



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Николина Д. Кастратовић

**УТИЦАЈ ДУВАНСКОГ ДИМА КОНВЕНЦИОНАЛНИХ
ЦИГАРЕТА И АЕРОСОЛА ЕЛЕКТРОНСКИХ УРЕЂАЈА ЗА
ИСПОРУКУ НИКОТИНА НА РЕГЕНЕРАТИВНИ
ПОТЕНЦИЈАЛ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ
ЋЕЛИЈА И ИНФЛАМАЦИЈУ У ХРОНИЧНИМ
ИНФЛАМАЦИЈСКИМ БОЛЕСТИМА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2026. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Nikolina D. Kastratović

**UTICAJ DUVANSKOG DIMA KONVENCIONALNIH
CIGARETA I AEROSOLA ELEKTRONSKIH UREĐAJA ZA
ISPORUKU NIKOTINA NA REGENERATIVNI POTENCIJAL
MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA I INFLAMACIJU U
HRONIČNIM INFLAMACIJSKIM BOLESTIMA**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2026. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Nikolina D. Kastratović

**INFLUENCE OF TOBACCO SMOKE FROM
CONVENTIONAL CIGARETTES AND AEROSOLS FROM
ELECTRONIC NICOTINE DELIVERY DEVICES ON THE
REGENERATIVE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM
CELLS AND INFLAMMATION IN CHRONIC
INFLAMMATORY DISEASES**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2026.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Николина Д. Кастратовић
Датум и место рођења: 23.11.1995. године у Пећи
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Медицинска генетика на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Утицај дуванског дима конвенционалних цигарета и аеросола електронских уређаја за испоруку никотина на регенеративни потенцијал мезенхималних матичних ћелија и инфламацију у хроничним инфламацијским болестима
Број страница: 167
Број слика: 17 слика, 55 фигура и 4 табеле
Број библиографских података: 277
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: проф. др Владислав Воларевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Имунологија
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:
IV-03-5/13; 15.01.2026.

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Nikolina D. Kastratović
Datum i mesto rođenja: 23.11.1995. godine u Peći
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Medicinska genetika na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj duvanskog dima konvencionalnih cigareta i aerosola elektronskih uređaja za isporuku nikotina na regenerativni potencijal mezenhimalnih matičnih ćelija i inflamaciju u hroničnim inflamacijskim bolestima
Broj stranica: 167
Broj slika: 17 slika, 55 figura i 4 tabele
Broj bibliografskih podataka: 277
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Mentor: prof. dr Vladislav Volarević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu za užu naučnu oblast Imunologija
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:
IV-03-5/13; 15.01.2026.

Identification page of doctoral dissertation

Author
Name and surname: Nikolina D. Kastratović
Date and place of birth: 23.11.1995. in Peć
Current employment: Teaching assistant for the narrower scientific field of Medical Genetics at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral dissertation
Title: The influence of tobacco smoke from conventional cigarettes and aerosols from electronic nicotine delivery devices on the regenerative potential of mesenchymal stem cells and inflammation in chronic inflammatory diseases
Number of pages: 167
Number of images: 17 images, 55 figures and 4 tables
Number of bibliographic data: 277
Institution and place where the work was written: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific field (UDK): Medical Sciences
Mentor: Prof. Dr. Vladislav Volarević, full professor at the Faculty of Medicine, University of Niš for the narrower scientific field of Immunology
Number and date of the decision of the University Council on accepting the topic of the doctoral dissertation:
IV-03-5/13; 15.01.2026.

Хвала

Проф. др Владиславу Воларевићу, мом ментору, на посвећености, времену, поверењу и подрици на путу мог истраживачког и научног развоја.

Члановима Катедре за Генетику, који су ме охрабривали да напредујем и да се усавршавам.

Др Владимиру Марковићу на пријатељству и помоћи у превазилажењу препрека које су деловале непремостиво, као и за све прековремене радне сате и викенде посвећене изради дела експеримената ове докторске дисертације.

Мојим пријатељима, на бескрајној подрици и мотивацији.

Мојој породици - за безусловну љубави, разумевање, снагу и подрику да пронађем себе. Неизмерно сам им захвална што су били уз мене и нису ми дозволили да одустанем.

Хвала што сте веровали у мене!

САЖЕТАК

Дувански дим конвенционалних цигарета (енгл. *Combustible cigarettes*, CCs), настао сагоревањем дувана, садржи штетне конституенте попут катрана и угљен-моноксида, који узрокују интензиван оксидативни стрес, деструкцију ћелија и проинфламацијску активацију циркулишућих имунских ћелија. Насупрот томе, аеросоли електронских уређаја за испоруку никотина (енгл. *Electronic nicotine delivery system*, ENDS), услед елиминације процеса сагоревања, садрже ниже концентрације токсичних супстанци, што може резултирати ублаженим, али и даље детектабилним, штетним биолошким ефектима. Изложеност CCs нарушава регенеративни потенцијал матичних ћелија које имају кључну улогу у процесима регенерације оштећених ткива. На нивоу културе мезенхималних матичних ћелија из периодонталног лигамента (енгл. *Periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells*, PDL-MSCs), након CCs третмана, детектовано је смањење нивоа вијабилности и пролиферације, као и промена способности имуномодулације, односно оштећење њиховог регенеративног потенцијала. Дуготрајна конзумација CCs или ENDS-а значајно модулира секрецију цитокина у циркулишућим леукоцитима, чиме модификује системски инфламацијски одговор у хроничним инфламацијским болестима, попут хроничне опструктивне болести плућа и дијабетеса. Интензивирана инфламација, односно повећани нивои про-Th1 и про-Th17 цитокина, корелирали су са тежином клиничке слике болести. Међутим, проинфламацијски ефекат CCs није уочен у улцерозном колитису. Имуномодулаторни ефекти CCs су болест-специфични и не могу се генерализовати на све хроничне инфламацијске болести. У поређењу са CCs, ENDS су слабије подстицали стварање проинфламацијских цитокина у имунским ћелијама које су одговорне за прогресију хроничних инфламацијских болести.

Кључне речи: цигарете, електронски уређаји за испоруку никотина, инфламација, матичне ћелије

SAŽETAK

Duvanski dim konvencionalnih cigareta (engl. *Combustible cigarettes*, CCs), nastao sagorevanjem duvana, sadrži štetne konstituente poput katrana i ugljen-monoksida, koji uzrokuju intenzivan oksidativni stres, destrukciju ćelija i proinflamacijsku aktivaciju cirkulišućih imunskih ćelija. Nasuprot tome, aerosoli elektronskih uređaja za isporuku nikotina (engl. *Electronic nicotine delivery system*, ENDS), usled eliminacije procesa sagorevanja, sadrže niže koncentracije toksičnih supstanci, što može rezultirati ublaženim, ali i dalje detektabilnim, štetnim biološkim efektima. Izloženost CCs narušava regenerativni potencijal matičnih ćelija koje imaju ključnu ulogu u procesima regeneracije oštećenih tkiva. Na nivou kulture mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodontalnog ligamenta (engl. *Periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells*, PDL-MSCs), nakon CCs tretmana, detektovano je smanjenje nivoa vijabilnosti i proliferacije, kao i promena sposobnosti imunomodulacije, odnosno oštećenje njihovog regenerativnog potencijala. Dugotrajna konzumacija CCs ili ENDS-a značajno modulira sekreciju citokina u cirkulišućim leukocitima, čime modifikuje sistemski inflamacijski odgovor u hroničnim inflamacijskim bolestima, poput hronične opstruktivne bolesti pluća i dijabetesa. Intenzivirana inflamacija, odnosno povećani nivoi pro-Th1 i pro-Th17 citokina, korelirali su sa težinom kliničke slike bolesti. Međutim, proinflamacijski efekat CCs nije uočen u ulceroznom kolitisu. Imunomodulatorni efekti CCs su bolest-specifični i ne mogu se generalizovati na sve hronične inflamacijske bolesti. U poređenju sa CCs, ENDS su slabije podsticali stvaranje proinflamacijskih citokina u imunskim ćelijama koje su odgovorne za progresiju hroničnih inflamacijskih bolesti.

Ključne reči: cigarete, elektronski uređaji za isporuku nikotina, inflamacija, matične ćelije

ABSTRACT

Tobacco smoke from conventional cigarettes (CCs), produced by the combustion of tobacco, contains harmful constituents such as tar and carbon monoxide, which cause intense oxidative stress, cell destruction and pro-inflammatory activation of circulating immune cells. In contrast, aerosols from electronic nicotine delivery systems (ENDS), due to the elimination of the combustion process, contain lower concentrations of toxic substances, which may result in attenuated, but still detectable, harmful biological effects. Exposure to CCs impairs the regenerative potential of stem cells that play a key role in the regeneration of damaged tissues. At the level of culture of periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells (PDL-MSCs), after CCs treatment, a decrease in the level of viability and proliferation was detected, as well as a change in the ability of immunomodulation, i.e., impairment of their regenerative potential. Long-term consumption of CCs or ENDS significantly modulates the secretion of cytokines in circulating leukocytes, thereby modifying the systemic inflammatory response in chronic inflammatory diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease and diabetes. Intensified inflammation, i.e., increased levels of pro-Th1 and pro-Th17 cytokines, correlated with the severity of the clinical picture of the disease. However, the pro-inflammatory effect of CCs was not observed in ulcerative colitis. The immunomodulatory effects of CCs are disease-specific and cannot be generalized to all chronic inflammatory diseases. Compared with CCs, ENDS were less likely to induce the production of proinflammatory cytokines in immune cells that are responsible for the progression of chronic inflammatory diseases.

Keywords: cigarettes, electronic nicotine delivery systems, inflammation, stem cells

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. ДУВАН И НИКОТИН.....	1
1.2. ПРОЦЕС САГОРЕВАЊА ДУВАНА	3
1.3. ДУВАНСКИ ДИМ.....	4
1.4. ПУШЕЊЕ.....	6
1.5. ШТЕТНОСТ ПУШЕЊА	6
1.6. ЕФЕКТИ ДУВАНСКОГ ДИМА CCs НА РЕГЕНЕРАЦИЈУ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА	10
1.6.1. Матичне ћелије	10
1.6.2. Мезенхималне матичне ћелије изведене из периодонталног лигаментa (PDL-MSCs)	15
1.6.3. MSCs и пушење	16
1.7. ИНФЛАМАЦИЈА У ХРОНИЧНИМ ИНФЛАМАЦИЈСКИМ БОЛЕСТИМА 17	
1.7.1. Дувански дим CCs и хронична опструктивна болест плућа	18
1.7.2. Дувански дим CCs и шећерна болест	21
1.7.3. Дувански дим CCs и улцерозни колитис.....	24
1.8. ЕЛЕКТРОНСКИ УРЕЂАЛИ ЗА ИСПОРУКУ НИКОТИНА	26
2. ЦИЉ РАДА	31
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1. <i>In vitro</i> студија.....	32
3.1.1. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелија	32
3.1.2. Генерисање третмана - дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а.....	33
3.1.3. Тестови цитотоксичности	33
3.1.4. Мерење цитокина у супернатанту	34

3.1.5.	Ко-култура PDL-MSCs са Т лимфоцитима изложених CCs и ENDS-у	
	35	
3.2.	Анимални модел болести	35
3.2.1.	Индукција експерименталног модела хроничних инфламацијских болести	35
3.2.2.	Анализа плућне функције.....	37
3.2.3.	Патохистолошка анализа ткива плућа, црева и панкреаса	38
3.2.4.	Изолација моноклеарних ћелија из плућа, ламине propriе зида дебелог црева и слезине	40
3.2.5.	Мерење цитокина у анималном серуму	41
3.3.	Клиничка студија.....	42
3.3.1.	Изолација моноклеарних ћелија из периферне крви пацијената.....	43
3.3.2.	Анализа фенотипа имунских ћелија изолованих из плућа, ламине propriе зида дебелог црева и слезине мишева, као и имунских ћелија изолованих из периферне крви пацијената	44
3.3.3.	Мерење цитокина у хуманом серуму	45
3.4.	Статистичка обрада података	45
4.	РЕЗУЛТАТИ	46
4.1.	Утицај CCs и ENDS-а на регенеративни потенцијал PDL-MSCs	46
4.1.1.	Дувански дим CCs и аеросол ENDS-а негативно утичу на вијабилност и способност пролиферације PDL-MSCs у дозно-зависном маниру	46
4.1.2.	CCs и ENDS су индуковавали промену фенотипа PDL-MSCs.....	47
4.1.3.	PDL-MSCs изложене дуванском диму CCs промовишу стварање про-инфламацијских цитокина у Т лимфоцитима, док PDL-MSCs третиране аеросолом ENDS-а фаворизују синтезу имunosупресивних цитокина у Т ћелијама.....	49
4.1.4.	CCs и ENDS испољавају различите ефекте на вијабилност и имунорегулаторна својства PDL-MSCs кокултивисаних са Т лимфоцитима...	51
4.2.	Утицај CCs и ENDS-а на системску инфламацију у хроничним инфламацијским болестима	53
4.2.1.	У поређењу са CCs, ENDS-а слабијим интензитетом индукују синтезу инфламацијских цитокина у имунским ћелијама пацијената оболелих од ХОБП-а	53

4.2.2. У поређењу са CCs, ENDS су показали слабији капацитет да промовишу производњу инфламацијских цитокина у Th1 и Th17 лимфоцитима пацијената оболелих од ДМ-а.....	57
4.2.3. У поређењу са CCs, ENDS ефикасније подстичу синтезу имуносупресивних цитокина у имунским ћелијама пацијената оболелих од УК-а	61
4.3. Утицај CCs и ENDS-а на развој и прогресију хроничне опструктивне болести плућа	65
4.3.1. Оштећење ткива и инфламација су били израженији у плућима мишева изложених дуванском диму у поређењу са мишевима који су били изложени аеросолу ENDS-а	65
4.3.2. Слабији интензитети активације инфлазома и секреције проинфламацијских цитокина детектовани су у неутрофилима и макрофагима инфилтрираним у плућима мишева изложеним аеросолима ENDS-а у односу на неутрофиле и макрофаге из плућа мишева излаганих дуванском диму	70
4.3.3. Након излагања ENDS-у, DC показују смањен антиген-презентујући капацитет и нижим интензитетом промовишу инфламацију плућа зависну од Th1 и Th17 ћелија у односу на имунски одговор узрокован изложеношћу дуванског дима	75
4.3.4. Код експерименталних мишева, ENDS је узроковао блажу прогресију оштећења плућа у успостављеном ХОБП-у у односу на CCs.....	78
4.3.5. У плућима експерименталних животиња, ENDS је, у односу на CCs, слабијим интензитетом индуковао синтезу инфламацијских цитокина у неутрофилима, макрофагима и DCs	84
4.3.6. Изложеност ХОБП мишева ENDS-у узроковала је експанзију имуносупресивних, регулаторних Т, NK и NKT ћелија у оштећеним плућима за разлику од CCs који је промовисао експанзију проинфламацијских Th1, Th2 и Th17 лимфоцита	87
4.3.7. Коришћење ENDS-а узроковало је значајно мањи пораст броја проинфламацијских имунских ћелија у крви ХОБП пацијената у односу на коришћење CCs.....	90
4.4. Утицај CCs и ENDS-а на прогресију шећерне болести	95
4.4.1. Након индукције дијабетеса код експерименталних мишева, континуирана изложеност аеросолима ENDS-а узроковала је мањи степен оштећења панкреаса и слабију инфламацију у поређењу са дуванским димом	95

4.4.2. Код ДМ мишева, дуготрајна изложеност аеросолима ENDS-а узроковала је нижи ниво активација NLRP3 инфламазома и последично нижи интензитет секреције проинфламацијских цитокина у неутрофилима и макрофагима у поређењу са CCs	100
4.4.3. ENDS слабијим интензитетом промовише антиген-презентујући капацитет DC и активацију Т и НКТ ћелије код ДМ мишева у односу на CCs	103
4.4.4. У крви пацијената оболелих од шећерне болести који су корисници ENDS-а детектован је мањи број инфламацијских имунских ћелија у односу на ДМ пацијенте који користе цигарете (CCs)	107
4.5. Утицај CCs и ENDS-а на прогресију улцерозног колитиса.....	110
4.5.1. Континуирана изложеност дуванском диму CCs и аеросолима ENDS-а промовисала је зарастање оштећење слузокоже колона што је узроковала бољи спонтани опоравак и преживљавање мишева третираних DSS-ом.....	110
4.5.2. Континуирана изложеност аеросолима ENDS-а повећала је присуство имуносупресивних Т лимфоцита у ткиву колона док је изложеност CCs смањила инфилтрацију колона проинфламацијским Т ћелијама код мишева са улцерозним колитисом изазваним DSS-ом	116
4.5.3. Дуготрајна конзумација CCs и ENDS-а није узроковала статистички значајне негативне ефекте на прогресију инфламације колона и зарастање слузокоже код пацијената оболелих од УК-а	121
4.5.4. У крви УК пацијената који користе ENDS уочен је повећан укупан број имуносупресивних Т лимфоцита док је у крви УК пацијената који конзумирају CCs детектован смањен укупан број проинфламацијских Th1, Th2 и Th17 ћелија	125
5. ДИСКУСИЈА	130
5.1. Ефекти CCs и ENDS-а на мезенхималне матичне ћелије периодонталног лигамента	130
5.2. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију	132
5.3. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у ХОБП	134
5.4. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у ДМ.....	138
5.5. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у УК.....	140
6. ОГРАНИЧЕЊА	143
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	144
8. СКРАЋЕНИЦЕ	145

9.	ЛИТЕРАТУРА	148
	БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	168
	БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА.....	169

1. УВОД

Континуирана и хронична изложеност становништва физичким и хемијским хазардима из спољашње средине оставља озбиљне и дугорочне последице по здравље. Њихови токсични ефекти често остају недетектовани све док се не манифестују кроз настанак или напредовање различитих болести (1). Ефекти и штетности пушења су деценијама истраживани и, упркос неупитних доказа и резултата, на свету и даље постоји више од билион пушача (2). Пушење конвенционалних, запаљивих цигарета (енгл. *Combustible cigarettes*, CCs) је водећи фактор ризика за многе здравствене проблеме на глобалном нивоу (1). Додатно, пушење је један од најважнијих узрочника повећане преране смртности и инвалидитета. Хронична употреба CCs проузрокује око 7 милиона смртних случајева на годишњем нивоу и каузалитет је приближно 90% свих случајева карцинома плућа (3). Са друге стране, пасивна изложеност дуванском диму, односно невољно удисање дуванског дима CCs из непосредне средине, изазива смрт 1.2 милиона непущача годишње (4).

