase-13 Is Highly Expressed in Destructive Periodontal Disease Activity. *J Periodontol.* 2006;77:1863–70.
216. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:509–19.
217. Kook SH, Lee D, Cho ES, Heo JS, Poudel SB, Ahn YH, Hwang JW, Ji H, Kim JG, Lee JC. Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling inhibits H₂O₂-induced decreases in proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2016;411:83–94.
218. Hama S, Takeichi O, Hayashi M, Komiyama K, Ito K. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J.* 2006;39:179–84.
219. Inchingolo F, Marrelli M, Annibali S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, Palladino A, Inchingolo AM, Gargari M, Tatullo M. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *Int J Med Sci.* 2013;11:1–6.
220. Shetty P, Kumari S. Serum total anti-oxidants, Super Oxide Dismutase (SOD), myeloperoxidase and vitamin C levels in periapical inflammation- A original study. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2012;3:934–9.
221. Marton IJ, Balla G, Hegedus C, Redl P, Szilagyi Z, Karmazsin L, Kiss C. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:254–7.

222. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3071–6.
223. Acquier AB, De Couto Pita AK, Busch L, Sánchez GA. Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep*. 2017;22:119–26.
224. Blagojević V, Kovačević-Jovanović V, Ćuruvija I, Petrović R, Vujnović I, Vujić V, Stanojević S. Rat strain differences in peritoneal immune cell response to selected gut microbiota: A crossroad between tolerance and autoimmunity? *Life Sci*. 2018;197:147–57.
225. Vasilev S, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic LJ. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between dark agouti and albino oxford rats. *Vet Parasitol*. 2009;159:229–31.
226. Stanisavljević S, Lukić J, Soković S, Mihajlovic S, Stojković MM, Miljković D, Golić N. Correlation of gut microbiota composition with resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Front Microbiol*. 2016;7:1–12.
227. Mirkov I, El-Muzghi AAM, Djokic J, Ninkov M, Popov Aleksandrov A, Glamoclija J, Kataranovski M. Pulmonary immune responses to *aspergillus fumigatus* in rats. *Biomed Environ Sci [Internet]*. 2014;27:684–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.3967/bes2014.104>
228. Lukic ML, Mensah-Brown E, Galadari S, Shahin A. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Dev Immunol*. 2001;8:193–200.
229. Popov A, Mirkov I, Miljković D, Belij S, Zolotarevski L, Kataranovski D, Kataranovski M. Contact allergic response to dinitrochlorobenzene (dncb) in rats: Insight from sensitization phase. *Immunobiology*. 2011;216:763–70.
230. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Chemokine Receptor 5, but not Interleukin-4, Attenuate the Development of Periapical Lesions. *J Endod*. 2008;34:31–8.

БИОГРАФИЈА

Др Сузана Живановић рођена је 15. августа 1991. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу “Живко Томић” завршила је у Доњој Шаторњи, Топола. Средњу Медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу завршила је 2010. године. Школске 2010/2011. године уписала је Интегрисане академске студије стоматологије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, које је завршила 2015. године са просечном оценом 9,50. Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2015/2016. године, изборно подручје Матичне ћелије у биомедицинским наукама. Специјалистичке студије из здравствене области Болести зуба и ендодонција уписала је 2017. године и завршила 2021. године чиме је стекла звање специјалиста Болести зуба и ендодонције.

Више пута је награђивана за једног од најбољих студента на Интегрисаним академским студијама стоматологије, Факултета медицинских наука. Добитница признања за допринос развоју Општине Топола за 2015. годину. Била је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије „ДОСИТЕЈА“, Министарства омладине и спорта Републике Србије, као и стипендиста докторских академских студија, Министарства просвете и технолошког развоја.

Радно искуство

2015/16. - фацилитатор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

2016/17. - фацилитатор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

2016/17. - сарадник у настави за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

2017/18. - сарадник у настави за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

2019/20. - истраживач приправник за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Од 2021. године - асистент за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

БИБЛИОГРАФИЈА

Zivanovic S, Papic M, Vucicevic T, Miletic Kovacevic M, Jovicic N, Nikolic N, Milasin J, Paunovic V, Trajkovic V, Mitrovic S, Lukic ML, Lukic A, Ljubic B. Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity. *International Endodontic Journal*. 2021. [Epub ahead of print] doi.org/10.1111/iej.13638 **M21 IF (2020) = 5,264**

Misic A, **Zivanovic S**, Radovic M, Papic M, Popovic M. Unusual anatomy of permanent maxillary and mandibular molars: Case reports. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*. 2019;147(7–8):475–478. **M23 IF(2019)= 0,142**

Popovic M, **Zivanovic S**, Vucicevic T, Grujovic M, Papic M. Cone-beam computed tomography study of tooth root and canal morphology of permanent molars in a Serbian population. *Vojnosanitetski pregled*. 2020;77(5):470-478. **M23 IF(2020)= 0,168**

Zivanovic S, Papic M, Radovic M, Misic A, Zivic M, Popovic M. Prevalence of c-shaped second mandibular molar canals in the population of central Serbia: A cone-beam computed tomography study. *Vojnosanitetski Pregled*. 2021;78(1):9-15. **M23 IF(2020)= 0,168**

Milošević M, **Živanović S**, Janković S. Translation to Serbian and transcultural adaptation of the Oral health related quality of life (ohqol-uk[w]) Instrument. *Vojnosanitetski pregled*. 2019; DOI:10.2298/VSP161212052M **M23 IF(2019)= 0,152**

Papic M, Papic M, **Zivanovic S**, Vuletic M, Zdravkovic D, Misic A, Miletic Kovacevic M, Popovic M. The prevalence of oval-shaped root canals: A morphometric study using cone-beam computed tomography and image analysis software. *Australian Endodontic Journal*. 2021. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/aej.12554 **M23 IF(2020)= 2,238**

Popović M, Papić M, **Živanović S**, Acović A, Lončarević S, Ristić V. Cone-beam computed tomography study of root canal morphology of mandibular anterior teeth in Serbian population. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018;19(1):27-34. **M51**

Popović M, Papić M, Acović A, **Živanović S**, Kanjevac T. Cone-beam computed tomography study of root number and root canal configuration of premolars in serbian population. *Medicinski Pregled*. 2018;LXXI(3-4):100-107. **M51**

Papic M, Papic M, Vuletic M, Zdravkovic D, Misic A, **Zivanovic S**. Complicated Root Canal Morphology of Permanent Mandibular Lateral Incisors is Associated with the Presence of a Second Mesio Buccal Canal in Permanent Maxillary First Molars. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2019; Online First. Doi: 10.2478/sjecr-2019-0048 **M51**

Nikolić S, **Živanović S**, Papić M, Janković Gazdić M, Stojković M, Ljujić B. Nanoplastics as a Potential Environmental Health Factor: From Molecular Interaction to Altered Cellular Function and Human Diseases. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2021; Online First. Doi: 10.2478/sjecr-2020-0049 **M51**

Vučičević T, **Živanović S**, Papić M, Lukić A. Bisphosphonates in Dentistry – State of the Art. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2021; Online First. Doi: 10.2478/sjecr-2020-0061 **M51**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сузана Живановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

"Утицај сојних разлика на патогенезу периапикалних лезија зуба у два соја пацова Dark Agouti и Albino Oxford"

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, _____ године,


_____ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сузана Живановић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Утицај сојних разлика на патогенезу периапикалних лезија зуба у два
соја пацова Dark Agouti и Albino Oxford"

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, _____ године,


_____ потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

ORIGINAL ARTICLE

Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity

Suzana Zivanovic¹ | Milos Papic¹ | Tamara Vucicevic¹ |
Marina Miletic Kovacevic² | Nemanja Jovicic² | Nadja Nikolic³ |
Jelena Milasin³ | Verica Paunovic⁴ | Vladimir Trajkovic⁴ |
Slobodanka Mitrovic⁵ | Miodrag L Lukic⁶ | Aleksandra Lukic¹ | Biljana Ljujic⁷

¹Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Biology and Human Genetics, School of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁴Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁵Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁶Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁷Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence

Biljana Ljujic, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.
Email: bljujic74@gmail.com

Funding information

This study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (project numbers: ON 175071 and ON 175103) and by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (project numbers: JP 25/19; JP 06/20 and JP 24/20).

Abstract

Aim: To investigate the influence of strain differences in immune responses on the pathogenesis of experimental periapical lesions in Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO) inbred strains of rats.

Methodology: Periapical lesions were induced in male DA and AO rats by pulp exposure of the first mandibular right molars to the oral environment. Animals were killed 21 days after pulp exposure. The mandibular jaws were retrieved and prepared for radiographic, pathohistological, immunohistochemical analysis, real-time PCR and flow cytometry. Blood samples and the supernatant of periapical lesions were collected for measurement of cytokines and oxidative stress marker levels. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis H and Mann–Whitney U non-parametric tests or parametric One-Way ANOVA and Independent Samples *T*-test to determine the differences between groups depending on the normality of the data. A significant difference was considered when *p* values were <.05.