У циљу унапређења здравља, огромни напори су уложени да се смањи потрошња дувана на глобалном нивоу. Бројни програми контроле дувана су развијени и дизајнирани су нови никотински производи који могу допринети смањењу употребе дувана и усмерити становништво на превенцију и престанак пушења (2,5). Иако су напори и стратегије усмерени ка редукцији штетности дувана биле успешне, паралелно са порастом броја становништва је и укупан број пушача остао астрономских размера (1).

Велики број пушача, односно велике размере изложености дувану, представљају глобални проблем. Узрок масивне конзумације дувана лежи у недовољној информисаности широких народних маса о размерама ризика које пушење носи са собом (5).

1.1. ДУВАН И НИКОТИН

Дуван је заједнички назив за више биљака из рода *Nicotiana* и фамилије *Solanaceae* које воде порекло из Америке. Најпознатија врста је *Nicotiana tabacum*, која се узгаја као једногодишња пољопривредна култура у топлим и сунчаним подручјима. Захваљујући развоју трговине, дуван је данас распрострањен широм света (6,7). Део биљке који се користи у форми цигарета је лист. Лист дувана садржи велики број различитих једињења, међу којима је најпознатији никотин. У дувану се налази најмање десет алкалоида, а око три четвртине укупне количине алкалоида сачињава никотин. У дувану садржај никотина варира у зависности од врсте дувана и креће се од 0,3 до 10 % (8).

Никотин је најистакнутији састојак дувана јер узрокује главне ефекте који доводе до зависности: стимулација централног нервног система и еуфорија (9). Никотин (3-(1-метил-2-пиридинил)-пиридин) је терцијарни амин који изазива јаку зависност (1,10,11). Настаје у корену биљке дувана, па се из корена преноси по читавој биљци у облику соли са јабучном или лимунском киселином. Никотин спада у алкалоид који садржи некондензоване петочлане и шесточлане прстенове (Слика 1.).

У свом преишћеном облику, никотин представља безбојну течност уљане конзистенције са благим, карактеристичним мирисом пиридина. Уљана никотинска течност изложена ваздуху постепено добија светлосну боју услед оксидацијом узрокованог тамњења. Никотин је веома растворљив у води јер његови молекули формирају снажне водоничне везе са молекулима воде, што омогућава мешање ових течности у свим односима. Тачка кључања никотина је 246 °C и процес је праћен делимичним распадањем, док је температура на којој никотин очвршћава приближно -30 °C. Дакле, интервал температуре који не ремети стабилност никотина је изузетно широк и олакшава растварање никотина у различитим растварачима (12). Никотинска течност може поседовати различиту густину, у зависности од температуре на којој се налази (13).

Хемијски је активан, реагује са оксидантима и лако формира соли, а у природи се налази у дувану и другим биљкама рода *Nicotiana*, где делује као алкалоид који стимулише нервни систем. Никотин се, у зависности од рН вредности окружења, налази у јонизованом или нејонизованом облику. У нејонизованом облику, односно у облику слободне базе, никотин пролази кроз мембране као што су слузокоже. На нижим рН вредностима, односно у киселој средини попут дима цигарета (рН=5,5), никотин се слабо апсорбује. Међутим, у базним условима се лако и брзо апсорбује (14).

Захваљујући липофилној природи, никотин лако пролази кроз мембране, тако да је апсорпција из плућа у крвоток веома брза. Никотину је потребно око 20 секунди да прође кроз крвно-мождану баријеру и да испољи своје ефекте (10). Полуживот никотина је до 90 минута (15). Метаболизам никотина се одвија у микрозомима јетре, на цитохромима CYP2A6 и CYP2B6. Главни метаболит јетре је котинин (80% никотина) који се потом метаболише у транс-3-хидроксикотинин (1). Котинин се у клиничкој пракси користи као биомаркер изложености никотину (10). Остатак никотина се метаболише у норкотинин (1). Велика варијација у осетљивости на никотин и шанси за развој зависности лежи у генским полиморфизмима главног метаболичког пута - CYP2A6 (16).

Никотин се везује за никотин ацетилхолинске рецепторе (енгл. *Nicotine acetylcholine receptors*, nAChR) који су распрострањени у нервном систему и на периферним ткивима попут епитела, ендотела (17), имунским ћелијама (18,19.). Интеракција никотин-рецептор резултује променама у мезолимбичком допаминском систему који је одговоран за развијање зависности (10). nAChR представља јонске канале, чланове суперфамилије Cys-петље, састављене од пет подјединица неуронског типа из две фамилије: α (девет типова подјединица, $\alpha 2$ - $\alpha 10$) и β (три типа подјединица, $\beta 2$ - $\beta 4$) (1; 10). У састав nAChR улази и пет подјединица мишићног типа ($\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ и ϵ) (20). Различите рекомбинације подјединица дају хетерогену групацију nAChR са јединственим физиолошким и фармаколошким ефектима (10).

У централном нервном систему су најдоминантнији nAChR са $\alpha 7$ - или $\alpha 4\beta 2$ подјединицом, док је у периферном најзаступљенији тип $\alpha 3\beta 4$ који је и посредник у испољавању никотинских аутономних ефеката (21). nAChR који у свом саставу имају $\alpha 9$ и/или $\alpha 10$ подјединице нису локализоване у мозгу, али јесу у екстранеуралним ткивима (17).

nAChR се могу наћи у различитим конформационим стањима која одређују њихову функционалност (22). Када је пентамер затворен, рецептор се налази у стању мировања (10). Када је јонски канал, односно пора у средини пентамера, отворена долази до флуksа катјона (Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+}) и последично до деполаризације мембране. До отварања канала долази услед интеракције никотин-рецептор. Везивање никотина, или неког другог агонисте, узрокују конформационе промене у пентамеру и до отварања јонског канала (1). Постоји могућност да nAChR буду у десензибилисаном конформационом стању када, услед везивања агониста, не долази до реакције, односно канал остаје затворен. Хронично излагање никотину може узроковати промене у броју рецептора nAChR и до адаптације неурона на никотин и последично до десензибилизације (10).

nAChR имају три домена: екстрацелуларни, трансмембрански и интрацелуларни. За екстрацелуларни домен се везује ацетилхолин, никотин и остали лиганди (22). Трансмембрански домен је јонски канал који омогућава флуks јона. Активација nAChR доводи до промена у ћелијама посредством интрацелуларног домена рецептора. Промене у протеолизи, активности митохондрија и сигналним путевима PI3K, ERK1/2, AKT су најзначајније интрацелуларне промене покренуте активацијом nAChR (23). Када се ацетилхолин веже за nAChR, узрокује деполаризацију нервних ћелија и, као главни неуротрансмитер парасимпатичког нервног система, преноси информације из неурона у периферна ткива (24). Са друге стране, када се никотин веже за nAChR, долази до дуже активације рецептора и десензибилизације (25). Хронично излагање никотину доводи до адаптације рецептора, што доприноси развоју зависности и узрокују симптоме апстиненције (25).

Никотин има способност да штити саму биљку од инсеката, док у људском организму као биолошки активна супстанца испољава снажне ефекте на неуротрансмитере и изазива осећај пријатности који услед улестале примене може узроковати и зависност. Поред никотина, у дувану се налазе и друге бројне биолошки активне супстанце попут флавоноида (кверцетин, апигенин, рутин), фенолних (ферулинска, хлорогенска, кафеинска) и органских (јабучна и лимунска) киселина, кетона (α - и β -јонон), витамина (E и K1) и терпеноида (соланесол). Поред ових метаболита, у састав дувана улазе и угљени хидрати, аминокиселине и протеини, стероли, минерали (калијум и калцијум) (26). Различите врсте дувана разликују се по хемијском саставу, нарочито по садржају никотина и шећера, што утиче на њихова својства и намену. Дуван има свој препознатљив мирис и укус. Лист дувана може лако да упија влагу, због чега захтева посебне услове за гајење (27).

1.2. ПРОЦЕС САГОРЕВАЊА ДУВАНА

Сагоревањем листа дувана настаје дувански дим. Процес сагоревања дувана је праћен другим хемијским реакцијама попут пиролизе, пиросинтезе, сублимације, дестилације и кондензације (28,29).

Сагоревање и пиролиза се дешавају у различитим деловима запаљене цигарете. Прва зона, односно зона у којој долази до паљења дувана је зона сагоревања и она се дешава на температури од око 600°C. Почетак сагоревања захтева почетно учешће пламена који ће омогућити одговарајућу температуру и присуство молекула кисеоника који генеришу једињења воде и угљен диоксида. Пламен који покреће процес сагоревања омогућава довољну количину енергије до завршетка процеса, односно до досезање топлоте до врха филтера (28,29). Међутим, процес сагоревања је беспламенско и најчешће се означава као тињање. Тињање генерише две врста дима: главни (“mainstream smoke”) и споредни (“sidestream smoke”). Главни дим пушач увлачи директно у плућа кроз филтер, а споредни дим настаје на делу цигарете који сагорева, не зависи од кисеоника, дешава се на температури од око 400°C и њему су поред пушача изложени и присутни непушачи (“пасивно пушење”) (30). Повлачењем главног дима долази до пораста температуре на крају цигарете до 900°C услед наглог прилива кисеоника. Ове високе температуре узрокују формирање производа сагоревања и термичко разлагање - пиролизу која се дешава на температурама испод 500°C. Угљоводоници, попут целулозе и других полисахарада, се у зони пиролизе разлажу и ослобађају воду, угљен диоксид, изузетно токсичан угљен моноксид и друге хемикалије. Као производи пиролизе најчешће настају гасовите супстанце које доприносе ароми. Гасови и паре настале пиролизом подстичу даљи ток процеса сагоревања. Паралелно са пиролизом одвија се пиросинтеза. Већина хемикалија присутних у дуванском диму генерише се управо у зони пиролизе/пиросинтезе у интервалу температуре од 200°C и 350°C. Пиросинтеза обухвата стварање нових хемијских једињења која настају као производи разградње хемијских веза које су постојале пре сагоревања. Новосинтетисана испарљива једињења на повишеној температури подлежу процесима дестилације (точно у гасовито) и сублимације (чврсто у гасовито). Након изласка из зоне пиролизе једињења пролазе кроз процес кондензације у којем супстанце из гасовитог стања прелазе у течно агрегатно стање формирајући микрочестице у дуванском диму који пушач удише. Најважнији производ кондензације је катран са својим специфичним оксидантима и слободним радикалима (28,29).

Састав главног и споредног дуванског дима се значајно разликују. Главни дим, пре удисања, пролази кроз целу дужину цигарете и филтер и садржи хемикалије са високом тачком кључања. Супротно њему, споредни дим не пролази кроз филтер и пошто настаје на знатно нижим температурама садржи другачије супстанце. На састав дуванског дима поред врсте дувана утиче и природа папира, филтера и адитива. Фокус овог истраживања ће бити “mainstream” дувански дим који ће у даљем тексту бити означен као: дувански дим.

1.3. ДУВАНСКИ ДИМ

Дувански дим је колоидна мешавина течних и чврстих честица и гасовитих молекула суспендованих у ваздуху. Дувански дим садржи супстанце које су биле присутне у листу дувана, али и као и нове хемикалије које настају током процеса сагоревања дувана и пропратних делова производа, попут филтера и папира. Многи токсини детектовани у дуванском диму заправо нису садржани у дувану пре сагоревања, што би значило да начин обраде дувана директно утиче на степен штетности дуванског производа (31).

Дувански дим садржи више од 8000 различитих хемикалија (1), укључујући и више од 70 супстанци канцерогеног дејства (Слика 2.) (5,32).

Активне компоненте дуванског дима чији су биолошки и физиолошки ефекти детаљно испитани су означени као “Хофманови аналити” (33,34). Најпознатији аналити су катран, никотин, угљен-моноксид, 1,3-бутадиен, бензен, етилен оксид и акрилонитрил. Остали аналити убрајају амонијак, феноле, карбониле, нитрозамини специфични за дуван (енгл. *Tobacco-specific N-nitrosamines*, TSNA), ароматични амини, полициклични ароматични угљоводоници (енгл. *Polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH), цијановодична киселина и неорганска једињења (35). За разлику од PAH и ароматичних амина који настају као последица пиролизе и пиросинтезе (36,37), TSNA се налазе природно у листу дувана као последица сазревања биљке (38). У групу TSNA убрајамо изразито канцерогена једињења попут N'-нитрозоанатабин (енгл. *N-Nitrosoanatabine*, NAT), N'-нитрозонорникотин (енгл. *N-Nitrosonornicotine*, NNN) и 4-метилнитрозамино-1,3-пиридил-1-бутанон (енгл. *4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*, NNK) који, поред тога што узрокују ДНК мутације, својим везивањем за nAChR активирају Src протоонкоген и последично промовишу настанак и развој канцера посредством модулације киназа ERK1/2 и Akt (39,40). NNN је потенцијални узрочник карцинома оралне дупље и једњака док NNK је узрочник карцинома плућа (41). PAH узрокује респираторну и кардиоваскуларну дисфункцију, као и карцином плућа (42-44).



Слика 1. Састав дуванског дима CCs. Креирано помоћу BioRender.com

1.4. ПУШЕЊЕ

Инхалација дима цигарете при чему никотин и остале токсичне супстанце улазе у усну дупљу и транспортују у плућа, где се апсорбују и допремају у крвоток, представља активно пушење. Пасивно пушење укључује удисање дима који настаје на крају цигарете и утиче на функцију плућа и активних пушача и непушача који удишу дим (45). Изложеност никотину из животне средине услед активне употребе дувана, пасивног пушења и супституционе терапије никотином препозната је као фактор ризика за многобројне болести (46). Ефекти дувана не утичу само на настанак болести, већ и убрзавају прогресију оштећења ткива и органа и смањују успешност фармаколошке терапије (47).

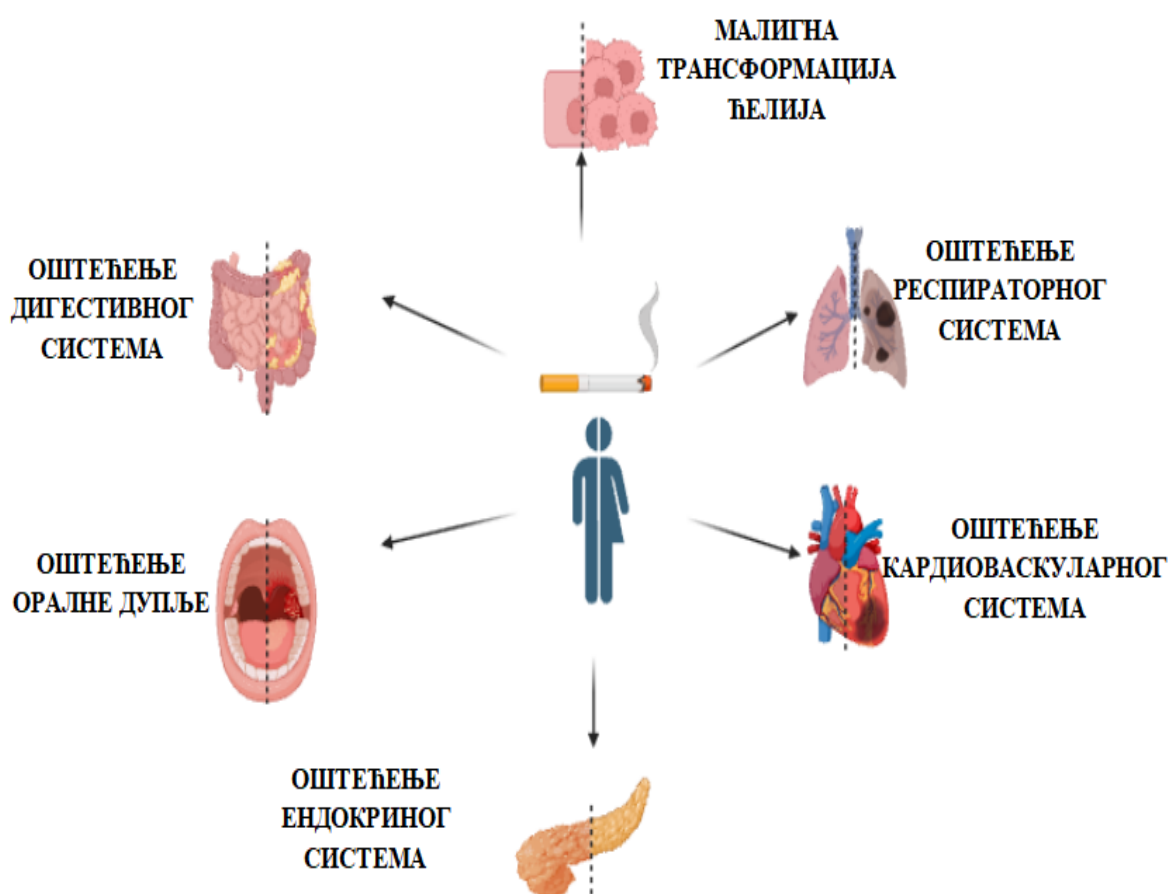
Процес пушења се заснива на удисању дуванског дима у плућа и последичном апсорпцијом никотина и других конституената првобитно у плућну а затим и у артеријску циркулацију (10). Никотин долази до мозга за пар секунди и изазива осећај пријатности. У ниским дозама никотин има ефекат слабе аналгезије, у високим доводи до тремора, а у токсичним до конвулзија (48). Никотин пролази кроз крвно-моздану баријеру и стимулише мозак да ослобађа бројне неуротрансмитере попут ацетилхолина, допамина, норадреналина, серотонина, глутамата и хормоне (вазопресин и бета-ендорфин). Допамин, који доводи до осећаја задовољства, награде и олакшања, главни је неуротрансмитер у развоју зависности. Пушење, посредством неуротрансмитера, повећава ниво енергије, побољшава расположење, концентрацију и пажњу, смањује осећај стреса и доприноси осећају смирености (10).

На нивоу продужене мождине, никотин утиче на центар за дисање, при чему су ефекти дозно-зависни. У ниским дозама никотин делује стимулативно, а у високим дозама депресивно. Дакле, предозирање никотином носи ризик од депресије центра за дисање, респираторног дистреса и смрти (49).

Токсичност узрокована пушењем потиче од процеса сагоревања дувана и последичним генерисањем дуванског дима који садржи никотин, Хофманове анализе и многе друге супстанце (1).

1.5. ШТЕТНОСТ ПУШЕЊА

Пушење цигарета је најважнији узрок поремећаја функције бројних органских система и функција попут хематопозе (50), метаболизма (51,52), имунског одговора (53), као и болести респираторног и кардиоваскуларног система које се могу превенирати (Слика 3.) (1,54).



Слика 2. Утицај пушење на здравље људи. Креирано помоћу BioRender.com

Аспекти пушачке навике који се повезују са тежином клиничке слике су узраст иницијацијалног конзумирања цигарета, укупно трајање у континуитету или са паузама, број цигарета на дневном нивоу и просечна дубина удисаја (55). Са друге стране, фактори удружени са патологијом болести који нису везани за пушење већ за природу болести су анатомска локација оштећења и врста патолошког процеса (56).

Код пушача се најчешће дијагностикују плућне болести, међу којима је најучесталији астма и бронхитис. Континуирана употреба дувана често доводи до озбиљних оштећења плућа попут хроничне опструктивне болести плућа (ХОБП), емфизема и фиброзе (57).

На нивоу оралне дупље, пушење узрокује карциноме, губитак алвеоларне кости (58), пародонтопатију и болести слузокоже. Пушење је најважнији фактор ризика за настанак периодонталних обољења, до којих долази услед захватања Шарпејевих влакана која повезују цемент корена зуба са алвеоларном кости. Додатно, катран из дуванског дима узрокује пребојеност зуба и ствара средину која погодује настанку плака, каменца, гингивитиса, бактеријских инфекција (32,59) и губитка укуса (60).

На нивоу циркулаторног система, никотин из дувана доводи до вазоконстрикције и инхибира снабдевање ткива кисеоником услед смањења протока крви (32). Пушење утиче на хемодинамске параметре кардиоваскуларног система и узрокује хипертензију, поремећаје срчаног ритма, убрзава атеросклерозу и промовише агрегацију тромбоцита. Због свог атеротромботичног дејства дуван повећава ризик од инфаркта миокарда, можданог удара и тромботичних догађаја (5,61).

Пушење утиче негативно и на репродуктивно здравље зато што ремети нормално функционисање репродуктивног и ендокринолошког система. Континуирана конзумација CCs ремети рад полних жлезда и ниво полних хормона (62). Код жена пушење смањује плодност тако што нарушава квалитет и број јајних ћелија, ремети имплантацију и повећава ризик од синдрома полицистичних јајника. Нарушавање менструалног циклуса може такође бити проузроковано пушењем. Обилна крвављења, дисменореја, олигоменореја и преурањена менопауза су чешће код жена пушача у односу на жене непушаче (63).

Код мушкараца који су пушачи је детектован значајно мањи укупан број сперматозоида и нижа заступљеност оптимално покретних сперматозоида у односу на непушаче. Негативан утицај пушења је препознат и у волумену ејакулата и заступљености сперматозоида нормалне морфологије, али без статистичке значајности (62). Функција простате и епидидимиса такође могу бити редуковане услед континуираног коришћења CCs (64). Биомаркер оксидативног стреса, супероксид дисмутаза, био је значајно нижи код пушача и непушача указујући на важну улогу оксидативног стреса, и фактора који их покрећу као што је пушење, у неплодности. Пушење може смањити и успешност асистивних репродуктивних технологија, попут вантелесне оплодње (65).

Пушење не само да ремети оптималну плодност, већ и повећава ризик од компликација у трудноћи. Интраутерине инфекције, узроковане инфламацијом пупчане врпце и општећењем имунског система мајке, могу бити узроковане пушењем. Услед везивања угљен-моноксида (енгл. *Carbon monoxide*, CO) за хемоглобин може доћи до хипоксемије фетуса (66). Изложеност плода дуванском диму у току трудноће може негативно утицати на плодност детета у будућности, узроковати малу тежину бебе на порођају или повећати ризик од побачаја и абрупције плаценте (67,68). Услед пушењем изазване повећане секреције простагландина у мембранама фетуса може доћи до превременог порођаја. Пушење повећава ризик од перинаталне и неонаталне смртности (66,69). Престанак пушења позитивно делује на раст фетуса и тежину бебе на рођењу. Важно је нагласити да постоји позитивна корелација између степена репродуктивне дисфункције и дужине и учесталости пушења (70,71).

Пушење погодује дисрегулацији имунског система јер смањује нивое антитела имуноглобулина (енгл. *Immunoglobulins*, Ig), у крви (класе A (IgA), M(IgM) и G(IgG)) (32) и пљувачки (IgA) (72).

Употреба CCs узрокује оксидативни стрес, који праћен инфламацијом, може погодвати дисфункцији ендотела, коагулације и хемодинамских процеса (54). Никотин негативно утиче на проток крви у ткива и ограничава испоруку хранљивих материја до ћелија. Управо због поменутих процеса долази до отежаног зарастање чира, прелома и рана (73).

На нивоу скелетног система, дувански дим омета метаболизам и регенерацију костију, доводи до развоја остеопорозе и успореног зарастања костију након прелома. Никотин утиче на остеокласте и остеобласте, што синергистички доводи до поремећаја метаболичке активности костију, ресорпције и ремоделовања (74).

Дувански дим ступа у интеракције са фармаколошком терапијом услед чега модификује њено дејство. У циљу оптимизовања ефикасности терапије и прилагођавању дозе и дозног интервала, неопходно је приликом прописивања терапије размотрити и пушачки статус сваког пацијента.

Потенцијалне интеракције дуванског дима са лековима је неопходно разматрати и код пацијената који су недавно престали са конзумацијом ССs. РАН, поред својих токсичних ефеката на здравље, ремети метаболизам многих лекова преко индукције изоформи 1А1 и 1А2 цитохрома П450 (75). И други конституенти дуванског дима, попут СО и никотина, имају потенцијал да модификују рад хепатичних ензима. Пушење, преко модулације фармакокинетики лекова, утиче на ефикасност терапија. Нижа ефикасност, као последица пушењем узроковане ниже дозе лека у крви пацијената, забележена је код пушача који користе лекове из групе антипсихотика (клозапин и оланзапин), антидепресива (есциталопрам, венлафаксин, амитриптилин, митразепин), цитостатика (паклитаксел, иринотекан, ерлотиниб, гемцитабин), статина (аторвастатин), антиаритмика (верапамил), антибиотика (метронидазол) и инхибитора агрегације тромбоцита (клопидогрел). Уколико пушење смањује концентрацију доступног лека у крви пацијента, неопходне су веће дозе да би се достигао оптималан терапијски ефекат. Супротно томе, пушење такође може изазвати пораст концентрације неког лека, попут амисулприда и силденафила, у крви пацијента, што такође захтева корекцију дозе и дозног интервала (76). Најчешћи узрочник фармакокинетских интеракција дуванског дима ССs и лекова је РАН, док је најчешћи узрочник ефеката фармакодинамских интеракција никотин. Никотин може модулирати дејство одређених лекова индиректно својим биолошких ефеката: смањити ефикасност антихипертензива активацијом симпатикуса (77).

Престанак пушења је повезан са здравственом коришћу код пацијената различитог узраста. Позитивни ефекти престанка пушења које ће се прво појавити су симптоми побошљања функције респираторног и кардиоваскуларног система. Одсуство диспнеје, стабилизација притиска и срчаног ритма су неки од првих здравствених користи престанка пушења, такозване short-term предности престанка пушења (78,79). Дужи животни век и мањи ризик од развоја малигнитета су такође препознате користи престанка пушења (80).

Дувански дим се повезује са повећаном инциденцом малигнитета различите локализације (усна дупља, усне, гркљан, једњак, плућа, панкреас, колон). Дувански дим, ослобађајући реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS), узрокује оксидативни стрес и инфламацију, синергистички доприносећи оштећењу ћелија и развоју бројних акутних и хроничних болести. Онкогенеза је додатно индукована потенцијалом дуванског дима да створи повољне услове за малигну трансформацију ћелија изазивањем мутација и покретањем хиперметилације одређених гена и оштећењем молекула ДНК. Пушење индиректно, супресијом имунског одговора и оштећењем функције имунских ћелија, погодује напредовању канцера (81).

Посебна пажња се усмерава на пасивно пушење и изложеност непушача диму цигарета. Пасивна изложеност дуванском диму повећава ризик од астме, možданог удара, кардиоваскуларних болести (82,83). Иако су нејасни и недовољно истражени, доступни подаци повезују непушаче изложене дуванском диму са повећаним ризиком од прогресије обољења јетре (55).

Пушење изазива и психичку и физичку зависност. Физичка зависност подразумева појаву апстиненцијалног синдрома услед прекида узимања никотина. Апстиненцијални синдром је скуп клиничких симптома и знака који се јављају приликом престанка узимања стимуланса (84). Манифестује се као синергија дисрегулације когниције, афекта и соматике услед престанка конзумирања никотина. Проблеми са памћењем и концентрацијом, раздражљивост, анксиозно и депресивно понашање, су најчешћи клинички симптоми никотинске апстиненције.

Додатно, као последица поремећаја аутономног нервног система, долази до брадикардије, хипертензије и дигестивних тегоба (25). Симптоматологија апстиненције се може значајно разликовати по трајању и интензитету међу појединцима. Од карактеристике апстиненцијалног синдрома зависи вероватноћа поновне употребе дувана (85).

Престанак пушења је главна мета превенције многих болести. Нажалост, пацијенти често не престају да пуше након дијагнозе, и у случајевима по живот опасних стања попут акутног коронарног синдрома (32). За болести типа дијабетеса, пушење не само да повећава ризик од настанка, већ и узрокује тежу клиничку слику и озбиљнију прогресију. Наиме, пушење промовише инциденцу макро и микроангиопатија узрокованих оштећењем крвних судова и престанак пушења је начин превенције или одлагања компликација специфичних за болест (1). Престанак пушења је главна превенција прогресије респираторне дисфункције јер смањује тренд опадања форсираног експираторног волумена у првој секунди (енгл. *Forced expiratory volume in first second*, FEV1) и форсираног виталног капацитета плућа (енгл. *Forced Vital Capacity*, FVC) (54).

Међутим, престанак пушења није лак процес јер упоредо са смањењем нивоа никотина долази до појаве претходно описаног синдрома апстиненције (10). Престанак пушења може бити олакшан применом фармакотерапије, односно терапије никотинске супституције, која се препоручује свим пушачима који желе да престану, под условом да не постоји контраиндикација за примену лека. Ови лекови смањују симптоматологију одвикавања и никотинске ефекте уколико ипак дође до конзумације цигарета (54). Допремањем никотина, слично као и сам дуван, лекови за одвикавање од пушења доприносе добром расположењу бивших пушача и повећавају шансу за успешно лечење (10). Терапија никотинске супституције се заснива на допремању адекватних доза никотина у прецизно дефинисаним дозним интервалима чиме се постиже стабилност концентрације у крви током времена. Данас је доступан широк спектар алтернативних производа који имају смањење конзумације дувана, односно редукцију штетности пушења за циљ (86).

1.6.ЕФЕКТИ ДУВАНСКОГ ДИМА ССs НА РЕГЕНЕРАЦИЈУ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

1.6.1. Матичне ћелије

Матичне ћелије су незреле ћелије супериорних способности самообнављања, неограничене деобе и диференцијације у више ћелијских линија. Својом клонском експанзијом и диференцијацијом у специјализоване ћелије могу да обнављају оштећена ткива.

Матичне ћелије класификујемо на ембрионалне, адултне и индуковане плурипотентне матичне ћелије.

Ембрионалне матичне ћелије (енгл. *Embryonic stem cells*, ESCs) су изоловане из ембриона, тачније из унутрашње ћелијске масе бластоциста, стадијума непосредно пре имплантације, чиме долази до деструкције самог ембриона (87).

Кључне карактеристике ембрионалних матичних ћелија су: плурипотентност, изоловање из преимплантационе бластоцисте, капацитет дуготрајне пролиферације и самообнављања, нормалан кариотип и експресија специфичних ћелијских маркера (87).