Results: DA rats developed significantly larger (*p* < .05) periapical lesions compared to AO rats as confirmed by radiographic and pathohistological analysis. The immunohistochemical staining intensity for CD3 was significantly greater in periapical lesions of DA rats compared to AO rats (*p* < .05). In DA rats, periapical lesions had a significantly higher (*p* < .05) percentage of CD3+ cells compared to AO rats. Also, the percentage of INF- γ , IL-17 and IL-10 CD3+CD4+ cells was significantly higher in DA rats (*p* < .05). DA rats had a significantly higher Th17/Th10 ratio. RT-PCR expression of IL-1 β , INF- γ and IL-17 genes was significantly higher in periapical lesions of DA compared to AO rats (*p* < .05). The receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/osteoprotegerin ratio was higher in DA compared to AO rats with periapical lesions (*p* < .05). Systemic levels of TNF- α and IL-6 were significantly higher in DA compared to AO rats (*p* < .05). Levels of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances and reduced glutathione were significantly higher (*p* < .05) in the supernatant in the periapical lesions of DA rats.

Conclusion: After pulp exposure, DA rats developed much larger periapical lesions compared to AO rats. Genetically determined differences in immunopathology have

been demonstrated to be a significant element defining the severity of periapical lesions.

KEYWORDS

Albino Oxford rats, Dark Agouti rats, immune response, periapical lesion, strain differences

INTRODUCTION

Periapical lesions develop in response to chronic irritation of periapical tissue by microorganisms and their products, usually from an infected root canal, which ultimately results in periapical bone destruction (Cavalla et al., 2021; Silva et al., 2012).

Periapical lesions are a common finding in the human population but do not always have the same characteristics (Sasaki et al., 2016; Segura-Egea et al., 2015). They differ in the size of the lesion, cell composition, the presence of epithelium and the degree of angiogenesis (Berar et al., 2016; Love & Firth, 2009). Characteristics of periapical lesions may depend on the type of microorganisms and the duration of inflammation in the affected root canal, the frequency of re-infection, bone resorption and the host's immune response (Álvares et al., 2018; Colić et al., 2009; Čolić et al., 2007; Tani-Ishii et al., 1994). Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) ratio is significantly higher in acute compared to chronic periapical lesions and it is an indicator of the progression of the lesions and increased bone resorption (Belibasakis et al., 2013; Cavalla et al., 2021).

Genetic factors that may influence susceptibility to dental caries, pulpitis and development of periapical granulomas and periodontal inflammation are not fully understood (Nibali et al., 2017). Wu et al. (2021) reported ethnic disparities in dental caries among adolescents in China even after propensity score matching. In periodontal disease, genetic and epigenetic factors have been reported to determine susceptibility to inflammation in periodontal tissue, emphasizing the importance of immune homeostasis (Loos & Van Dyke, 2020). However, there is no evidence that inherent genetic factors influence the onset and propagation of periapical lesions (Morsani et al., 2011).

The model of periapical lesions (Wang & Stashenko, 1991) in rats offers an opportunity to analyse the potential genetically determined differences in the development of lesions. Inflammatory and autoimmune responses have been reported to differ in the two inbred strains of rats: Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO; Lukić et al., 1987; Markovic et al., 2009; Mensah-Brown et al., 2011). These differences and their cellular basis have been studied extensively in the model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalitis (EAE) and type one

diabetes (multiple low doses streptozotocin-induced diabetes; Markovic et al., 2009; Mensah-Brown et al., 2011; Mostarica-Stojković et al., 1982). AO rats are relatively resistant to these diseases, whereas DA rats are highly susceptible (Markovic et al., 2009).

These two rat strains also differ in the production of cytokines, composition and size of infiltrates by mononuclear cells in the target tissues, including the differences in the presence of proinflammatory T lymphocytes subsets and early colonization by macrophages, as shown in the model of EAE (Mensah-Brown et al., 2011).

It was postulated that genetic differences may affect the pathogenesis of periapical disease due to their possible roles in the modulation of local immune response and bone resorption in the lesions. Therefore, this study aimed to investigate the influence of strain differences in immune response on the pathogenesis of experimental periapical lesions in DA and AO inbred strains of rats. The hypothesis was that differences in immune response mediated by inflammatory T cells between two rat strains would lead to stronger inflammatory reactions of T cells and higher bone resorption in DA rats.

MATERIAL AND METHODS

The manuscript of this animal study has been written according to Preferred Reporting Items for Animal studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al., 2021; Figure 1).

Animals and induction of periapical lesions

Eight-week-old male DA ($n = 36$) and AO ($n = 36$) rats were obtained from the animal facilities of the Military Medical Academy (MMA, Belgrade, Serbia) and maintained in a vivarium of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, in a room with a 12-h daylight/darkness cycle and access to water and food *ad libitum*. The sample size was calculated based on the study of a similar design (Cintra et al., 2016). Using the program *G*Power version 3.1.9.7* (Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Dusseldorf, Germany) for the T-test conditions of two independent samples, alpha error 0.05, study strength 0.8 and the ratio of the number of experimental animals, a sample



*From: Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikotil SJ, Camilleri J, Silva RM, Dummer PM. PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *Int Endod J*. 2021 Jan 15. doi: 10.1111/iej.13477. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13477>

For further details visit: <http://pride-endodonticguidelines.org/priase/>

FIGURE 1 PRIASE 2021 flowchart

of 10 was calculated, for each group. All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (approval number 01-16176/3). All experimental procedures were in accordance with the European Union Directive

for the welfare of laboratory animals (2010/63/EU), the European Communities Council Directive (86/609/EEC), principles of Good Laboratory Practice, and PRIASE guidelines (Nagendrababu et al., 2021). Prior to the induction of periapical lesions, animals were anaesthetized

by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The first mandibular right molar pulps were exposed using a high-speed electric dental handpiece (W&H Dentalwerk). The pulp chambers were opened until the entrances to the root canals were visible and then the canals were explored with an endodontic instrument. Dental pulps were left exposed to the oral environment. To promote the development of periapical lesions, all animals received 10% glucose solution in drinking water for 14 days after pulp exposure. The non-exposed teeth (the left first mandibular molar of the same animal) served as controls. Throughout all experiments, the animals were observed by a certified veterinary technician and there were no differences in weight gain between control and treated animals and no alterations in behaviour were observed. The animals were killed by decapitation under anaesthesia after 21 days, and the mandibles were dissected and used for the various analyses as set-out below.

Radiographic analysis

The hemi-mandibles of 10 DA and 10 AO rats were separated and radiographed using an X-ray unit (Sirona Dental Systems). Custom-made equipment was used to position the jaws in the same angulation and distance from the sensor in order to achieve uniformity during radiography. Exposure time was set to 0.12 s (70 kVp, 7 mA). Images were processed and analysed using *ImageJ* software version 1.53 (National Institutes of Health) on a Philips 243V5LHSB monitor (Koninklijke Philips NV) at a resolution of 1920X1080 pixels in a room with dimmed lighting. The brightness and contrast of images were not altered during the analysis. All the images were calibrated using a scale of known length (21 mm endodontic instrument). The borders and size of the periapical lesions on the radiographic images were traced and calculated (square millimetres) as described by Saritekin et al. (2019). The radiolucent value of the region of interest (periapical lesions and healthy periapical tissue) was measured and calculated in pixels (Saritekin et al., 2019; Xiong et al., 2021). The tissue samples were further used for pathohistological and immunohistochemical analyses.

Pathohistological analysis

After the isolation and fixation in 4% paraformaldehyde for 24 h, the mandibles were decalcified in 3% formic acid and then embedded in paraffin (Velickovic et al., 2015). Tissue blocks were cut in 5 µm longitudinal serial sections and stained with haematoxylin and eosin (H&E). The sections were photographed with a digital camera mounted

TABLE 1 Primers used for qRT-PCR analysis

Gene	Sense and antisense
Rat IL-4 Primer Pair	F: TGCACCGAGATGTTTGTACC R: GGATGCTTTTTAGGCTTTCC
Rat IL-17 Primer Pair	F: CTACCTCAACCGTTCCACT R: TTCTCAGGCTCCCTCTTC
Rat TNF-α Primer Pair	F: GTAGCCACGTCGTAGCAAA R: CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
Rat INF-γ Primer Pair	F: GCTAGATTCTGGTGACAGCTGGTG R: CACCAGCTGTACCAGAATCTAGC
Rat IL-1β Primer Pair	F: TGATGTTCCATTAGACAGC R: GAGGTGCTGATGTACCAGTT
Rat β-actin Primer Pair	F: ACGGTCAGGTCATCACTATCG R: GGCATAGAGGCTTTACGGATG
Rat RANKL Primer Pair	F: CACAGCGCTTCTCAGGAGTT R: GATGGTGAGGTGAGCAAACG
Rat OPG Primer Pair	F: ACAGTTTGCTGGGACCAAA R: TCACAGAGGTCAATGTCTTGGA

on a light microscope (BX51; Olympus), and the bone resorption area and neutrophil number were determined using the *ImageJ 1.53* software (Velickovic et al., 2015). The area of the periapical lesion was measured in the apical third of the root. The sizes of periapical lesion areas, in square millimetres, were averaged to obtain summary measures of bone resorption. The neutrophils infiltration was expressed as a number of cells per square millimetre of lesion area.