Плурипотентност тј. способност диференцијације у ћелије сва три клицина листа је фундаментална карактеристика ових ћелија. Доказ плурипотентности хуманих ESCs је формирање ембрионидних тела *in vitro* и настанак тератома изграђених од ћелија сва три клицина листа након њиховог апликовања имунодефицијентним мишевима (88). ESCs могу да се развију у било који тип ћелија, тачније оне диференцирају у типове ћелија ектодерма, мезодерма или ендодерма. Из тог разлога користе се у сврхе истраживања и бољег разумевања својстава матичних ћелија. Њихово коришћење у терапеутске сврхе покреће озбиљна етичка питања, јер је за њихову изолацију неопходна деструкција ембриона (89,90).

Индуковане плурипотентне матичне ћелије настају генетским репрограмирањем специјализованих соматских ћелија (91). Јаманака и сарадници су 2006. године у својој иновативној студији описали метод за директно репрограмирање мишијих фибробласта у плурипотентне ћелије, увођењем четири транскрипциона фактора OCT3/4, SOX2, c-мус и Klf4 посредством ретровируса (92). Овако добијене ћелије назване су индуковане плурипотентне ћелије (енгл. *Induced pluripotent stem are cells*, iPSC). iPSC су по морфологији, експримираним површинским маркерима плурипотенције, епигенетском статусу, способности диференцијације у ћелије сва три клицина листа и стварању тератома код имунодефицијентних мишева, веома сличне ESC. Осим из фибробласта, ESC су добијене и репрограмирањем хепатоцита, епителних ћелија, ћелија панкреаса, В лимфоцита. Сматра се да поменути транскрипциони фактори унети у соматске ћелије синергистички појачавају експресију гена одговорних за плурипотенцију, а супримирају гене линијске специјализације. Међутим, због бројних епигенетских модификација хроматина и постојања супресора транскрипције, ефикасност репрограмирања је ниска (93).

Хумане ESCs и iPSCs стварају густе, равне колоније, имају велико једро и оскудну цитоплазму, и експримирају маркере SSEA3 и SSEA4 (енгл. *Stage-specific embryonic antigen*), TRA-1-81 и TRA-1-60, NANOG (енгл. *Homeobox Transcription Factor Nanog*), OCT4 (енгл. *Octamer 3/4*) и SOX2 (енгл. *Sex determining region Y-box 2*). Фактори транскрипције OCT-3/4, SOX2 и NANOG стимулишу транскрипцију гена који су важни у одржавању плурипотентности и инхибирају гене који покрећу диференцијацију у ћелије сва три клицина листа (94).

ESCs и iPSCs одликује велики потенцијал пролиферације, могућност диференцијације у ћелије сва три клицина листа, повећана теломеразна активност, као и епигенетски статус сличан епигенетском статусу ESCs (95). Међутим, због етичких дилема везаних за деструкцију хуманих ембриона у циљу изоловања ESCs, као и тешког контролисања диференцијације и малигне трансформације ESCs и iPSCs *in vivo*, све већу пажњу научника привлаче адултне матичне ћелије.

Адултне матичне ћелије (енгл. *Adult stem cells*, ASCs) су присутне у многим људским ткивима и органима. Ове ћелије су мултипотентне: имају способност диференцијације у различите ћелије пореклом од једног, истог клициног листа. Захваљујући ограниченим способностима диференцијације, ASCs не носе ризик од формирања тератома. Имунокомпатибилност и могућност једноставног изоловања из различитих ткива су додатне предности ових ћелија.

Најпознатије и најбоље окарактерисане ASCs су хематопоеетске и мезенхималне. Хематопоеетске матичне ћелије (енгл. *Hematopoietic stem cells*, HSCs) стварају ћелије крви и ћелије имуног система процесом хематопоезе. Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells*, MSCs) су мултипотентне матичне ћелије и представљају основ ћелијске терапије у регенеративној медицини (96). MSCs се могу изоловати из скоро свих постнаталних ткива: дентална пулпа, синовија, амнионска течност, адипозно ткиво, пупчана врпца, крв, коштана срж, мишићи, тонзиле, кожа, плућа, рожњача, грлић материце, мајчино млеко, фетално/неонатално ткиво, постељица, крв из пупчане врпце, мозак, слезина, јетра, бубрези, плућа, тимус и панкреас. Масно ткиво је добар извор MSCs (енгл. *Adipose tissue derived mesenchymal stem cells*, ADMSCs) јер омогућава да се липосукцијом, мало инвазивном процедуром, изолује велики број ћелија. Изолација MSCs из пупчаника (енгл. *Umbilical cord derived mesenchymal stem cells*, UCMSCs) је такође неинвазивна и безбедна процедура. При стандардним условима култивације, ове ћелије брже пролиферишу у односу на MSCs из масног ткива, и показују мању експресију маркера ћелијског старења p53, p21 и p16 (97). Без обзира на ткиво из ког се изолују MSCs имају сличне морфолошке и функционалне карактеристике укључујући мултипотентност и способност имуномодулације.

Иако су MSCs присутне у великом броју ткива, њихова укупна количина у људском телу није довољна да регенерише теже оштећена ткива. Ћелијска терапија захтева велике количине MSCs по третману што захтева претходну припрему ћелија *in vitro*. Утврђени су протоколи за њихову екстракцију, гајење и идентификацију. Фактори који могу утицати на модификацију протокола су старост пацијента и одређене специфичности болести (98,99).

MSCs су локализоване у специфичној микросредини у својим „нишама“. Анатоомске компонентне и молекулски механизми нише обезбеђују сигнале за одржавање MSCs у ткиву, у коме се ове ћелије деле асиметричном деобом. MSCs имају смањене способности самообнављања и пролиферације у односу на плурипотентне матичне ћелије. Могу диференцирати у све типове ћелија једног клициног листа, односно, у све ћелије ткива у коме се налазе (100). Њихова мултипотентност се огледа у адипогеном, остеогеном и хондрогеном смеру диференцијације (96). Додатно, MSCs поседују и миогени, епителни и неурогени потенцијал диференцијације и антиинфламаторна, антиапоптомска и антифибротична својства (101,102).

MSCs експримирају површинске антигене који имају улогу маркера праћења плурипотенције и диференцијације. На површини MSCs су детектовани CD молекули (енгл. *Cluster of differentiation*, CD) који учествују у одржавању потентности: CD105, CD73, CD90 Међутим, хематопоеетски маркери CD45, CD34, CD14, CD79α, CD31 и молекула главног комплекса хистокомпатибилности (енгл. *Major histocompatibility complex*, МНС) II класе, попут хуманог леукоцитног антигена (енгл. *Human Leukocyte Antigen* - DR, HLA-DR), нису испољени на MSCs и њихово одсуство се користи за карактеризацију ових ћелија. Поред CD молекула, на површини MSCs је уочен и гликосфинголипид из SSEA фамилије гена SSEA-4.

Примитивне MSCs из перинаталних извора, попут UC-MSCs и MSCs из амниотске течности (енгл. *Amniotic fluid derived mesenchymal stem cells*, AF-MSCs), осим уобичајених мезенхимских маркера експримирају и маркере плуропотенције NANOG, SOX-2 и OCT-4. Ови подтипови мезенхималних матичних ћелија могу диференцирати у ћелије сва три кличина листа (103).

Порекло MSCs је још увек предмет дебате. Генска експресија, мултипотентност и способност миграције ка месту повреде су способности MSCs које поседују и ћелије настале епително-мезенхималном транзицијом (104). Међутим, у току ембриогенезе први прогенитори MSCs воде порекло од SOX-1+ неуроепителних ћелија, док током каснијег постнаталног развоја MSCs настају из других извора (105). Највећи број доступних студија се слаже да MSCs поседују протеинске и генетске маркере и испољавају остеогени, хондрогени и адипогени потенцијал диференцијације као и периваскуларне ћелије – перицити (106).

Матичне ћелије имају способност хоминга: мигрирају у место акутне повреде у складу са хемијским градијентима, диференцирају у локалне компоненте повређених ткива и луче хемокине, цитокине и факторе раста који омогућавају регенерацију органа (107). Хемоатракција се дешава захваљујући површинским хемокинским рецепторима. Трансмиграција матичних ћелија у фокус повреде се дешава преко ендотела, путевима који укључују молекул адхезије васкуларних ћелија-1 (енгл. *Vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1), молекула интерцелуларне адхезије-1 (енгл. *Intercellular cell adhesion molecule 1*, ICAM-1) и сигнализацију рецептора везаних за G-протеин. Интеракције матичних ћелија и ендотела се одвијају посредством интегрина и селектина (108).

MSCs подлежу процесу диференцијације у више типова ћелија, које локално интерагују са ендотелом и индукују обнављање функције преко репарације оштећених сегмената ткива. Могу диференцирати у мезодермалне (остеобласти, хондроцити, адипоцити, кардиомиоцити), и немезодермалне линије (ектодермалне и ендодермалне ћелије-хепатоцити, бета ћелије панкреаса) (99,109). Заправо, могу диференцирати у скоро све ћелије, тако да представљају одличан избор ћелија за засејавање у специфичне скафолде у ткивном инжењерингу (98). Такође, MSCs представљају одличну терапију различитих дегенеративних болести које карактерише оштећење ткива (107).

Паракрине функције MSCs се постижу преко биоактивних фактора (фактори раста, цитокини, хемокини) који утичу на локалне и системске физиолошке процесе. Секретовани фактори регулишу деловање суседних ћелија тако што повећавају ангиогенезу, смањују апоптозу и фиброзу, побољшавају диференцијацију неурона, продужавају животни век ћелија, стимулишу ремоделирање екстрацелуларног матрикса, ограничавају инфламацију и утичу на имуни систем. Крајњи исход је регенерација и репарација оштећених ћелија и спречавање ширења и развоја оштећења (99).

MSCs секретују различите растворљиве факторе и ослобађају екстрацелуларне везикуле (егзозоми и микровезикуле). Екстрацелуларне везикуле су претежно ендозомалног порекла и састоје се из miRNA, mRNA и протеина. Могу се користити као алтернативна терапија заснована на MSCs. Аутокрини и паракрини ефекти имају кључну улогу у зарастању рана и репарацији оштећења на месту повреде (110).

MSCs могу да модулирају имунски одговор, делују инхибиторно на урођени и стечени имунитет, утичу на препознавање и презентацију антигена и мењају одговор Т ћелија на више нивоа (од нивоа активације, преко пролиферације до ефекторског дејства) (45,100).

Имунолошка дејства MSCs се могу поделити на имунорегулаторна, антиинфламаторна и имуносупресивна (98,111). Потенцијал MSCs да утичу на имунитет се користи у лечењу и спречавању одбацивања трансплантата и у лечењу различитих аутоимуних и инфламаторних болести (системски лупус, дијабетес, мултипла склероза, Кронова болест) (100).

Имуномодулаторно дејство MSCs је условљено инфламаторним окружењем. У присуству инфламаторних цитокина MSCs испољавају имуносупресивно дејство, смањују антиген-презентујућу функцију дендритских ћелија и макрофага, цитотоксичност природних ћелија убица (енгл. *Natural killer cells*, NK) и цитотоксичних Т ћелија (енгл. *Cytotoxic T lymphocytes*, CTL), смањују пролиферацију Т и В лимфоцита (109).

У присуству проинфламаторних цитокина, MSCs испољавају имуносупресивно дејство, секрецијом трансформишућег фактора раста- β (енгл. *Transforming growth factor beta*, TGF- β), интерлеукина-10 (енгл. *Interleukin-10*, IL-10), простагландина E2 (енгл. *Prostaglandin E2*, PGE2) (90). Секрецијом проинфламаторних молекула и проангиогенетских фактора, као што су васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) и IL-6, поред имунског одговора, покрећу и васкулогенезу, поспешују репарацију и оздрављење оштећеног ткива.

MSCs индукује фибротичне реакције и могу да диференцирају у миофибробласте (98). Миофибробласти су кључне ћелије у реконструкцији везивног ткива и стварању деформисаног ожиљног ткива (112). У условима повреде долази до нарушавања равнотеже између фиброзе и репарације у смјеру диференцијације у фибробласте, депозицији колагена, нарушавању физиолошких услова средине и губитка функционалности оштећених органа (113).

Како би се мезенхималне ћелије употребљавале у клиничкој пракси неопходно је да задовоље важеће регулативе за производњу и контролу квалитета. На тај начин би се гарантовала безбедност и ефикасност овог вида терапије (100,111). Разлике у исходима терапије потичу од имунокомпатибилности. Смањење разлика успешности третмана и циљана администрација су највећи изазови у истраживањима са матичним ћелијама. Ткивним инжењерингом, адекватним скафолдима, се могу обезбедити оптимални услови потребни мезенхималним матичним ћелијама да испоље максимум свог потенцијала (98). Међутим, третман мезенхималним матичним ћелијама носи са собом озбиљне ризике: туморигеност, проинфламацију и фиброзу. MSCs показују потенцијал диференцијације у малигне ћелије и имају способност да подстичу раст и развој тумора. Секрецијом одређених хемокина и фактора раста делују на површинске рецепторе туморских ћелија и доводе до раста тумора. Имуносупресивни ефекат MSCs може додатно да подстакне раст и метастазирање туморских ћелија иако постоје резултати који показују да ове матичне ћелије могу и да подстичу јачи анти-туморск имуноски одговор. Терапија која се заснива на примени MSCs се повезује са минималним имунским одговором и минорном могућношћу да дође до њиховог одбацивања. Разлог лежи у ниској експресији МНС и дугог преживљавања графта у МНС-инкомпатабилним примаоцима. Међутим, трансплантација алогених MSCs може у одређеним ситуацијама да изазове јак имуноски одговор МНС-неусклађеног пацијента (114).

1.6.2. Мезенхималне матичне ћелије изведене из пародонталног лигамента (PDL-MSCs)

Мезенхималне матичне ћелије изведене из пародонталног лигамента (енгл. *Periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells*, PDL-MSCs) су специфична врста матичних ћелија које потичу из пародонталног лигамента, везивног ткива које окружује и подржава зубе. PDL-MSCs поседују јединствена регенеративна и имуномодулаторна својства која их чине идеалним за поправку и регенерацију повређених пародонталних ткива (115). PDL-MSCs су мултипотентне и самообнављајуће ћелије са способношћу брзе пролиферације и спонтане диференцијације у ћелије мезодермалног порекла (111). Могу се диференцирати у цементобласте (одговорне за формирање цемента), остеобласте (укључене у формирање костију) и фибробласте (неопходне за производњу везивног ткива). Овај огромни потенцијал диференцијације омогућава PDL-MSCs да допринесу регенерацији пародонцијума. Још једно важно својство PDL-MSCs је њихов капацитет самообнављања. Ове ћелије се могу делити и реплицирати, обезбеђујући одржив број мултипотентних ћелија за успешну поправку ткива (115).

Пародонталне болести, попут гингивитиса и пародонтитиса, могу довести до уништења пародонталних ткива, укључујући десни, пародонтални лигамент и алвеоларну кост. Алармини и молекуларни обрасци повезани са оштећењем (енгл. *Damage-associated molecular patterns*, DAMP), ослобођени из оштећених ћелија пародонцијум, активирају ендogene PDL-MSCs и индукују њихову диференцијацију у цементобласте, остеобласте и фибробласте, омогућавајући регенерацију пародонталног ткива. Слично томе, екзогене PDL-MSCs могу се користити за ћелијску терапију пародонталних болести. Штавише, PDL-MSCs су такође проучаване због свог потенцијала у регенерацији других оралних ткива, као што је зубна пулпа. PDL-MSCs се могу диференцирати у одонтобласте, који су одговорни за формирање дентина, тврдог ткива које чини главнину зуба. Коришћењем PDL-MSCs, могуће је регенерисати зубну пулпу и обновити функционалност оштећених зуба (116).

Поред тога, PDL-MSCs имају имуномодулаторна својства, што значи да могу регулисати штетан имуни одговор и смањити упалу. Ово је корисно у контексту инфламаторних пародонталних болести изазваних имуним ћелијама, јер ова стања често укључују преувеличан имуни одговор који доводи до уништења ткива (45). Супресијом штетног имунитета у усној дупљи, PDL-MSCs смањују текућу упалу, подстичу зарастање ткива и обнављају хомеостазу ткива. Стога се PDL-MSCs сматрају потенцијалним новим терапијским средствима у лечењу инфламаторних болести усне дупље, лихен плануса усне дупље или рекурентног афтозног стоматитиса. PDL-MSCs у усној дупљи су континуирано изложене различитим опасностима и стога на њихова регенеративна и имуномодулаторна својства могу утицати различити фактори (117).

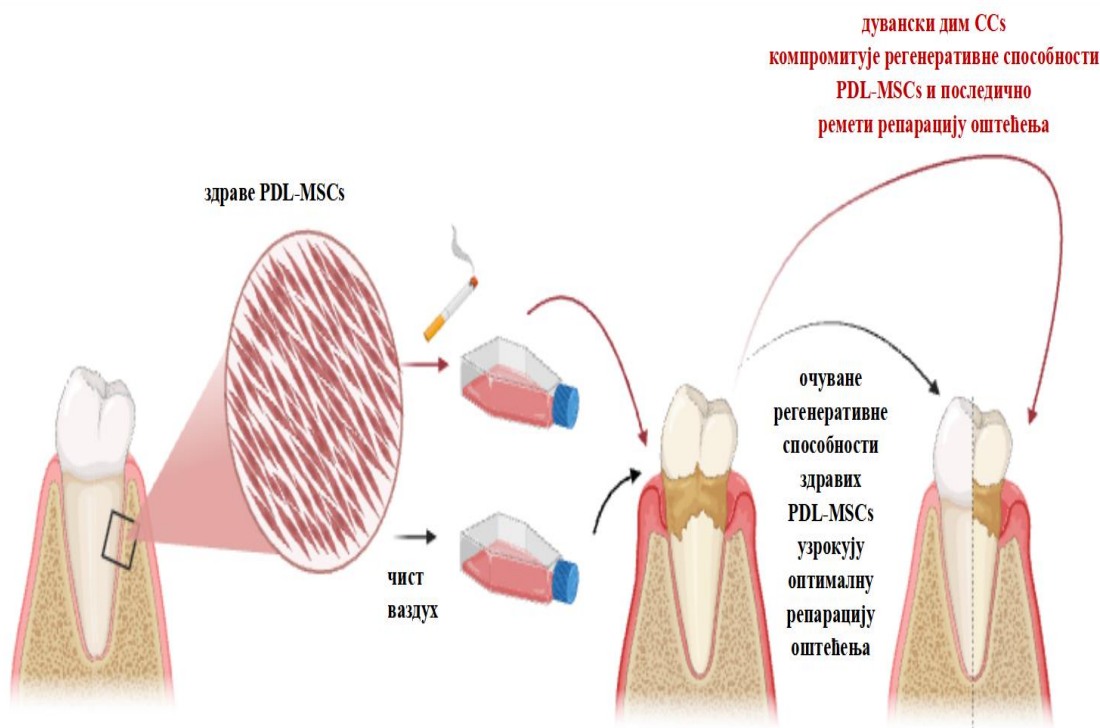
Матичне ћелије доприносе опоравку и регенерацији ћелија оштећених различитим факторима: болешћу, генетским факторима, повредом или старењем. У савременом добу, захваљујући континуираним научним напорима и истраживањима, матичне ћелије се користе у здравственим индикацијама које су се некада сматрале неизлечивим. Читав концепт ове нове гране медицине има за циљ не само излечење, него и очување здравља и превенцију болести. Методе регенеративне медицине се све више користе за обнављање оштећених ткива и органа попут коже, костију, хрскавице и срчаног мишића.

Ефикасност регенеративне терапије зависи од количине присутних матичних ћелија и њихове способности да испоље регенеративни ефекат (118).

1.6.3.MSCs и пушење

Никотин у основи делује као стимуланс, али са повећањем концентрације долази до развоја инхибиторног дејства. Токсичне ефекте на MSCs испољава у високим концентрацијама (10^{-5}), али у нижим концентрацијама (10^{-7}) не омета опстанак ћелија.

Никотин изазива промене у морфологији MSCs; долази до оштећења мембране једра и митохондрија и стварања вакуола у цитоплазми. Ове промене доводе и до различитих промена у функцији MSCs: адхезија, миграција, пролиферација, дуготрајно одржавање капацитета диференцијације *in vitro*, слаба експресија МНС молекула и самим тим мали ризик од одбацивања након алогене трансплантације, чине MSCs из коштане сржи погодним за терапијску примену. Зарастање рана код пушача након терапије има продужени ток. Пушење смањује ниво CD34+ прогениторских ћелија у крви. Активне компоненте у диму цигарета утичу на регенеративне потенцијале матичних ћелија и доводе до одложеног излечења. Никотин смањује пролиферацију MSCs. Такође, успорава миграцију и количину доступних хуманих MSCs што онемогућава регенерацију оштећења (Слика 4.) (119).



Слика 3. Утицај дуванског дима на потенцијани терапеутски ефекат PDL-MSCs.
Креирано помоћу BioRender.com

Дувански дим негативно утиче на хумане матичне ћелије и њихов развој. Никотин мења морфологију ћелије *in vitro* и смањује експресију одређених маркера плурипотенције (ОСТ-3/4). Утиче на ангиогенезу преко никотинских ацетилхолинских рецептора и узрокује одложено зарастање скелета након прелома тако што утиче на експресију гена кључних за процес зарастања костију (120). Никотин инхибира остеогену диференцијацију MSCs променом профила експресије microRNA (miRNA) и инхибицијом хемотаксе хуманих остеопрогениторних ћелија. Додатно, пушење доводи до супримирања везивања везивног ткива и колагених влакана и инхибира регрутовања матичних ћелија у ткива, услед чега се омета зарастање и регенерација (121).

Са фармаколошког аспекта, дувански дим смањује потенцијал излечења и негативно утиче на исход лечења (122).

Пушачи имају доживотни већи ризик од инфективних и неинфективних компликација у току хируршких операција и током зарастања рана. Ризици перзистирају и након престанка конзумирања цигарета. Ово говори о дуготрајном вазоконстрикторном утицају никотина и о утицају инхибиције инфламације и пролиферације у процесу регенерације ткива.

Након престанка пушења долази до побољшања инфламаторног одговора и смањења ризика од бактеријских инфекција у односу на активне пушаче (123).

Матичне ћелије изложене никотину у култури не показују ендогена својства матичних ћелија пушача цигарета. Реална дешавања се могу пратити уколико се матичне ћелије изолују директно из ткива пушача (118).

Многе експерименталне студије су показале да дим који потиче од CCs има штетне ефекте на PDL-MSCs, негативно утичући на њихов терапеутски потенцијал. Цигаретни дим садржи бројна токсична једињења и слободне радикале који могу изазвати оксидативни стрес у PDL-MSCs. Дим изведен из CCs нарушава одрживост и капацитет PDL-MSCs да се диференцирају у цементобласте, остеобласте и фибробласте. Стога, континуирано излагање дуванском диму CCs представља превентиван фактор ризика за развој и прогресију периодонталних болести, посебно гингивитиса и пародонтитиса.

1.7.ИНФЛАМАЦИЈА У ХРОНИЧНИМ ИНФЛАМАЦИЈСКИМ БОЛЕСТИМА

Системски инфламацијски одговор има фундаменталан утицај на прогресију и погоршање хроничних инфламацијских болести (124, 125). Континуирана активација имунских ћелија и масовно ослобађање медијатора инфламације доводи до уништавања паренхимских и ендотелних ћелија локализованих у различитим деловима целог тела, погоршавајући патологију постојећих оштећења (126). Продужена инфламацијска сигнализација је најчешће повезана са оштећеним механизмима поправке ткива и прекомерним таложењем колагена у виталним органима, последично узрокујући дисфункцију и фиброзу (125,126).

Додатно, штетан системски инфламацијски одговор може пореметити равнотежу између проинфламацијских и антиинфламацијских имунских ћелија у повређеним ткивима, доводећи до дисрегулације имунитета и оштећења имунолошке толеранције и селекције антигена (127). Системска упала, такође, може покренути или погоршати аутоимунски одговор (127). Поремећај имунолошке хомеостазе доводи до масовног ослобађања аутоантигена из оштећених паренхимских ћелија и активације аутореактивних лимфоцита, резултирајући развојем и прогресијом аутоимунских болести (124,127).

Дуготрајно излагање дуванском диму узрокује покретање системског инфламацијског одговора који последично промовише развој болести специфично изазваних имунским ћелијама (128-131). Дим CCs садржи многе штетне супстанце које могу негативно утицати на способност имунских ћелија да преживе, пролиферишу, производе инфламацијске цитокине и мигрирају у оштећена ткива (132).

Дувански дим CCs модификује способност неутрофилних гранулоцита да мигрирају и продукују ROS (133). Утицај дима CCs на макрофаге је неконзистентан кроз литературу: од подстицање инфламације преко M1 макрофага до супримирања упале и сензибилизације посредоване M2 макрофагима (134,135). Изложеност дуванском диму CCs дефинитивно утиче на стварање M1/M2 макрофага, али остаје нејасно који фактори утичу на смер поларизације. Повећано присуство алтернативно активираних M2 макрофага који поседују супримиран капацитет за фагоцитозу патогена узроковао би осетљивост пушача према инфекцијама (130,134). Изложеност дуванском диму CCs може утицати и на Т ћелије, узрокујући губитак функције и смањење способности секреције цитокина (135). На функцију цитотоксичних CTL и NK ћелија дувански дим утиче тако што ремети продукцију перфорина и гранзима и последично супримира елиминацију инфицираних и малигних ћелија (131). Изложеност дуванском диму CCs промовише експресију П и Е селектина на ендотелу крвних судова чиме се подстичу циркулишући леукоцити да мигрирају у инфламаторна ткива и органе (128).

Дакле, пушење је важан покретач ХОБП-а и других инфламацијских болести и малигнитета плућа. Додатно, узрокујући јачање системског инфламацијског одговора, пушење је важан фактор ризика погоршања плућних, али и других орган-специфичних и системских болести (136). Неконтролисан системски инфламацијски одговор праћен цитокинском олујом може узроковати појаву болести срца и крвних судова (атеросклероза), болести метаболизма (дијабетес) и аутоимунске болести (реуматоидни артритис) (136).

Сходно томе, идентификација фактора који индукују системски инфламацијски одговор, и начина ублажавања њихових штетних ефеката, може омогућити превенцију настанка и погоршања инфламацијских болести.

1.7.1. Дувански дим CCs и хронична опструктивна болест плућа

Пушење је један од најзначајнијих етиолошких фактора у настанку оштећења плућног паренхима и бројних болести плућа. Ткиво плућа је континуирано изложено бројним токсичним супстанцама и загађивачима присутним у ваздуху. Ови токсини узрокују оксидативни стрес на нивоу алвеоларног епитела и, посредством штетним инфламацијским одговором, индукују иреверзибилно оштећење плућног паренхима (137).

Дувански дим ССс, модификацијом способности имунских ћелија које су инфилтриране у оштећено ткиво плућа, повећава ризик од озбиљних инфламацијских (емфизем, фиброза) и малигних болести (138-140).

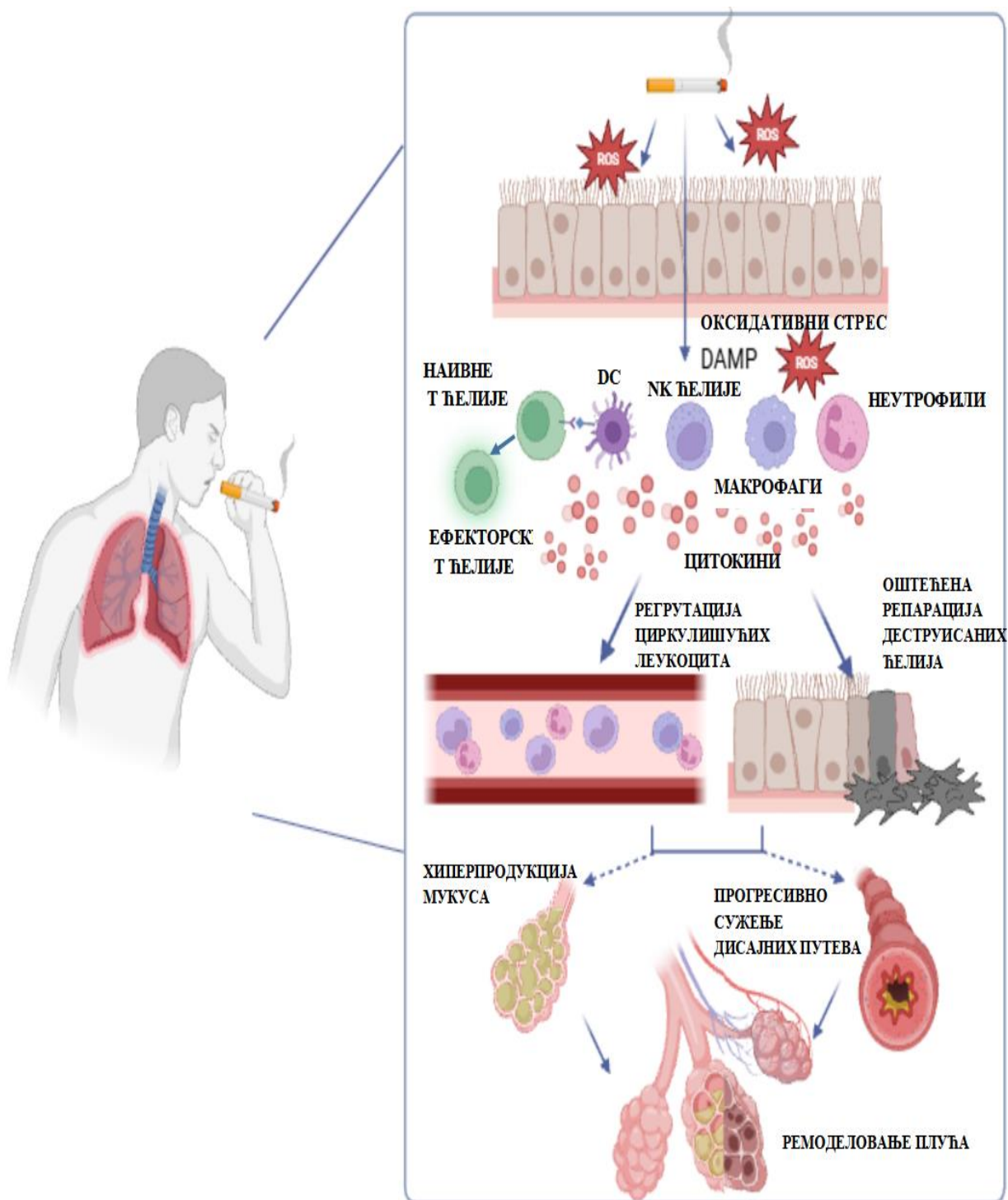
Алвеоларне епителне ћелије које су континуирано изложене дуванском диму ССс, као одговор на узроковано оштећење, ослобађају DAMP који активирају имунске ћелије и покрећу имунолошки одговор у плућима (132). Потом, имунске ћелије, због континуиране изложености дуванском диму, масовно секретују проинфламацијске цитокине. Цитокинска олуја узрокује непрекидну активацију имунских ћелија и дуготрајан штетан инфламацијски одговор у плућима (132). Оштећење имунских ћелија настаје услед негативног утицаја ССс на миграторни капацитет и ефекторске функције неутрофила, макрофага, дендритских ћелија (енгл. *Dendritic cell*, DC), Т, NK и NKT ћелија (141). Дувански дим узрокује алвеоларну дисрупцију тако што модификује експресију хемокина и секрецију алвеотоксичних молекула, попут азот-оксида (енгл. *Nitric oxide*, NO) и ROS, и проинфламацијских цитокина, попут фактора некрозе тумора- α (енгл. *Tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α), интерферона-гама (енгл. *Interferon-gamma*, IFN- γ), интерлеукина (IL-1 β , IL-6, IL-8) у имунским ћелијама. Последице долази до развоја озбиљне дисфункције плућа, ентитета који је чест код дугогодишњих пушача (141).

ХОБП карактерише перзистентно ограничење протока ваздуха услед сужавања дисајних путева и уништавање алвеола, процеси који могу бити појачани уколико су дисајни путеви континуирано изложени дуванском диму (Слика 5.) (142). Хронична инфламација покренута и промовисана дуванским димом узрокује погоршање симптома ХОБП-а: отежано дисање, звиждање у грудима ("wheezing"), интензивни кашаљ, хиперсекреција спутума (143,144).

У циљу превенције погоршања пушењем изазване дисфункције плућа, сви фактори ризика, укључујући дувански дим и друге егзогене и ендogene агенсе, који могу промовисати инфламацију морају бити уклоњени (145). Уколико је уклањање немогуће, важно је идентификовати начин на који се њихови штетни ефекти могу ублажити.