CD3 expression in periapical lesions

Immunohistochemical analyses were performed on paraffin-embedded sections for CD3+ expression in periapical tissue. Paraffin sections of the periapical lesion were incubated with primary rabbit anti-rat CD3 antibodies (Sigma-Aldrich), followed by visualization using specific horseradish peroxidase/3,3'-diaminobenzidine (HRP/DAB) detection IHC kit (Abcam). The evaluation of periapical tissues, stability and the score of cell staining were performed by two independent investigators in a blinded manner. A semi-quantitative analysis was conducted, and the staining was scored according to the intensity as follows: 0—the absence of staining; 1—slight staining; 2—medium staining and 3—marked staining (Saritekin et al., 2019).

Gene expression of inflammatory markers of inflammation

A real-time PCR was used to determine cytokine and bone resorption genes expression in periapical lesions of

DA and AO rats. The sequences of primers used for real-time PCR are given in Table 1. Periapical lesions were extracted from the dissected right mandible of 10 DA and 10 AO rats and left in a 1.5 ml tube (Eppendorf AG) containing RNAlater Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) at -80°C until homogenization. Periapical tissue (ligament) from the left hemimandible of the same animal was used for healthy control. Tissue samples were homogenized and total RNA was extracted in 1 ml of TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. From 1 μg of total RNA, complementary cDNA was synthesized using Thermo Scientific RevertAid and First Strand cDNA Synthesis kits (Thermo Fisher Scientific), in the presence of oligo(dT) primers according to the manufacturer's instructions. Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) was used to amplify the selected regions of genes, as well as β -actin used as a house-keeping gene for normalization as described by Jakovljevic et al. (2018). Relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The results were expressed as the mean value of duplicate for each sample, and the relative expression level of mRNA for each sample was presented as the ratio between the expression of the genes of interest and the expression of the house-keeping gene.

T cells subsets in periapical lesions

For the flow-cytometry, the first molars of 10 DA and 10 AO rats were extracted, and the periapical lesions were carefully scraped off the roots. The tissues were treated with collagenase type IV (1 mg/ml; Life Technologies) at 37°C for 60 min to obtain cell suspensions as described previously (Xiao et al., 2015). The isolated cells were washed three times with PBS, resuspended in 100 ml PBS and then stained with FITC Mouse Anti-Rat CD3 and APC Mouse Anti-Rat CD4 (BD Pharmingen) in the dark at room temperature for 20 min. For intracellular staining, cells were activated with 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA)/500 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) with Golgi Stop (BD Pharmingen) for 4 h (Velickovic et al., 2015). For intracellular cytokine staining, PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Rat IL-17 (Thermo Fisher Scientific), PE Mouse Anti-Rat IL-10 (BD Pharmingen) and Alexa Flour 488 Mouse Anti-Rat INF- γ (Abcam) were used according to manufacturer's instructions. Fluorescence-activated cell sorter analysis was achieved using BD FACSAriaTM III Cell Sorter (BD Biosciences), and the results were analysed with software (Flowing Software Version 2.5; Informer Technologies).

Serum cytokines levels

Blood samples were collected from 10 DA and 10 AO rats on day 21 of induction of periapical lesions and from strain, sex, and age-matched healthy controls (1 DA and 1 AO rat without periapical lesions). Cytokine levels were measured using a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent (ELISA DuoSet Rat) for TNF- α and IL-6 (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured on ZENYTH 3100 apparatus, at 450 nm, and obtained data were then processed by Software for Anthos Multimode Detectors (Anthos Labtec Instruments GmbH). The results were expressed in pg/ml (Stankovic et al., 2019). The same blood samples were used for the analysis of oxidative stress markers.

Oxidative stress markers in rats with periapical lesions

The concentration of prooxidative markers such as superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO^-) and the lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was evaluated in plasma samples. In the lysate of erythrocytes, the activity of non-enzymatic antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), and the activity of the enzymatic defence system were determined by evaluating the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) concentration (Radonjic et al., 2020). Periapical lesions from the roots of the first mandibular right molar of 5 DA and 5 AO rats were dissected. Each sample represented a pool of two periapical lesions to obtain an adequate amount of tissue. The samples were homogenized as described previously (Leite et al., 2010) for the dental pulps and the supernatant was then used for further analysis by standard spectrophotometric methods.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences v23.0 (SPSS Inc.). The Kruskal-Wallis H and Mann-Whitney *U* non-parametric tests or parametric One-Way ANOVA and Independent Samples *T*-test were used to determine the differences between groups depending on the normality of the data. Results are expressed as mean values and ranges (25 and 75 percentiles) or mean values \pm SE. The results were considered significantly different when $p < .05$. Figures were chosen in order to illustrate the results necessary to prove the study hypothesis and aims.

RESULTS

Periapical lesion size and neutrophils influx

Analysis of H&E-stained sections using light microscopy demonstrated differences of periapical lesions in DA and AO rats (Figure 2a). Inflammatory cell infiltration and alveolar bone resorption were more pronounced in periapical lesions of DA compared to AO rats (Figure 2a). The mean periapical lesion size of DA rats was significantly higher than in AO rats (1.19 (0.81–1.80) vs. 0.56 (0.30–0.84) mm², $p < .05$; Figure 2c). The differences in size of periapical lesions between all four groups (both experimental and control DA and AO rats) were significant ($p < .05$). Also, the number of neutrophils was higher in the DA rats compared to AO rats (76 ± 6.1 vs. 43 ± 4.2 cells per field, $p < .05$; Figure 2d).

Radiography of periapical lesions

Areas of periapical lesions in DA rats were significantly larger than in AO rats (1.25 (0.90–1.56) vs. 0.69 (0.42–0.72) mm²; $p < .05$; Figure 2b,e). The mean radiolucent values were significantly lower in the periapical lesions of DA and AO compared to DA and AO healthy periapical tissues which indicate higher bone resorption (43.93 (40.10–46.19) vs. 58.74 (51.81–60.19) pixels and 41.26 (38.50–44.23) vs. 54.61 (53.19–59.33) pixels; $p < .05$, respectively; Figure 2f). The differences between all four groups (both experimental and control DA and AO rats) were significant in size of periapical lesions and radiolucent values ($p < .05$).

Expression of CD3 marker in periapical lesions

CD3 positive cells were more frequently found in the periapical lesions of DA rats (Figure 3a left panel) compared to AO rats (Figure 3b left panel), whereas it was minimal in the control hemimandibles (Figure 3a right panel and Figure 3b left panel, respectively). The immunohistochemical staining intensity for CD3 was significantly higher in periapical lesions of DA rats compared to AO rats (2.5 ± 0.2 expression score vs. 1.6 ± 0.13 expression score, $p < .05$; Figure 3c).

Th1 Th17 and Tregs cells in periapical lesions

In DA rats, periapical lesions had a significantly higher percentage of CD3+ cells compared to AO rats (37.89 ± 2.89 vs. 23.87 ± 2.62% cells, $p < .05$; Figure 4a).

The percentage of CD3+CD4+INF- γ + was significantly higher in periapical lesions compared to healthy controls in both rat strains (19.80 ± 0.67 vs. 0.53 ± 0.02% cells and 7.82 ± 0.86 vs. 0.48 ± 0.17% cells, $p < .05$, respectively). Percentage of INF- γ in gated CD3+ CD4+ cells was significantly higher in periapical lesions of DA rats compared to AO rats (19.80 ± 0.67 vs. 7.82 ± 0.86% cells, $p < .05$; Figure 4b).

A significant difference in the percentage of CD3+CD4+IL-17+ cells was found between periapical lesions and healthy controls in both rat strains (17.90 ± 0.93 vs. 0.21 ± 0.01% cells and 8.89 ± 0.41 vs. 0.2 ± 0.02% cells, $p < .05$, respectively). The percentage of IL-17+ cells in the periapical lesions was significantly higher in DA rats compared to AO rats (17.90 ± 0.93 vs. 8.89 ± 0.41% cells; Figure 4c).

The percentage of gated CD4+ CD3+ cells expressing IL-10 was also higher in DA rats compared to AO rats with periapical lesions (17.05 ± 1.14 vs. 7.92 ± 0.23% cells, $p < .05$; Figure 4d). However, a higher IL-17/IL-10 ratio was calculated in DA compared to AO rats with periapical lesions (1.05 ± 0.37 vs. 0.894 ± 0.1, $p < .05$; Figure 4e).