Међутим, континуирано пушење, односно изложеност оштећених плућа бројним токсинима и другим штетним супстанцама дуванског дима, може узроковати прогресивну инфламацију која ће резултирати оштећењем алвеоларног епитела и погоршањем ХОБП-а (146,147).

Оштећене алвеоларне епителне ћелије потом секретују проинфламацијске цитокине (TNF- α и IL-1 β) који, посредством промовисања експресије Е и П селектина на ендотелу, омогућавају леукоцитну инфилтрацију у инфламирајућа плућа (148-150). Th1 и Th17 лимфоцити, преко секреције IFN- γ и IL-17, узрокују масовну активацију фагоцита (неутрофила и макрофага) који преко каскаде ROS/оксидативни стрес оштећују плућни паренхим (148). Th2 ћелије, посредством цитокина IL-4 и IL-13, узрокују хиперплазију пехарастих (гоблет) ћелија и ремоделовање дисајних путева (149,150). Цитотоксичне CTL, NK и NKT ћелије покрећу програмирану смрт (апоптозу) у ћелијама алвеоларног епитела чиме се онемогућава размену гасова у плућима (146,148). Додатно, дувански дим активира никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енгл. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, NADPH) оксидазу која исцрпљује резерве свих молекула који штите ткиво од оксидативног стреса, чиме се ствара окружење погодно за апоптотске процесе (151).



Слика 4. Штетни утицаји дуванског дима CCs на нивоу плућа. Креирано помоћу BioRender.com

1.7.2. Дувански дим CCs и шећерна болест

Инфламација посредована имунским ћелијама је круцијални чинилац у развоју и прогресији дијабетес мелитуса (ДМ) (152-154). Деструкција бета ћелија панкреаса, изазвана имунским ћелијама које продукују проинфламацијске цитокине, узрокује инсулинску инсуфицијенцију која последично доводи до развоја дијабетеса (153,154). Поред имунских и панкреасних бета ћелија, важну улогу у генерисању инфламацијског одговора играју адипоцити. Адипоцити су имунорегулаторне ћелије које покрећу контролисани заштитни механизам имунитета преко активације индуцибилне синтазе азот-оксида (енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS) и инфламазома, домена који везује нуклеотиде (енгл. *Nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD), леуцином-богата понављања (енгл. *Leucine-rich repeat*, LRR), и пирин (енгл. *NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3*, NLRP3).

Повећана активација iNOS и NLRP3 индукује масовну секрецију проинфламацијских цитокина и цитотоксичних молекула NO и ROS (56).

Инфламазом NLRP3 има пресудну улогу у настанку и прогресији инфламације у панкреасу (153). У гојазности, метаболички стрес и акумулација масних киселина промовише активност инфлазома NLRP3 у адипоцитима и макрофагима (153). Активацијом инфлазома NLRP3 се покреће сигнална каскада која индукује секрецију проинфламацијских цитокина, попут IL-1 β , и јачање системског инфламацијског одговора који резултира дисрегулацијом метаболизма глукозе и дестабилизованом инсулинском сигнализацијом (153,155). Осим цитокина IL-1 β , активирани имунске ћелије (неутрофили и макрофаги) и адипоцити у дијабетесу секретују и друге проинфламацијске цитокине (IL-6 и TNF- α) који, модификацијом експресије гена за синтезу МНС молекула и секрецију цитокина про-Th1 (IL-12, IFN- γ) и про-Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-23), подстичу антиген-презентујућа својства DC, макрофага и В ћелија и последично појачавају активацију наивних Т, NK и NKT ћелија и генерисање проинфламацијских Th1/NK1/NKT1 и Th17/NK17/NKT17 ћелија. Додатно, активирани адипоцити и имунске ћелије производе и хемокине подфамилије CXC (CXCL-9, CXCL10) и CC (моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (енгл. *Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1/CCL2)), који промовишу експресију интегрина и селектина П и Е на ендотелу и олакшавају миграцију циркулишућих леукоцита у инфламирано ткиво панкреаса (56,152-154).

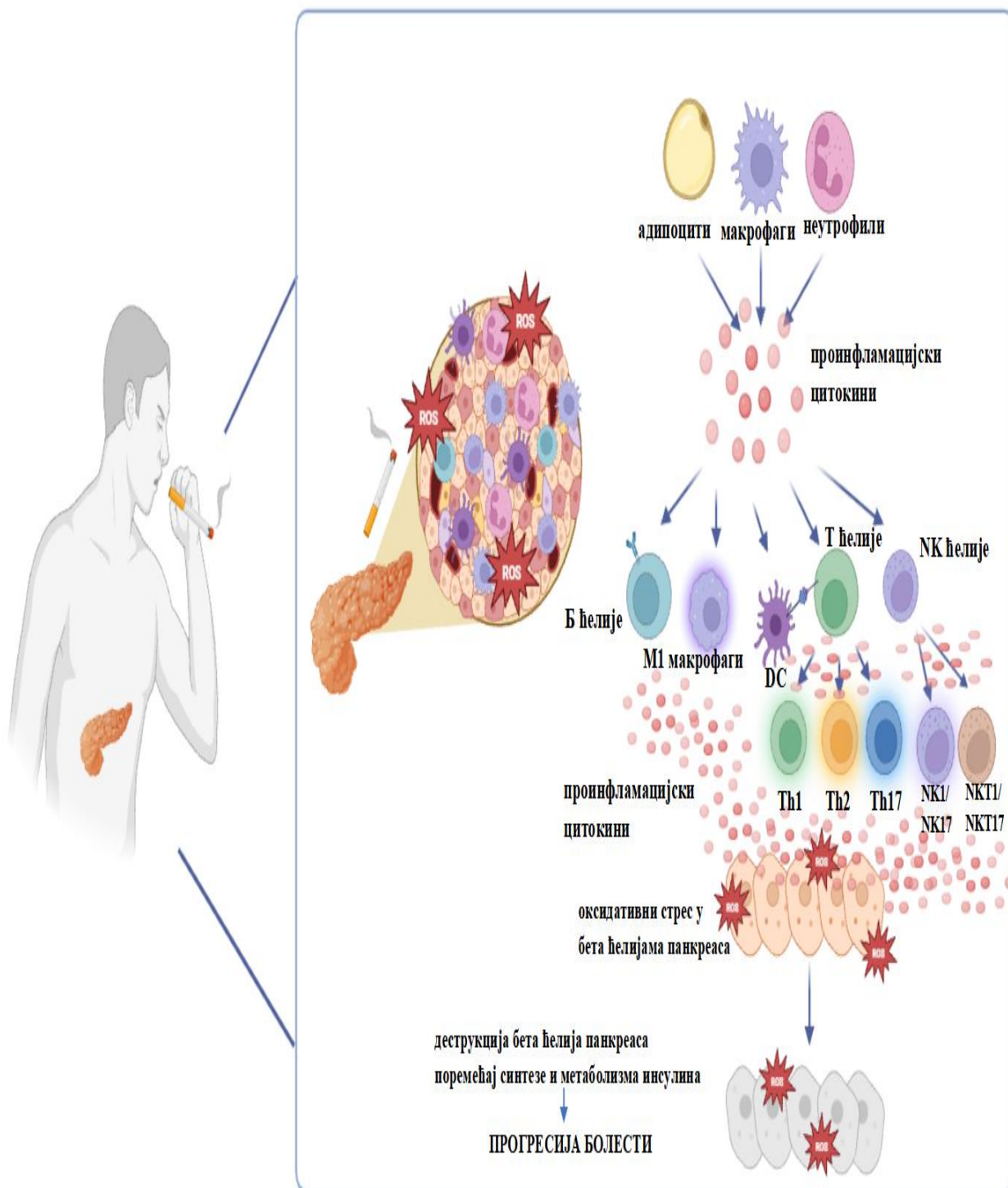
Инфилтација ткива панкреаса ефекторским имунским ћелијама узрокује развој инфламације (156). Наиме, активирани Th1/NK1/NKT1 и Th17/NK17/NKT17 ћелије, секрецијом проинфламацијских цитокина IFN- γ и IL-17, подстичу активност iNOS и NLRP3 у фагоцитима панкреаса чиме се подстиче додатна продукција проинфламацијских цитокина и последично одржава и појачава постојећа инфламација. Хронична инфламација узрокује деструкцију панкреасних ћелија које луче инсулин, резултујући инсулинском резистенцијом и хипергликемијом које покретањем ланчаних метаболичких поремећаја узрокују развој дијабетеса (Слика 6.) (153).

Хронична хипергликемија иницира оштећење ендотела и може узроковати развој макроваскуларних (коронарна и периферна артеријска болест, срчани удар, мождани удар) и микроваскуларних (нефропатија, неуропатија, ретинопатија) компликација (157).

Ове компликације могу угрозити живот пацијента оболелог од дијабетеса, тако да је неопходно идентификовати све факторе који одржавају и јачају хипергликемију и, уколико је то могуће, минимизирати изложеност пацијента њима или ублажити њихове штетне ефекте (157).

Дувански дим CCs негативно утиче на зреле адипоците, ћелије које секретују хормоне и регулишу метаболизам глукозе и липида, чиме погодује настанку инсулинске резистенције (158,159). Катран и СО, најпознатије токсични конституенти дуванског дима, узрокују оксидативни стрес, чиме ремете имунорегулаторне способности адипоцита (159). Додатно, ови дувански токсини ремете сигнализацију зависну од митоген-активираних протеин киназа (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), Јанус киназе (енгл. *Janus kinase*, JAK) и нуклеарног фактора капа бета (енгл. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B), последично модификујући функцију и фенотип имунских ћелија (160). Дувански дим ремети активност фагоцита, неутрофила и макрофага, смањујући одбрану имунитета од патогена (161,162). Такође, дуготрајна изложеност дуванском диму ремети и функцију Т лимфоцита, тако што промовише диференцијацију наивних у ефекторске Th1, Th2 и Th17 ћелије у инфламираном панкреасу. Са друге стране, генерисање имуносупресивних Т регулаторних ћелија (енгл. *Regulatory T cells*, Tregs) је инхибирано. Tregs експримирају FoxP3 (енгл. *Forkhead box P3*), који као регулатор генске експресије, има кључну улогу у супримирају постојеће инфламације у ткиву панкреаса.

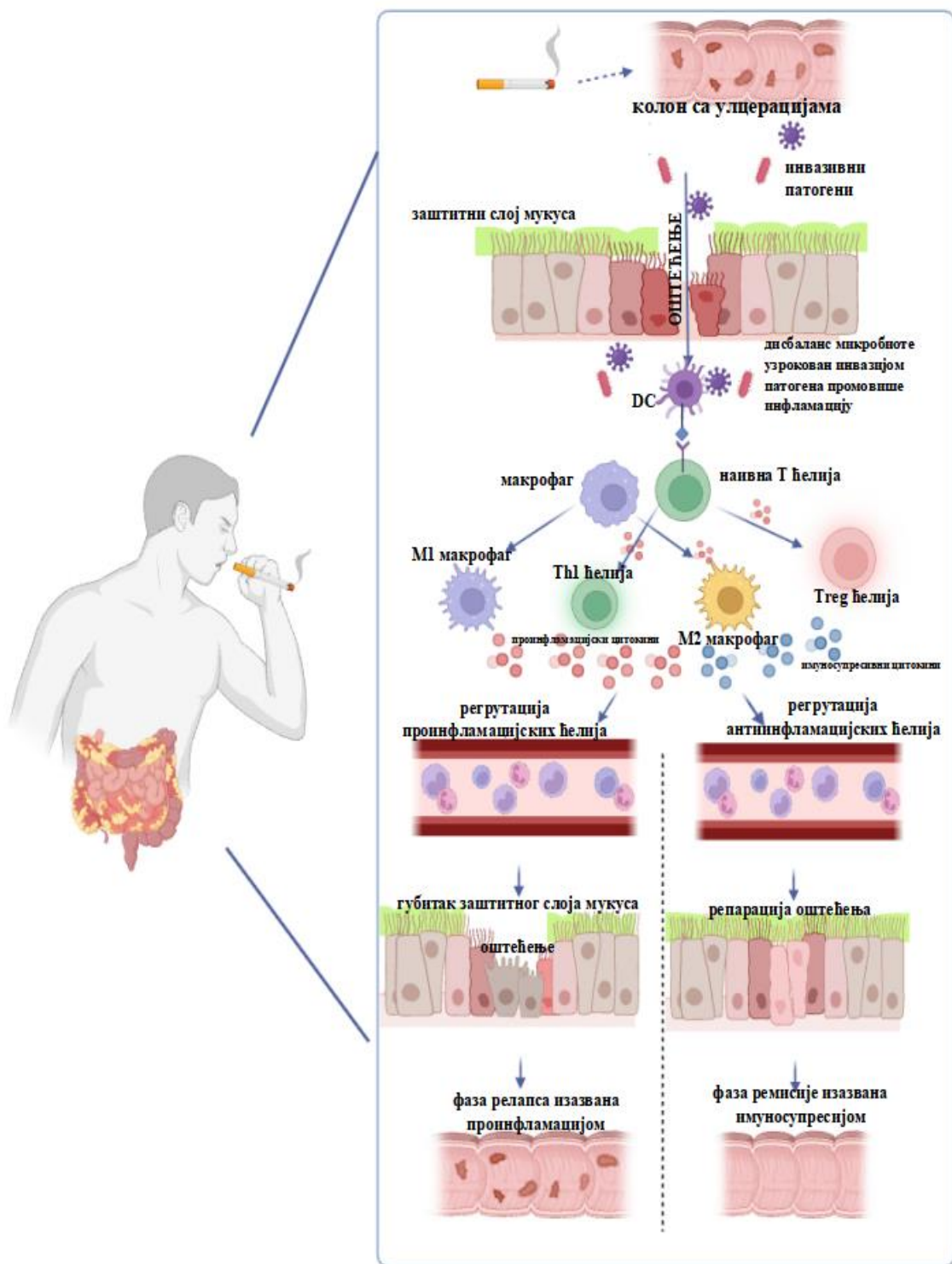
Дакле, наведени ефекти дуванског дима CCs на инфламацијски одговор може објаснити детектован већи ризик пушача да оболе од дијабетеса у поређењу са непушачима (158).



Слика 5. Ефекти дуванског дима CCs на нивоу панкреаса. Креирано помоћу BioRender.com

1.7.3. Дувански дим CCs и улцерозни колитис

Улцерозни колитис (УК) карактерише инфламација дебелог црева покренута имунским ћелијама која прогредира до улцерација ткива (163). Хронична инфламација ремети интегритет епителне мембране црева и њену заштитну улогу од инвазивних патогена. Када инфективни антигени прођу кроз инфламацијом нарушену епителну баријеру, активирају се антиген-презентујуће ћелије које последично генеришу ефекторше Т лимфоците који одржавају инфламацију колона (163). Зрели Т лимфоцити секрецијом IFN- γ , IL-4, IL-17 и других проинфламацијских цитокина накнадно активирају фагоците и јачају инфламацију (164). Дуготрајна инфламација може узроковати улцерације, едем, ерозије, деструкцији пехарстих ћелија и крипти, узрокујући карактеристичну клиничку слику УК: дијареја, стомачни болови и ректално крвављење (165). У патогенези УК је карактеристична смена инфламацијске фазе и фазе рековаленсенције (Слика 7.). У фази опоравка долази до масовне продукције имуносупресивних ћелија (толерогене DC, M2 макрофаги и Treg) које продукују антиинфламацијске цитокине, попут IL-10, IL-35 и TGF- β , чиме се супримира штетни инфламацијски одговор и омогућава зарастање оштећене слузокоже колона (165,166). Дувански дим CCs има потенцијал да штити оштећен епител колона од програмиране ћелијске смрти, супримира инфламацију и превенира развој прогресије УК, али тачан механизам дејства није потпуно објашњен (132,141, 167-170).



Слика 6. Ефекти дуванског дима CCs на смену фаза релапса и ремисије УК. Креирано помоћу BioRender.com

Коначно, дуготрајна и континуирана изложеност дуванском диму CCs несумњиво модулира текућу системски и локални инфламацијски одговор преко утицаја на функцију и фенотип имунских ћелија, последично изазивајући каскаду догађаја који утичу на настанак и прогресију хроничних инфламацијских болести, укључујући ХОБП, ДМ и УК.