Expression of genes related to the development of periapical lesion and alveolar bone resorption

Expression of IL-1 β , TNF- α and IL-17 genes was significantly higher in periapical lesions of DA compared to AO rats, calculated as 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} (IL-1 β 16.23 ± 3.36 vs. 4.15 ± 1.08, TNF- α 61.18 ± 38.51 vs. 4.02 ± 0.51 and IL-17 158.49 ± 51.91 vs. 25.98 ± 9.1, all $p < .05$; Figure 5a). There were no significant differences in expression of IL-4 and INF- γ genes between periapical lesions samples from DA and AO rats (Figure 5b).

Expression of RANKL was statistically higher in periapical lesions of DA rats compared to AO rats (5.35 ± 1.15 vs. 2.94 ± 1.70, $p < .05$). In addition, DA rats with periapical lesions have significantly lower expression of the OPG gene compared to AO rats (0.004 ± 0.001 vs. 0.007 ± 0.001, $p < .05$; Figure 5c). The expression ratio between RANKL and OPG was calculated in both rat strains. There was a significantly higher RANKL/OPG ratio in DA rats with periapical lesions compared to AO rats (2169.06 ± 472.87 vs. 571.19 ± 205.72, $p < .05$; Figure 5c).

Serum level of IL-6 and TNF- α

Whether strain differences influence the systemic production of proinflammatory cytokines, in rats with periapical lesions was evaluated. TNF- α and IL-6 levels were significantly

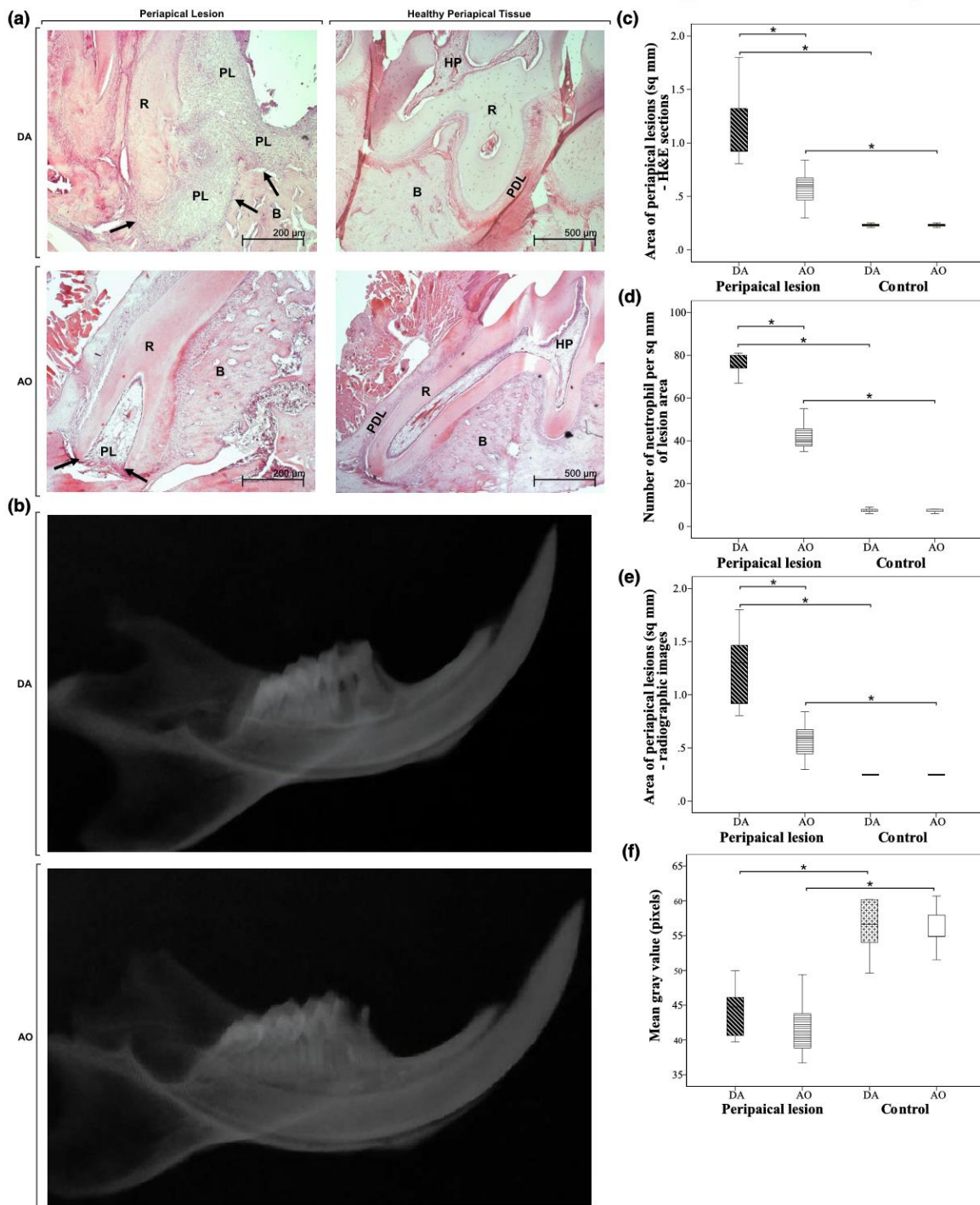


FIGURE 2 Size of periapical lesions and neutrophile count. (a) Periapical lesions in DA and AO rats (arrows, PL-periapical lesion, R-root, B-bone; left panel; H&E staining). Healthy periapical tissue of DA and AO rats (PDL-periodontal ligament, R-root, B-bone, HP-healthy pulp; right panel; H&E staining). (b) Radiographic images of hemimandible showing a radiolucent area in the periapical region in DA and AO rats. (c) Areas of periapical lesions of rats in H&E staining sections ($*p < .05$). (d) The number of neutrophils in square millimetres' in periapical lesions of rats ($*p < .05$). (e) Areas of periapical lesions of rats in radiographic images ($*p < .05$). (f) Pixel values in hemimandible of healthy periodontal ligament DA and AO rats ($*p < .05$). All analyses were performed in *ImageJ 1.53* program. Values for areas of periapical lesions and pixel values are presented as means and range (25th–75th) percentiles or absolute numbers with calculated percentage (Mann–Whitney *U* and Kruskal–Wallis *H* tests). Results for the count of neutrophils are shown as mean \pm SE (Independent Samples *T*-test) of 9–10 animals per group. *Significant difference ($p < .05$)

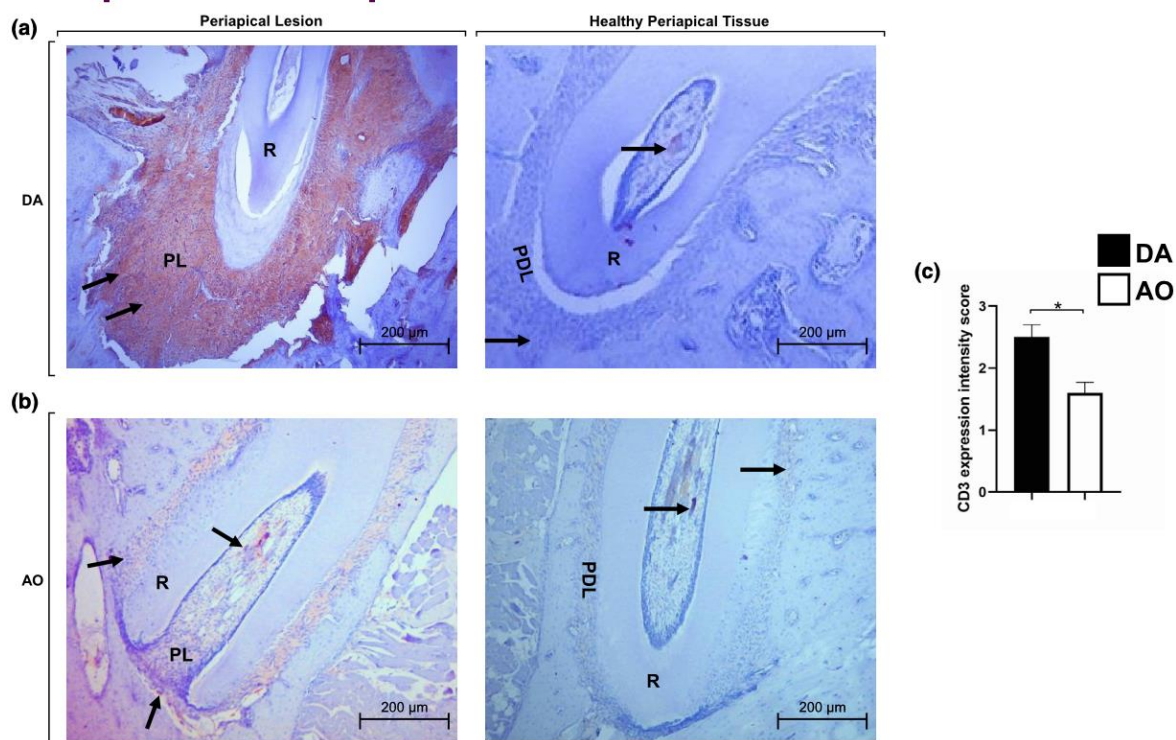


FIGURE 3 Expression of CD3 in periapical lesions in DA and AO rats. (a) CD3 expression in the periapical lesions of DA rats (left panel) and CD3 expression in the healthy periapical tissue of DA rats (right panel). (b) CD3 expression in the periapical lesions of AO rats (left panel) and CD3 expression in the healthy periapical tissue of AO rats (right panel). (c) CD3-expressing cells were significantly higher in DA rats with periapical lesions ($*p < .05$). Results are shown as mean \pm SE of 9–10 animals per group. *Independent Samples *T*-test, significant difference ($p < .05$)

higher in DA compared to AO rats (446.33 ± 27.45 vs. 275.05 ± 39.15 pg/ml and 828.27 ± 102.69 vs. 369.75 ± 69.95 pg/ml, $p < .05$, respectively; Figure 6a).

Parameters of oxidative stress in plasma and periapical lesions

The concentration of prooxidative and antioxidative parameters in periapical tissues and the systemic circulation was measured. A significantly higher level of H_2O_2 in systemic circulation was found in DA rats with periapical lesions compared to AO rats (2.96 ± 0.07 vs. 2.61 ± 0.12 nmol/ml, $p < .05$; Figure 6b). However, a significantly higher level of NO in systemic circulation was found in AO with periapical lesions compared to healthy control (3.16 ± 0.31 vs. 2.96 ± 0.13 nmol/ml, $p < .05$; Figure 6b), whereas in DA rats there were no significant differences between rats with periapical lesions and healthy control (3.23 ± 0.19 vs. 3.26 ± 0.11 nmol/ml, $p > .05$; Figure 6b).

In the systemic circulation, there were no significant differences in the levels of GSH between DA and AO rats ($p > .05$; Figure 6c). A significantly lower level of GSH was found in periapical tissues of healthy

control DA rats compared to AO rats ($10\,706.33 \pm 0.001$ vs. $17\,763.86 \pm 0.001$ nmol/ml, $p < .05$). Also, significant differences between periapical lesions and healthy controls were detected in both DA and AO rats ($12\,850.70 \pm 1061.96$ vs. $10\,706.33 \pm 0.001$ nmol/ml, and 9938.16 ± 199.11 vs. $17\,763.86 \pm 0.001$ nmol/ml, $p < .05$, respectively; Figure 6c). GSH level was significantly higher in periapical lesions of DA compared to AO rats ($12\,850.70 \pm 1061.96$ vs. 9938.16 ± 199.11 nmol/ml, $p < .05$; Figure 6c).

In the level of TBARS, there were no significant differences between DA and AO rats in the systemic circulation ($p > .05$; Figure 6d). However, the level of TBARS in periapical lesions was significantly higher in DA compared to AO rats (0.95 ± 0.02 vs. 0.90 ± 0.002 nmol/ml, $p < .05$; Figure 6d).

There were no significant differences in the measured level of SOD, CAT and O₂ (data not shown).

DISCUSSION

This is the first study to compare the characteristics of inflammatory responses in periapical lesions in two inbred rat strains. Periapical lesions were evaluated with Th2

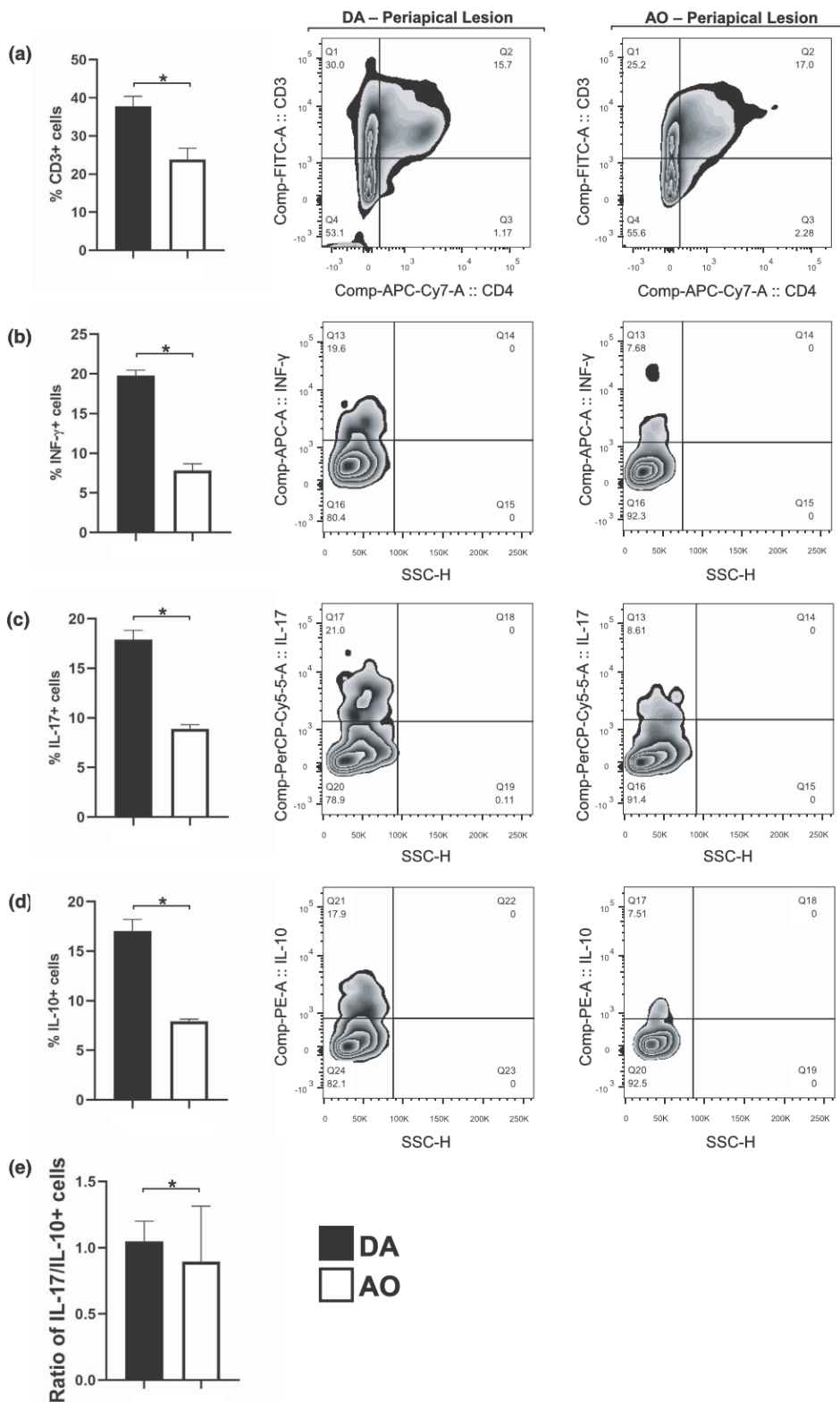


FIGURE 4 Phenotypic analysis of immune cells in periapical lesions DA and AO rats. (a) The percentage of CD3+ cells in DA and AO rats ($*p < .05$). The percentage of (b) CD3+CD4+INF γ +, (c) CD3+CD4+IL-17+ and (d) CD3+CD4+IL-10 producing cells was higher in periapical lesions of DA compared to AO rats ($*p < .05$). (e) Ratio of IL-17/IL-10 producing cells in periapical lesions of DA and AO rats ($*p < .05$). Flow cytometric analysis. Results are shown as mean \pm SE of 9–10 animals per group. *Independent Samples T-test, significant difference ($p < .05$)