1.8.ЕЛЕКТРОНСКИ УРЕЂАЈИ ЗА ИСПОРУКУ НИКОТИНА

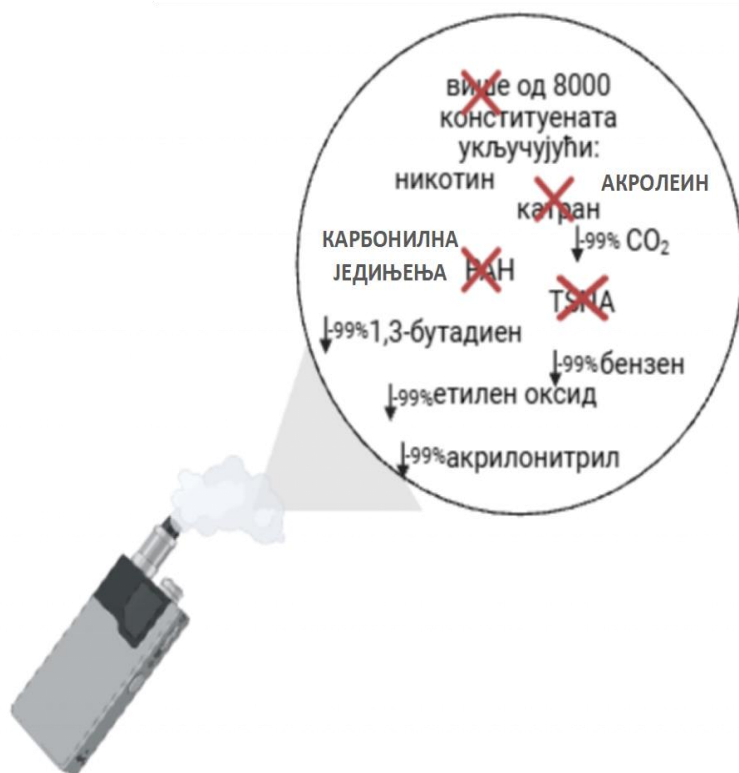
Инциденца болести повезаних са употребом дувана, као и морталитет, значајно се смањују са престанком пушења (10). Престанак пушења доказано повећава квалитет живота и смањује оксидативни стрес и инфламацијску реакцију у организму бившег пушача. У циљу смањења и престанка пушења су произведени електронски уређаји за испоруку никотина (енгл. *Electronic nicotine delivery systems*, ENDS) (171). Током последњих неколико година, велики број пушача, у циљу избегавања штетних ефеката пушења, замењује CCs ENDS-ом (електронске цигарете, производи за загревање дувана, вејпови) (172). Бивши корисници CCs, који се одлуче на дуванску алтернативу, користе ENDS на начин који одржава сличне нивое никотина као током употребе CCs (173,174). Међутим, с обзиром на велико интересовање пушача за одвикавање потпомогнуто ENDS-ом, неопходно је испитати њихове здравствене ефекте (1,10). Детаљно објашњење потенцијалног дејства ENDS-а, односно токсичних конституента аеросола који ENDS генерише, на покретање системског инфламацијског одговора који води ка почетку и развоју болести, омогућило би адекватну процену потенцијалног ризика и превенцију штетности (1). Успешност ENDS-употребе у одвикавању од пушења до данашњег дана није оправдана убедљивим доказима (60).

ENDS су дизајнирани да буду слични по облику и функцији CCs и у почетку су промовисани као потпуно безбедни уређаји јер не садрже катран и друге штетне састојке доступне у дуванском диму (171). Међутим, нису доступни релевантни подаци који показују оправданост њихове примене, односно гарантују већу ефикасност у терапији одвикавања од пушења у односу на тренутно доступну фармакотерапију (175).

Највећа предност ENDS у односу на CCs је механизам функционисања: изостанак процеса сагоревања и производа дуванског дима (1). Ови уређаји користе знатно ниже температуре, до 350 °C, чиме се избегава сагоревање и генерисање дуванског дима као код CCs (>600 °C) (174). ENDS најчешће изгледају као оловка која се напаја литијум-полимерском батеријом и у комори за испаравање са грејним елементима загрева дуван или уље до одређене температуре при чему се као крајњи продукт процеса добија аеросол који пушач удише. Коришћењем ENDS-а се потпуно симулира бихејвиорално и физичко искуство пушења и удисање дуванског дима (5,32). Корисници покрећу процес загревања дувана/уља активацијом дугмета за напајање уређаја (10). Аеросол се апсорбује кроз плућа и крвотоком испоручује никотин можданом ткиву већ после пар секунди (5). Новији уређаји нуде побољшано искуство јер корисници могу сами прилагодити процес испаравања аеросола модификацијом отпора и температуре саме конструкције и тако интензивирати доживљај (10). Варијације у укусу и концентрацији никотина додатно омогућавају персонализацију ENDS употребе (11). Коришћење ENDS-а не доводи до стварања пепела и других сличних остатака који могу угрозити животну средину.

Дуванске патроне се рециклирају, тако да не доприносе загађењу екосистема. ENDS уређаји могу, поред дуванских патрона, да се базирају на никотинској течности уљане конзистенције, која такође загревањем генерише аеросол (10). Иако могу бити различите формулације, ENDS дуванске алтернативе не емитују непријатне мирисе (32).

Због различитих метода обраде дувана, дим добијен из CCs и аеросоли добијени из ENDS садрже различите хемијске састојке (Слика 8.) (176). Дуван се у ENDS-у загрева до одређене температуре, обично између 250 и 350 °C чиме се генерише аеросол (174,177). Ова температура је довољна да ослободи никотин и друге хемикалије без стварања штетних нуспроизвода сагоревања (174,177). Али, аеросол ENDS-а садржи широк спектар супстанци насталих термичком разградњом, попут акролеина, карбонилних једињења (1, 5) и субмикронских честица (174). Дакле, ENDS аеросол садржи штетне и потенцијално штетне супстанце али у различитим концентрацијама у односу на дувански дим (174,176). Концентрације CO, важног токсичног једињења, су око 99% мање у аеросолу него у дуванском диму (176). Коришћење ENDS-а не ствара катран. Конституенти дуванског тима попут 1,3-бутадиена, бензена, етилен оксида и акрилонитрила су присутни у аеросолу ENDS-а у концентрацији од 1% у односу на концентрације у дуванском диму (176,178). Такође, ENDS се повезују са мањим нивоом токсичних супстанци из групе тешких метала (никл, олово и кадмијум) и металоида у односу на CCs (179). PAH и TSNAs, конституенти дуванског дима CCs који доводе до малигне трансформације превасходно на нивоу плућа, а који настају као нуспродукт сагоревања дувана, нису присутни у аеросолу ENDS-а или су присутни у јако ниским концентрацијама (180,181).



Слика 7. Састав аеросола ENDS-а у односу на састав дуванског дима CCs. Креирано помоћу BioRender.com

Међутим, због конституената који се налазе и у аеросолу ENDS-а и у дуванском диму CCs, обе врсте дуванских производа највероватније делују преко аналогних молекулских механизма (182). Дакле, након преласка на ENDS, изложеност пушача опасним конституентима дуванског дима је значајно смањена, са изузетком нивоа никотина који су довољни да задовоље потребе пушача и превенирају симптоме и знаке апстиненцијалног синдрома (174,183-185).

ENDS аеросол, преко токсичних једињења које садржи иако у нижим концентрацијама него дувански дим, може негативно утицати на различите системе органа (174). Штетни ефекти ENDS-а су детектовани на нивоу оралне дупље (5,32), респираторног (186,187), нервног (188,189), репродуктивног (190) и дигестивног система (191,192).

Усна дупља је примарно подручје које је изложено дуванском диму CCs и аеросолу ENDS-а. Дувански дим је већ препознат као узрочник дисруптора оралног здравља, али ефекти аеросола ENDS-а нису довољно истражени (60). Детектовано је дејство ENDS-а на промоцију инфламације десни (5), развоја болести слузокоже и пародонта, као и каријеса и пребојености зуба (32). Изложеност аеросолу ENDS-а преко ослобађања ROS узрокује различите ћелијске промене, морфолошке, пролиферативне и миграторне. Континуирана инфламација посредована ENDS-ом може изазвати улцерације у усној дупљи и повећати ризик од оралног карцинома (11). Није доступно довољно резултата који би показали побољшање пародонтопатије или опоравак након преласка са CCs на ENDS (5). Додатно, постоје резултати истраживања који указују да не постоји разлика између периодонталног здравља непушача и ENDS корисника (193-195). Недоследност у доступним резултатима онемогућавају прецизно дефинисање ефеката ENDS-а на орално здравље.

Поред оралне дупље, изложеност аеросолу ENDS-а узрокује низ снажних инфламацијских реакција са ткивима прве линије контакта, укључујући плућа и дисајне путеве. Иритација дисајних путева праћена кашљем и диспнејом је чест симптом корисника ENDS-а. У зависности од дужине конзумације ENDS-а, уочена је симптоматологија различитог нивоа, сугеришући да постоји дозна-зависност ефеката ENDS-а. Удисање честица из аеросола ремети пермеабилност епитела дисајних путева, узрокујући прилив инфламацијских ћелија и развој бронхиолитиса или пнеумонитиса. Хронично удисање аеросола подстиче секрецију ROS и медијатора инфламације (11). Оксидативни стрес изазван аеросолом ENDS-а може покренути повећану продукцију мукуса и деструкцију алвеоларних ћелија (187), погодујући смањењу проходности и повећања отпора дисајних путева (54). Континуирана употреба ENDS-а узрокује хроничну инфламацију која доводи до ремоделовања и опструкције дисајних путева, што последично повећава ризик од развоја ХОБП-а (54,187) и учесталих егзацербације астме (186). Аеросол ENDS-а ремети функцију имунског система, при чему смањујући ефикасност имунског одговора у одбрани од патогена може повећати ризик и учесталост респираторних инфекција (11). Дакле, детектовани ефекти су слични ефектима узрокованим дуванским димом CCs, али уз потврђену реверзибилност оштећења плућне функције након престанка конзумације ENDS-а (54). Са друге стране, постоје докази који сугеришу да би конзумација ENDS-а могла повећати ризик од карцинома плућа (196). Неопходно је спровести додатна истраживања која би потврдила доступне резултате и испитала плућну функцију након дуготрајног мониторинга бивших пушача и ENDS корисника.

На нивоу нервног система, аеросол ENDS-а може узроковати главобољу, поремећај расположења (анксиозност и раздражљивост) и проблеме са локомоторним вештинама код експерименталних мишева (5,189). Међутим, доступни су резултати који показују да аеросол ENDS-а не изазива промене расположења и понашања код мишева мушког пола (188). Неконзистентност доступних резултата захтева спровођење додатних студија чији ће фокус испитивања бити на ефектима ENDS-а на нервни систем.

На нивоу репродуктивног система ENDS може код мушкараца узроковати еректилну дисфункцију а код жена може онемогућити имплантацију плода (190). Код трудница које су користиле ENDS је детектован већи ризик од хормоналне дисфункције, феталне реапсорпције (197) и спонтаних побачаја у односу на труднице које су непушачи (190). Међутим, није детектована статистички значајна разлика у ризику од превременог порођаја између непушача и ENDS корисника (198,199). 2

Конзумација ENDS-а на нивоу дигестивног система најчешће узрокује негативне ефекте попут мучнине, повраћања и бола (5,11). Хронична изложеност аеросолу ENDS-а ремети микробиоту црева (191), промовише инфламацију (192), узрокује масивну инфилтрацију имунским ћелијама и последичну деструкцију епителних ћелија колона (191,200). Међутим, с обзиром да ENDS допрема сличне нивое никотина као и CCs, доступни су и резултати који потврђују позитивна дејства ENDS-а и никотина на инфламацију дигестивног система, супресију онкогенезе и прогресије колитиса (201,202). Додатно, упркос доказаном позитивном дејству никотина на УК (203), постоје резултати који повезују употребу ENDS-а са рецидивирајућем УК (5,11), што указује на неопходност спровођења нових студија које би разјасниле недоумице у ефектима ENDS-а.

Велике варијације у резултатима су уочене и у студијама које су испитивале ефекте ENDS-а на кардиоваскуларни систем. Прелазак пушача на ENDS, смањује ризик од развоја и прогресије кардиоваскуларних болести, што је потврђено мониторингом клиничких биомаркера (174). Са друге стране, постоје подаци да употреба ENDS-а може убрзати рад срца и пораст крвног притиска иако дуготрајне промене рада срца и озбиљна срчана дисфункција нису детектоване (5,171,204). Употреба ENDS-а, услед присуства тешких метала, акролеина и формалдехида, може покренути и мутагенезу ДНК што последично моће довести до развоја канцера (205,206), али нема довољно клиничких студија које би потврдиле ове ефекте.

Дакле, иако је концентрација токсина значајно нижа у аеросолу у односу на дувански дим, изложеност ENDS-у може узроковати нежељене ефекте на нивоу различитих система органа. Најучесталији симптоми су локализовани на ткивима која представљају прву линију контакта са аеросолом: усна дупља и дисајни путеви. Услед апсорпције конституената аеросола у крвоток, детектовани су и ефекти ENDS-а и на другим ткивима и органима (207,208). Докази о здравственим ефектима и безбедности ENDS-а су ограничени и неконзистентни, са великим варијацијама у детектованим ефектима на здравље. Иако се сматрају безбеднијом алтернативом, због нижих укупних нивоа токсичних конституената у односу на CCs, њихов здравствени утицај је предмет дебате у академској заједници. Неопходне су лонгитудиналне, кохортне студије чији резултати ће омогућити јачање закључака о ENDS-посредованој редукацији штетности. Важно је нагласити да је, услед претходне конзумације CCs код највећег броја пацијената укључених у истраживања, отежано успостављање узрочно-последичне везе између детектованих клиничких симптома са коришћењем ENDS-а, јер постоји могућност да је здравствени ефекат претодно узрокован дуванским димом CCs.

Додатни проблем је истовремено коришћење ENDS и CCs, јер ENDS корисници, у покушају да престану са пушењем, не користе искључиво само алтернативу (174), што може дати конфузне резултате.

Тренутно није доступно довољно података и доказа који би недвосмислено повезали употребу ENDS-а са негативним клиничким исходима и штетним ефектима. Неопходно је спровести додатне студије које ће проценити да ли CCs и ENDS посредством сличних ћелијских и молекулских механизма испољавају потенцијалну токсичност. Додатно, важно је испитати различите аспекте утицаја CCs и ENDS-а како би њихови ефекти били потпуно идентификовани и прецизно објашњени.

У овој докторској дисертацији ће бити испитани молекулски механизми одговорни за исходе и ефекте ENDS-генерисаног аеросола и дуванског дима CCs на регенеративни потенцијал PDL-MSCs и модулацију фенотипа и функције имунских ћелија одговорних за развој и прогресију хроничних инфламацијских болести (ХОБП, ДМ, УК).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је усмерен на утврђивање утицаја конценционалних цигарета и електронских уређаја за испоруку никотина на регенеративни потенцијал мезенхималних матичних ћелија локализованих у периодонталном лигаменту које имају значајну улогу у репарацији оштећења изазваних континуираном излагању различитим штетним срединским факторима. Истраживање ће испитати и утицај дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на модулацију фенотипа и функције имунских ћелија одговорних за прогресију хроничних инфламацијских болести, са фокусом на хроничну опструктивну болест плућа (ХОБП), дијабетес (ДМ) и улцерозни колитис (УК).

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити утицај дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на вијабилност, пролиферативни капацитет и имуномодулаторну способност PDL-MSCs.
2. Испитати утицај дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на фенотип и функције ћелија имунског система одговорних за прогресију ХОБП.
3. Испитати утицај дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на фенотип и функције ћелија имунског система одговорних за прогресију ДМ.
4. Испитати утицај дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на фенотип и функције ћелија имунског система одговорних за прогресију УК.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Конзумација дувана и изложеност дуванском диму CCs повезани су са значајним здравственим ризицима. Међутим, доступни су контрадикторни резултати и ограничени су закључци о ефектима аеросола алтернативних дуванских уређаја (ENDS). Због разумевања и компарације ефеката дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а, спровели смо серију истраживања, укључујући *in vitro* и *in vivo* студију, на експерименталним животињама (*Mus musculus*) и људима, како бисмо анализирали њихов потенцијални утицај на здравље.

Експериментални део ове докторске дисертације реализован је у оквиру два међународна пројекта: „Ефекти електронских система за испоруку никотина на фенотип и функцију имунских ћелија пацијената са хроничним инфламацијским болестима“ (бр. W3-032) и „Replica 2.0“ (бр. COE1-05).