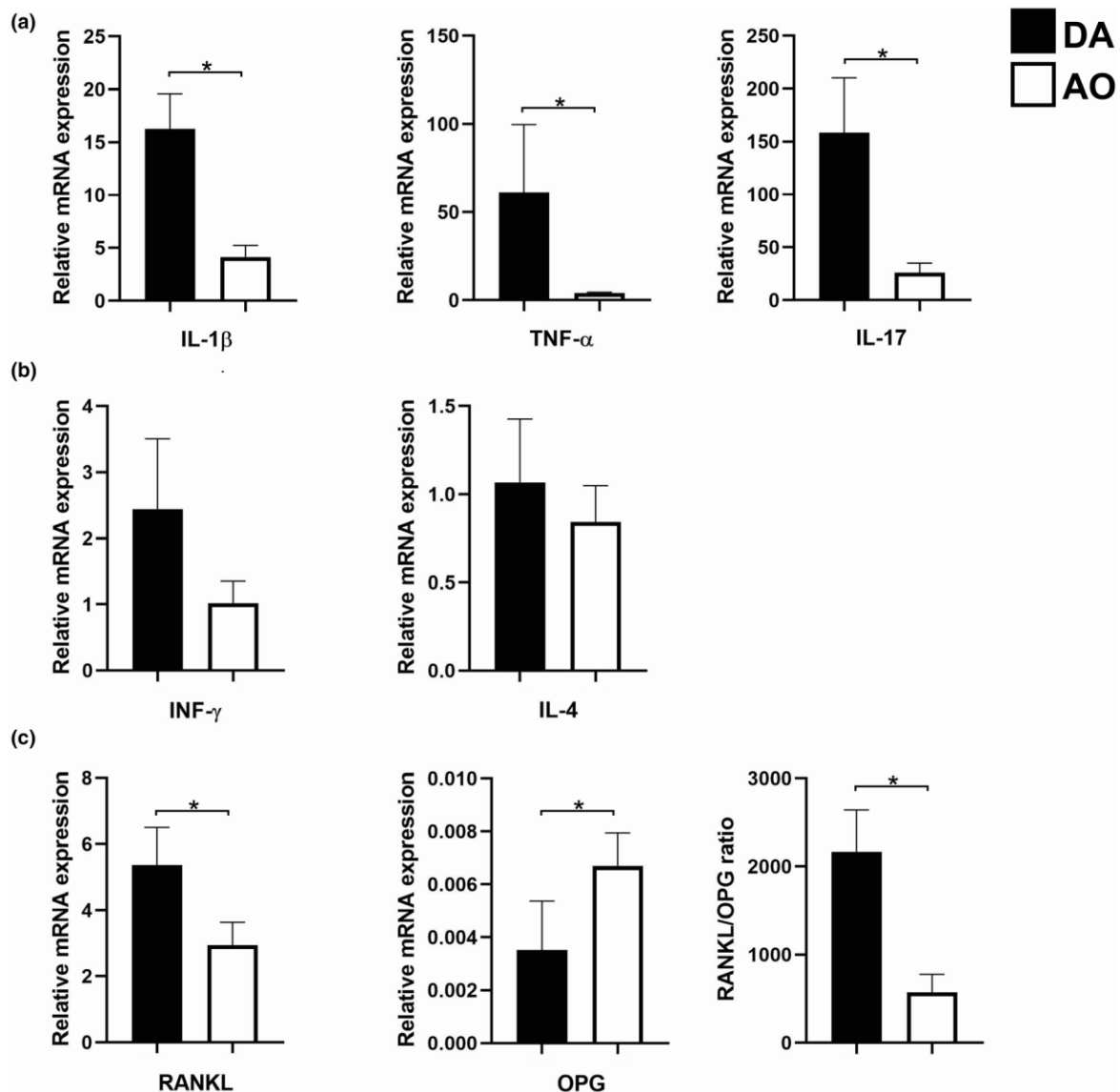


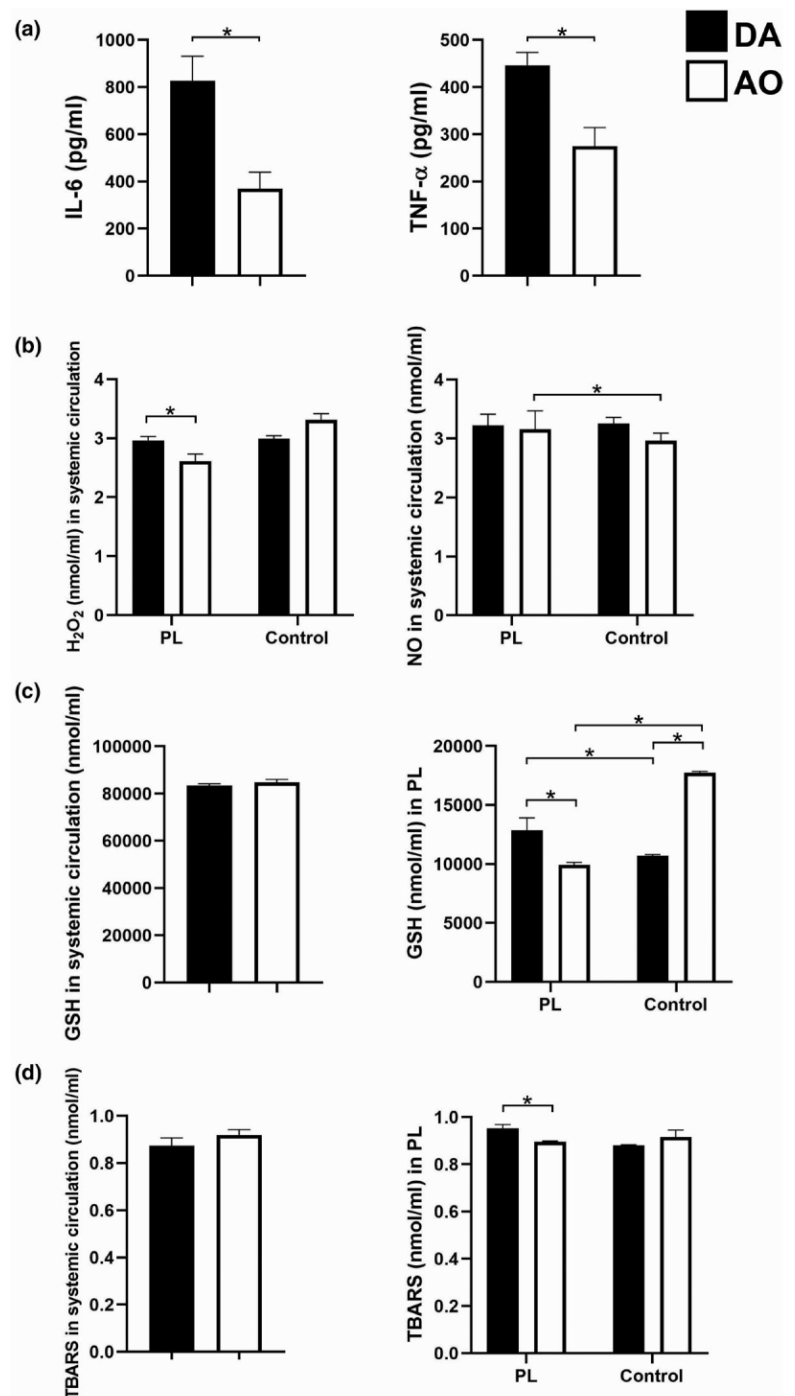
FIGURE 5 Cytokine genes expression in periapical lesions in DA and AO rats. (a) Statistically significant higher expression of IL-1 β , TNF- α and IL-17 cytokines in periapical lesions of DA compared to AO rats ($*p < .05$). (b) Expression of INF- γ and IL-4 in DA and AO rats ($p > .05$). (c) Expression of RANKL and OPG in periapical lesions of DA and AO rats ($*p < .05$) and RANKL/OPG ratio in DA and AO rats ($*p < .05$). Results are shown as mean \pm SE of 9–10 animals per group. * Independent Samples *T*-test, significant difference ($p < .05$)

dominant AO rats developing less inflammatory disease and smaller periapical lesions than DA rats (Figure 2b,e). Morphometric analysis revealed a significant difference in cell infiltration and consequently alveolar bone resorption in DA rats compared to AO rats (Figure 2a,b). These findings strongly correlated with the percentage of proinflammatory INF- γ producing Th1 cells and proinflammatory IL-17 producing Th17 cells. Percentages of the subsets of both cells were significantly higher in DA rats. Previous studies examined and compared periapical lesion formation and their dimensions by digital radiography (Metzger et al., 2002; Sartekin et al., 2019). The radiographic investigation in the present study revealed larger periapical lesions in DA rats compared to AO rats (Figure 2e).

Regulatory molecules such as cytokines play a key role in the pathogenesis of periodontal and periapical lesions (Garlet, 2010; Graves et al., 2011). It is known that the production of some cytokines differs between DA and AO rats (Lukić et al., 1987).

Differences in lesions size correlated with cellular makeup of monocular infiltrates. Previous analyses (Čolić et al., 2009) suggested that both INF- γ producing Th1 cells and IL-4 producing Th2 cells have a role in progression of the periapical lesion. In general, proinflammatory cytokines like TNF- α and INF- γ are expressed by many host cells type and promote inflammation. Percentages of cell producing all these cytokines are higher in the DA lesions (Figure 5) as well as in the serum (Figure 6). It have been

FIGURE 6 IL-6, TNF- α and parameters of oxidative stress (a) Serum level of proinflammatory IL-6 and TNF- α cytokines (measured by ELISA; $*p < .05$). (b) Level of H₂O₂ in systemic circulation in DA and AO rats with periapical lesions compared to healthy controls (left graphic) and level of NO in the systemic circulation in DA and AO rats with periapical lesions compared to healthy controls (right graphic; $*p < .05$). (c) Level of GSH in systemic circulation of DA and AO rats with periapical lesions (left graphic; $p > .05$) and GSH level in periapical lesions and healthy controls in both rat strains (right graphic; $*p < .05$). (d) Level of TBARS in the systemic circulation of DA and AO rats with periapical lesions (left graphic; $p > .05$) and level of TBARS in periapical lesions of DA and AO rats (right graphic; $*p < .05$). (PL- periapical lesion). The results are shown as the means \pm SE of 5–6 animals per group. *One-Way ANOVA test was used between all four groups, and Independent Samples *T*-test for analysis in two groups of interest, significant difference ($p < .05$)



argued that cytokines produced by Th2 cells and regulatory cells, IL-4 and IL-10 promote the healing process (de Brito et al., 2012). Acting synergistically as proinflammatory cytokines, IFN- γ and IL-17 produced by T lymphocytes, TNF- α and IL-1 β produced by macrophages, upregulate the expression of RANKL, causing bone resorption and subsequent development of periapical lesion (Sato et al., 2006).

The expression of cytokine by RT PCR was also tested. Expression of INF- γ and IL-4 cytokines did not differ significantly between DA and AO rats (Figure 5b). However,

the expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-17 were significantly higher in periapical lesions of DA compared to AO rats (Figure 5a). These findings of increased expression of TNF- α and IL-17 in periapical lesions of DA rats are in line with higher production of Th1 and Th17 cytokines in DA after induction of EAE (Markovic et al., 2009). Oseko et al. (2009) reported that IL-17^{-/-} mice have significantly reduced bone resorption, indicating the importance of IL-17 in the development of periapical lesions. Araujo-Pires et al. (2014) reported involvement of proinflammatory Th1/Th17 cytokines in the development of periapical lesions. Also,

TNF- α has a key role in periapical pathology as a potent bone resorption-stimulating mediator (Brekalo Pršo et al., 2007). It was shown that TNF- α and IL-1 β increase RANKL expression involved in consequent bone loss (Kitaura et al., 2020; Marahleh et al., 2019; Taira et al., 2019). Indeed, expression of RANKL and OPG in periapical lesions determines osteoclast formation and lesion expansion is dependent on the RANKL/OPG ratio (Kawashima et al., 2007). In addition, markers of inflammation determine the stable or progressive nature of periapical lesions by modulating the RANKL/OPG balance (Araujo-Pires et al., 2014; Garlet, 2010). Therefore, the expressions of RANKL and OPG in periapical lesions and healthy periapical tissues were examined. The results demonstrated that bone resorption was significantly greater in DA compared to AO rats (Figure 5c) which correlated with higher expression of OPG and RANKL genes (Figure 5c). Periapical lesions in the present study had higher expression of RANKL over OPG in DA compared to AO rats (Figure 4c). These results are in agreement with studies in humans, in which the RANKL/OPG balance might be associated with active or inactive periapical lesions (Menezes et al., 2008).

The results presented in Figure 2c reveal a significantly larger number of neutrophils in DA rats compared to AO rats, which might be the signal of healing of lesions in AO rats and progression of lesions in DA rats. Čolić et al. (2006) reported a significantly larger number of neutrophils in symptomatic chronic lesions, indicating an exacerbation of the inflammatory process.

IL-17 is considered to have a role in the exacerbation of inflammation within periapical lesions (Čolić et al., 2007), suggesting a possible role of this cytokine in disease severity (Čolić et al., 2009). The relationship between the production of IFN- γ and IL-17 in cell cultures derived from symptomatic lesions correlated positively, suggesting that both cytokines are important for the exacerbation of inflammation within periapical lesions (Čolić et al., 2009). DA rats had a higher percentage both of CD3+CD4+INF- γ + and CD3+CD4+IL-17+ producing cells compared to AO rats. Unexpectedly, DA rats had a greater percentage of CD3+CD4+IL-10+ cells. This finding can be explained with the results of a study that reported that when the production of IFN- γ was activated, downregulatory inflammatory mechanisms, mediated by IL-10, were also activated (Colic et al., 2010). However, the IL-17/IL-10 ratio was higher in DA rats (Figure 4e).

Increased serum levels of proinflammatory cytokines in rats with periodontitis have been reported to affect systemic health (Andrukhov et al., 2013; Berlin-Broner et al., 2020; Cintra et al., 2016). The present study aimed to determine the influence of periapical lesions on the systemic levels of inflammatory mediators. In the present study, higher serum levels of TNF- α and IL-6 were observed in

DA compared to AO rats (Figure 6). Similarly, a previous study reported that serum levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and IL-23 were significantly higher in rats with apical periodontitis (Cintra et al., 2016).

The close relationship between inflammation and oxidative stress, in the pathogenesis of periapical lesions, has been reported (Hernández-Ríos et al., 2017). Parameters of oxidative stress are altered in systemic circulation as well as in the periapical tissues of rats with apical periodontitis (Cintra et al., 2016). The present results reveal a significantly increased level of prooxidant hydrogen peroxide (H₂O₂) in the systemic circulation of DA rats compared to AO rats with periapical lesions, but there were no differences in other parameters of oxidative stress: superoxide anion radical (O₂⁻), nitric oxide (NO⁻), reduced glutathione (GSH) and the activity of the enzymatic defence system by evaluating the catalase (CAT) and SOD. A significantly higher level of NO and H₂O₂ in the circulation of AO rats with periapical lesions compared to healthy controls, whereas in DA rats there was no such increase determined. This appears to be in agreement with findings by Cintra et al. (2016) that NO is decreased in apical periodontitis.

Prooxidants in periapical tissue might be responsible for tissue damage and bone resorption (Hernández-Ríos et al., 2017). Interestingly, an increased level of antioxidant GSH was observed in periapical lesions of DA rats compared to AO (Figure 6c). A previous study demonstrated that subtle changes in GSH levels may have a profound impact on the immune response and its depletion leads to a transition from the Th1 immune response to Th2, which was in alignment with a lower level of GSH in AO rats (Peterson et al., 1998).

However, the characteristics of periapical lesions and potential role of immune mediators have been extensively studied in humans (Čolić et al., 2006, 2007, 2009; Duka et al., 2019; Lukić et al., 2006). The animal model used in the present study offers the opportunity to study potential genetic factors which may be responsible for individual differences in the development of the lesions in the periapex.

CONCLUSIONS

Taken together, data presented in this study revealed the importance of genetic strain differences in the response of immunocompetent rats to the induction of experimental periapical lesions. The knowledge of such genetically based differences might contribute to the understanding of variations in mechanisms that promote inflammation and the progression of periapical lesions. Periapical lesions were much greater in DA compared to AO rats as a consequence of Th1/Th17-dominant immune response

and the associated increase of prooxidative and bone resorption mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. Vladimir Jakovljevic and his team from the Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia for all the help during the experiment procedures and Ivica Petrovic (Department of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia) for technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SZ, MLL, AL, and BLJ conceived and designed the experiments. SZ, MP, TV, MMK, NJ, NN, JM, VP, VT, SM, and BLJ performed the experiments. MLL, AL, BLJ, and SZ analyzed the data. MP prepared the figures. SZ wrote the manuscript. MLL and BLJ provided the expert comments and edited the manuscript. All the authors contributed to the manuscript revision and read and approved the submitted version, which was completed by BLJ.

ETHICAL APPROVAL

This study received approval from animal welfare committee. Animals were handled according to the national guidelines for animals.

ORCID

Suzana Zivanovic  <https://orcid.org/0000-0002-8930-7775>

Milos Papic  <https://orcid.org/0000-0001-7970-4892>

Tamara Vucicevic  <https://orcid.org/0000-0002-1082-8114>

Marina Miletic Kovacevic  <https://orcid.org/0000-0002-5177-1521>

Nemanja Jovicic  <https://orcid.org/0000-0003-1697-8380>


Nadja Nikolic  <https://orcid.org/0000-0002-8513-9313>

Jelena Milasin  <https://orcid.org/0000-0002-6225-7210>

Verica Paunovic  <https://orcid.org/0000-0002-4912-7761>

Vladimir Trajkovic  <https://orcid.org/0000-0002-8061-2968>

Slobodanka Mitrovic  <https://orcid.org/0000-0003-2497-0557>

Miodrag L Lukic  <https://orcid.org/0000-0002-3563-632X>

Aleksandra Lukic  <https://orcid.org/0000-0001-6744-2856>

Biljana Ljujic  <https://orcid.org/0000-0002-6759-2720>

tumor necrosis factor alpha in periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 44, 1783–1787.

REFERENCES

Álvares, P.R., de Arruda, J.A.A., Oliveira Silva, L.V., da Silva, L.P., do Nascimento, G.J.F., da Silveira, M.M.F. et al. (2018) Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and

- Andruxhov, O., Haririan, H., Bertl, K., Rausch, W.-D., Bantleon, H.-P., Moritz, A. et al. (2013) Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 916–923.
- Araujo-pires, A.C., Francisconi, C.F., Bigueti, C.C., Cavalla, F., Aranha, A.M.F., Letra, A. et al. (2014) Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science*, 22, 336–346.
- Belibasakis, G.N., Rechenberg, D.K. & Zehnder, M. (2013) The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *International Endodontic Journal*, 46, 99–111.
- Berar, A.M., Bondor, C.I., Matroş, L. & Câmpian, R.S. (2016) Radiological, histological and immunohistochemical evaluation of periapical inflammatory lesions. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57, 419–425.
- Berlin-Broner, Y., Alexiou, M., Levin, L. & Febbraio, M. (2020) Characterization of a mouse model to study the relationship between apical periodontitis and atherosclerosis. *International Endodontic Journal*, 53, 812–823.
- Brekalo Pršo, I., Kocjan, W., Šimic, H., Brumini, G., Pezelj-Ribaric, S., Borcic, J. et al. (2007) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation*, 2007, 1–4.
- de Brito, L.C.N., Teles, F.R.F., Teles, R.P., Totola, A.H., Vieira, L.Q. & Sobrinho, A.P.R. (2012) T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 38, 481–485.
- Cavalla, F., Letra, A., Silva, R.M. & Garlet, G.P. (2021) Determinants of periodontal/periapical lesion stability and progression. *Journal of Dental Research*, 100, 29–36.
- Cintra, L.T.A., Samuel, R.O., Azuma, M.M., de Queiróz, A.O.S., Ervolino, E., Sumida, D.H. et al. (2016) Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *Journal of Endodontics*, 42, 747–751.
- Colić, M., Gazivoda, D., Majstorović, I., Dragicević, A., Vasilijić, S., Rudolf, R. et al. (2009) Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *Journal of Dental Research*, 88, 1142–1147.
- Čolić, M., Gazivoda, D., Vučević, D., Vasilijić, S., Rudolf, R. & Lukić, A. (2009) Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology*, 47, 101–113.
- Colic, M., Gazivoda, D., Vasilijic, S., Vucevic, D. & Lukic, A. (2010) Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 39, 690–696.
- Čolić, M., Lukić, A., Vučević, D., Milosavljević, P., Majstorović, I., Marjanović, M. et al. (2006) Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Archives of Oral Biology*, 51, 1120–1130.
- Čolić, M., Vasilijić, S., Gazivoda, D., Vučević, D., Marjanović, M. & Lukić, A. (2007) Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *European Journal of Oral Sciences*, 115, 315–320.

- Duka, M., Eraković, M., Dolićanin, Z., Stefanović, D. & Čolić, M. (2019) Production of soluble receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand and osteoprotegerin by apical periodontitis cells in culture and their modulation by cytokines. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1–11.
- Garlet, G.P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89, 1349–1363.
- Graves, D.T., Oates, T. & Garlet, G.P. (2011) Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 3, 5304.
- Hernández-Ríos, P., Pussinen, P.J., Vernal, R. & Hernández, M. (2017) Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, 869.
- Jakovljevic, A., Andric, M., Nikolic, N., Coric, V., Krezovic, S., Carkic, J. et al. (2018) Levels of oxidative stress biomarkers and bone resorption regulators in apical periodontitis lesions infected by Epstein-Barr virus. *International Endodontic Journal*, 51, 593–604.
- Kawashima, N., Suzuki, N., Yang, G., Ohi, C., Okuhara, S., Nakano-Kawanishi, H. et al. (2007) Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 103, 707–711.
- Kitaura, H., Marahleh, A., Otori, F., Noguchi, T., Shen, W.-R., Qi, J. et al. (2020) Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5169.
- Leite, M.F., De Lima, A., Massuyama, M.M. & Otton, R. (2010) *In vivo* astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *International Endodontic Journal*, 43, 959–967.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402–408.
- Loos, B.G. & Van Dyke, T.E. (2020) The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 83, 26–39.
- Love, R.M. & Firth, N. (2009) Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. *International Endodontic Journal*, 42, 198–202.
- Lukic, A., Vasilijic, S., Majstorovic, I., Vucevic, D., Mojsilovic, S., Gazivoda, D. et al. (2006) Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *International Endodontic Journal*, 39, 626–636.
- Lukić, M., Mostarica-Stojković, M., Kostić, M., Tucić, N. & Vukmanović, S. (1987) Cellular and genetic basis of the strain differences in IL-2 production in rats. *Transplantation Proceedings*, 19, 3137–3139.
- Marahleh, A., Kitaura, H., Otori, F., Kishikawa, A., Ogawa, S., Shen, W.-R. et al. (2019) TNF- α directly enhances osteocyte RANKL expression and promotes osteoclast formation. *Frontiers in Immunology*, 10, 2925.
- Markovic, M., Miljkovic, D., Momcilovic, M., Popadic, D., Miljkovic, Z., Savic, E. et al. (2009) Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Molecular Immunology*, 47, 141–146.
- Menezes, R., Garlet, T.P., Letra, A., Bramante, C.M., Campanelli, A.P., Figueira, R.D.C. et al. (2008) 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. *Journal of Endodontics*, 34, 932–938.
- Mensah-Brown, E.P., Shahin, A., Al Shamisi, M. & Lukic, M.L. (2011) Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *Journal of Neuroimmunology*, 232, 68–74.
- Metzger, Z., Klein, H., Klein, A. & Tagger, M. (2002) Periapical lesion development in rats inhibited by dexamethasone. *Journal of Endodontics*, 28, 643–645.
- Morsani, J.M., Aminoshariae, A., Han, Y.W., Montagnese, T.A. & Mickel, A. (2011) Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 37, 455–459.
- Mostarica-Stojković, M., Petrović, M. & Lukić, M.L. (1982) Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clinical and Experimental Immunology*, 50, 311–317.
- Nagendrababu, V., Kishen, A., Murray, P.E., Nekoofar, M.H., Figueiredo, J.A.P., Priya, E. et al. (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal*, 54, 848–857.
- Nibali, L., Di Iorio, A., Tu, Y.-K. & Vieira, A.R. (2017) Host genetics role in the pathogenesis of periodontal disease and caries. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S52–S78.
- Oseko, F., Yamamoto, T., Akamatsu, Y., Kanamura, N., Iwakura, Y., Imanishi, J. et al. (2009) IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiology and Immunology*, 53, 287–294.
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K. & Waltenbaugh, C. (1998) Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3071–3076.
- Radonjic, T., Rankovic, M., Ravic, M., Zivkovic, V., Srejovic, I., Jeremic, J. et al. (2020) The effects of thiamine hydrochloride on cardiac function, redox status and morphometric alterations in doxorubicin-treated rats. *Cardiovascular Toxicology*, 20, 111–120.
- Sartekin, E., Üreyen Kaya, B., Aşçı, H. & Özmen, Ö. (2019) Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 52, 1466–1478.
- Sasaki, H., Hirai, K., Martins, C.M., Furusho, H., Battagliano, R. & Hashimoto, K. (2016) Interrelationship between periapical lesion and systemic metabolic disorders. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 2204–2215.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y. et al. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine*, 203, 2673–2682.
- Segura-Egea, J.J., Martín-González, J. & Castellanos-Cosano, L. (2015) Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *International Endodontic Journal*, 48, 933–951.
- Silva, M.J.B., Kajjiya, M., AlShwaimi, E., Sasaki, H., Hong, J., Ok, P. et al. (2012) Bacteria-reactive immune response may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss lesion. *Journal of Endodontics*, 38, 346–350.

- Stankovic, M., Ljujic, B., Babic, S., Maravic-Stojkovic, V., Mitrovic, S., Arsenijevic, N. et al. (2019) IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. *Cytokine*, 120, 242–250.
- Taira, T.M., Lima, V., Prado, D.S., Silva, T.A., Issa, J., da Silva, L. et al. (2019) NLRP12 attenuates inflammatory bone loss in experimental apical periodontitis. *Journal of Dental Research*, 98, 476–484.
- Tani-Ishii, N., Wang, C.-Y., Tanner, A. & Stashenko, P. (1994) Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 9, 129–135.
- Velickovic, M., Pejnovic, N., Mitrovic, S., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Kanjevac, T. et al. (2015) ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice. *Journal of Endodontics*, 41, 369–375.
- Wang, C.Y. & Stashenko, P. (1991) Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. *Journal of Dental Research*, 70, 1362–1366.
- Wu, S.C., Ma, X.X., Zhang, Z.Y., Lo, E., Wang, X., Wang, B. et al. (2021) Ethnic disparities in dental caries among adolescents in China. *Journal of Dental Research*, 100, 496–506.
- Xiao, L., Zhu, L., Yang, S., Lei, D., Xiao, Y. & Peng, B. (2015) Different correlation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and regulatory T cells in rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 41, 479–486.
- Xiong, B., Shirai, K., Matsumoto, K., Abiko, Y. & Furuichi, Y. (2021) The potential of a surface pre-reacted glass root canal dressing for treating apical periodontitis in rats. *International Endodontic Journal*, 54, 255–267.

How to cite this article: Zivanovic, S., Papic, M., Vucicevic, T., Miletic Kovacevic, M., Jovicic, N., Nikolic, N., et al. (2021) Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity. *International Endodontic Journal*, 00, 1–15. <https://doi.org/10.1111/iej.13638>