3.1. *In vitro* студија

3.1.1. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелија

Ћелијска линије хуманих PDL-MSCs пропагинара је у адекватним условима: у инкубатору 5% CO₂ на 37 °C) у стандардном DMEM медијуму за културу (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). са додатком 10% феталног телећег серума (енгл. Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mmol/l L-глутамин, 100 IU/mL пеницилин, 100 mg/mL стрептомицин, 1 mmol/l не-есенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Свеж медијум је додат ћелијама на сваких 2-4 дана, до достизања конфлуентности од 70–80%, након чега су ћелије пасажирене.

У циљу пасажирења, након достизања 80% конфлуентности флашка T-25 (25 cm³) (Sarstedt, Newton, SAD) и испирања помоћу фосфатног пуфера (енгл. *Dulbecco's Phosphate Buffered Salline*, DPBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), ћелије су третиране 0.25% трипсином суплементираног са 1 mM етилендиаминететрасирћетном киселином (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (Gibco BRL, Grand Island, NY) раствореног у DPBS-у у трајању од 3 минута у инкубатору /5% CO₂, 37 °C). Како би се прекинула ензимска реакција покренута трипсином, додато је 6 ml DMEM-а суплементираног са 10% FBS-а. Ћелије су попут центрифугиране на 300 g 5 минута, двапут испране а потом ресуспендоване у DMEM-у. Одређивање вијабилности ћелија, односно броја живих ћелија, извршено је помоћу раствора 0,1% trypan-blue-а коришћеног у односу 1:1 са ћелијском суспензијом. Бројање је извршено под светлосним микроскопом помоћу коморе са угравираним пољима по Türker-Bürki. Наиме, живе ћелије са интактном мембраном не пропуштају хромофору, за разлику од мртвих ћелија које се боје плавом бојом trypan-blue-а. Укупан број ћелија/ml израчунат је по формули:

$$\frac{\text{број ћелија}}{\text{број поља коморе}} \times 0,5 \times 10^6$$

За експерименте су коришћене ћелије у пасажу 3.

3.1.2. Генерисање третмана - дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а

Ћелије су изложене дуванском диму CCs и аеросолу ENDS-а помоћу Borgwaldt машине за пушење LM1 и машине за вејпинг LM4E (Hamburg, Germany). За генерисање дуванског дима су коришћене референтне цигарете 1R6F (Универзитет у Кентакију) које поседују 1.896 mg никотина по цигарети под интензивним режимом пушења Health Canada Intense (HCl=55/2/30; укупна запремина удисаја од 55 mL у трајању од 2s (27,5 mL/s), са учесталостићу удисаја од 30 s, профил звонастог облика и блокирани отвори за филтер) кроз укупно девет “удисаја” и дужину кундака $36 \pm 0,5$ mm. по свакој од укупно 5 цигарета. Режим пушења HCl је еквивалентан ISO 20778 (208). Према препорукама ISO 3402:1999, 1R6F су складиштене у фрижидеру и најмање 48h пре коришћења пребачене у инкубатор са одговарајућим условима средине (температура 22 ± 1 °C и влажност ваздуха $60 \pm 3\%$) (209).

У циљу достизања исте количине никотина, LM4 машина за вејпинг је генерисала 12 “удисаја” из једног IQOS патрона (енгл. *Heatstick*) под адекватним режимом пушења ISO/TR 19478-2:2015 (HCl =55ml/30s, без блокираних отвора филтера) за укупно 5 патрона (210). Коришћен је IQOS 3 DUO уређај са Heets „Sienna selection“ са садржајем никотина од 0,5mg/Heatstick.

Дувански дим и аеросол су захваћени у 20 ml DMEM-а при чему су добијени концентровани водени раствори (енгл. *Aqueous aerosol extracts*, AqE) означени као 100% радни раствор (енгл. *Stock*). У одговарајућем односу, stock је разблажен DMEM-ом, при чему је добијен распон AqE концентрација за излагање ћелија (25, 50, 75 и 100%). Један дан након засејавања PDL-MSCs у плејтовима, DMEM из бунарића је замењен филтрираним AqE медијумом у различитим концентрацијама (филтер од 0,2 μ m) (128).

3.1.3. Тестови цитотоксичности

Тестови пролиферације MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA) и вијабилности–тест уноса неутралне црвене боје (енгл. *Neutral red uptake*, NRU) су коришћени за процену токсичних ефеката дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на PDL-MSCs. Здраве PDL-MSCs су култивисане у стандардном DMEM-у, а оне изложене само свежем и чистом ваздуху су коришћене као контролне ћелије. PDL-MSCs су засејане у концентрацији 1×10^4 ћелија/100 μ L по бунарчићу (енгл. *Well*) микротитар плоча са 96 поља са равним дном (96-well плејтови) (Sarstedt, Newton, SAD). Следећег дана медијум је уклоњен, коришћено је 100 μ L претходно загрејаног DPBS-а за испирање ћелија које су затим третиране различитим концентрацијама водених аеросолних екстраката добијених од CCs и ENDS-а. Свака концентрација сваког третмана је добијена серијским разблажењем у DMEM медијуму до концентрација 25, 50, 75 и 100% и испитивана је у трипликату.

За NRU тест, третиране ћелије су, након засејавања, биле инкубиране 24 сата на 37°C у атмосфери од 5% CO₂. NR раствор (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) је припремљен у DMEM-у ком је додат пуфер хидроксиетилпиперазин етансулфонска киселина (енгл. *2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*, HEPES) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) један дан пре теста и стављен у инкубатор преко ноћи. Следећег дана, раствор

NR (150 μ L/бунарићу) је филтриран кроз филтер дијаметра 0,2 μ m и додат ћелијама након уклањања супернатанта и испирања DPBS-ом.

После инкубације од 3 сата, раствор NRU је уклоњен, бунарићи су испрани DPBS-ом, и додато им је 150 μ L адекватног раствора за уклањање боје (50% етанол, 49% дестилована вода, 1% глацијална сирћетна киселина). Плоче су мешане на шејкеру 10 минута и оптичка густина је очитана на 540nm помоћу референтног филтера од 630nm (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, Santa Clara, CA, USA).

За MTS тест, ћелије су инкубирани у стандардним условима (на 37°C у атмосфери од 5% CO₂) током 72 сата. Након инкубације, супернатанти су уклоњени, ћелије су испране помоћу DPBS-а, и 20 μ L MTS раствора је додато у сваки бунар, након чега су ћелије инкубирани још 3 сата у инкубатору. Плоче су потом мешане 10 минута на шејкеру, након чега је мерена апсорбанца на 490nm (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, Santa Clara, CA, USA).

3.1.4. Мерење цитокина у супернатанту

Комерцијални ELISA (енгл. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) китови су коришћени за мерење цитокина (TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, IL-10) у супернатантима према утврђеном протоколу произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

По 100 μ l препоручене концентрације радног раствора антитела за препознавање и везивање циљаних цитокина (енгл. *Capture antibody*) наливено је у 96-well плејтове (Sarstedt, Newton, SAD). Сваки плејт (или плоча) је прелепљен адхезивном фолијом, како би се спречило испаравања реагенса, и остављен на собној температури преко ноћи како би се антитело залепило за дно бунарића и у наставку протокола детектовало присутне цитокине у узорцима. Након инкубације су плоче испране комерцијалним пуфером за испирање (енгл. *Washing Buffer*) и наливен је одговарајући реагенс (300 μ l) који ће спречити неспецифично везивање (енгл. *Reagent Diluent*, RD или енгл. *Blocking Buffer* (DPBS + 1% говећег серумског албумина (енгл. *Bovine serum albumin*, BSA))). Након инкубације од сат времена на собној температури, плоче су испране и наливени су узорци и стандарди, након чега је уследила инкубација од два сата на собној температури. Стандарди су растворени у DPBS-у (pH 7.2) на начин да се добију највеће препоручене концентрације цитокина (pg/ml) које су неопходне за конструисање стандардне криве, серијским разблажењем у 8 тачака у препорученом растварачу и прерачунање финалних концентрација цитокина које су детектовани у узорцима. После инкубације и испирања, плоче су наливене антителом за детекцију у волумену од 100 μ l препоручене радне концентрације (енгл. *Detection antibody*) и остављене два сата на собној температури. Након испирања, у бунариће је додато 100 μ l HRP-коњугованог стрептавидина (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*, Streptavidin-HRP) реагенса у препорученој радној концентрацији, након чега је следила инкубација од 20 минута на собној температури при чему су плоче заштићене од директног излагања светлости. Након испирања, додато је 100 μ l раствора супстрата (енгл. *Substrate solution*), плоче су заштићене од светлости и инкубирани још 20 минута након чега је додато 50 μ l комерцијалног раствора који стопира реакцију (енгл. *Stop solution*). Плоче су неколико минута смештене на шејкер у циљу што боље хомогенизације и након тога је мерена апсорбанца на таласној дужини од 450nm (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, Santa Clara, CA, USA). Детектоване вредности оптичке густине су умањене за измерену вредност следеће пробе (енгл. *Blank sample*) у виду дејонизоване воде. Помоћу стандардне криве стандарда и једначине која

је добијена из ње, израчунате су концентрације цитокина у сваком појединачном бунарићу, односно узорку. Сва мерења су обављена у трипликату.

3.1.5. Ко-култура PDL-MSCs са Т лимфоцитима изложених CCs и ENDS-у

Ко-култура PDL-MSCs са Т ћелијама, изолованим помоћу кита за изолацију хуманих Т лимфоцита (Pan human T cell isolation kit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) и магнетном сепарацијом, представља одличан начин за проучавање имуномодулаторних ефеката MSC на адаптивне имунске ћелије. Т лимфоцити и PDL-MSCs су засејани у Transwell® 24-бунарчића у одговарајућој густини (1:10) у комплетном медијуму (211). Лимфоцити су засејани у апикални одељак Transwell®-а (у уметцима), док су PDL-MSCs засејане у базалним одељцима сваког бунара Transwell® (испод уметака), тако да су две врсте ћелија биле физички одвојене. Ћелије су засејане 48 сати пре излагања аеросолним екстрактима из CCs и ENDS у различитим концентрацијама. Коначно, 72 сата након третмана, Т ћелије су сакупљене и анализирале проточном цитометријом.

3.2. Анимални модел болести

За анимални модел ХОБП-а су коришћени мишеви BALB/с соја, док су за анимални ДМ и УК модел били коришћени мишеви соја C57BL/6. Мишеви оба пола и старости од 6 до 8 недеља су гајени у окружењу без патогена, са контролисаном температуром (22 ± 2 °C) са циклусом светлости и мрака од 12/12 сати у објекту за животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија. Животиње су добијале хуману негу са увек доступним основним животним намирницама (храна и свежа чиста вода). Сви експерименти су одобрени од стране Етичког комитета животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија (ХОБП бр. 01-6172/5; ДМ бр. 01-6172/5-2; УК бр. 01-6172/5-1). Сви протоколи су вођени у складу са етичким смерницама које је утврдила Етичка комисија за животиње Факултета медицинских наука. Једнак број мужјака и женки мишева је распоређен у експерименталним и контролној групи.

3.2.1. Индуција експерименталног модела хроничних инфламацијских болести

За анимални ХОБП модел, мишеви су изложени дуванском диму добијеном из 1R6F цигарета (стандардизована експериментална цигарета од дувана, Универзитет Кентакија). Дувански дим је био генерисан машином за пушење LM1 Borgwaldt. Да би се симулирало типично просечно људско понашање корисника цигарета, експерименталне животиње су биле изложене количини од пет 1R6F цигарета сваког дана током четири недеље. Током излагања, мишеви су држани у затвореним коморама без извора чистог ваздуха, удишући само дим 1R6F цигарета под режимом HCl. Када се излагање завршило, мишеви су враћени у своје просторије на свеж ваздух. Коморе су пажљиво очишћене након сваког

излагања како би се спречило задржавање и таложење остатака катрана. Након 4 недеље је детектован развој ХОБП-а, након чега су мишеви били подељени у две експерименталне (изложени цигаретама (ХОБП^{CCs}) и изложени ENDS-у (ХОБП^{ENDS})) и у једну контролну групу (изложени чистом ваздуху (ХОБП^{КОНТРОЛА})).

CCs група је била изложена дуванском диму по истом принципу који је коришћен за изазивање болести, док су животиње из групе ENDS биле изложене аеросолу ENDS-а добијеног од пет Heatsticks патрона сваког дана током четири недеље. Мишеви из ХОБП^{КОНТРОЛА} групе су првобитно били изложени диму добијеном од цигарета 1R6F (током прве 4 недеље), а затим (током наредне 4 недеље) су били изложени чистом ваздуху. Мишеви из контролне, потпуно здраве групе (КОНТРОЛА), су били изложени само свежем ваздуху током 8 недеља. Све животиње из експерименталних и контролних група су жртвоване након 8 недеља од успостављања протокола.

За анимални модел ДМ, мишевима су дате ињекције вишеструких ниских доза (енгл. *Multiple low doses*, MLD) стрептозотоцина (STZ). Тачније, мишевима је дата дневна интраперитонеална ињекција од 40 mg/kg STZ раствореног у цитратном пуферу са рН од 4,5 током 5 дана заредом (212). Количина STZ примењена сваког дана зависила је од тежине миша. ДМ код мишева третираних MLD-STZ био је дијагностикован присуством високог нивоа глукозе у крви (изнад 10,3 mmol/l) и присуством глукозе у урину (изнад 7,1 mmol/l). Ниво глукозе у крви и глукозе у урину мерени су три пута недељно. Квантификација нивоа глукозе у крви извршена је помоћу апарата Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics in Mannheim, Germany). Анализа нивоа глукозе у урину је била спроведена коришћењем Uriscan 2 тест трака (YD diagnostics, Korea). Узорци за оба мерења су узети са врха репа након 4-часовног периода гладовања. Након детекције болести, мишеви су подељени у две експерименталне (изложени цигаретама (ДМ^{CCs}) и изложени ENDS-у (ДМ^{ENDS})) и једну контролну групу (изложени чистом ваздуху (ДМ^{КОНТРОЛА})).

За анимални УК модел, мишевима је уместо нормалне воде за пиће дат 2%, водени раствор декстран содијум сулфата (енгл. *Dextran sodium sulphate*, DSS; молекулска тежина 40 kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) током 5 дана ad libitum (213). Након тога, DSS је замењен свежом, чистом водом током 4 недеље, што је изазвало фазу опоравка од колитиса. За процену клиничких знакова колитиса за сваког миша, коришћен је индекс активности болести (енгл. *Disease Activity Index*, DAI) који се процењује кроз мерења губитка телесне тежине животиња, анализу конзистенције столице и тестове фекалне окултне крви (Табела 1.) (214). Након детекције болести, мишеви су били подељени у две експерименталне (изложени цигаретама (УК^{CCs}) и изложени ENDS-у (УК^{ENDS})) и једну контролну групу (изложени чистом ваздуху (УК^{КОНТРОЛА})).

Скор Параметар	0	1	2	3	4
Губитак телесне масе (%)	Нема губитка	1–5	6–10	11–15	>15
Конзистенција фецеса	Нормална	Ретка, није адхерентна за анални излаз	Ретка, средње адхерентна за анални излаз	Ретка, слузава, потпуно адхерентна за анални излаз	Дијареја
Ректално крварење	Нема	Нема	Слабо	Видљиво	Обилно

Табела 1. Критеријуми за одређивање клиничког скорa болести.

Дакле, животиње су сврстане у четири групе (три експерименталне (E1-E3) и једна контролна група (K)):

1. E1: BALB/C или C57BL/6 мишеви којима је индукована болест (ХОБП, ДМ или УК) и који су били изложени дуванском диму CCs;
2. E2: BALB/C или C57BL/6 мишеви којима је индукована болест (ХОБП, ДМ или УК) и који су били изложени аеросолу ENDS-a;
3. E3: BALB/C или C57BL/6 мишеви којима је индукована болест (ХОБП, ДМ или УК) и који су били изложени чистом ваздуху;

K: BALB/C или C57BL/6 мишеви који нису били изложени ни једном од поменутих никотинских облика – потпуно здрави мишеви.

3.2.2. Анализа плућне функције

Мишеви су жртвовани након завршетка циклуса надимљавања, цервикалном дислокацијом при чему су животиње биле лишене живота наглим повлачењем главе и базе репа. Испитивање функција плућа је извршено преко стандардних гасних анализа,

укључујући парцијални притисак кисеоника (енгл. *Partial Pressure of Oxygen*, PaO₂) и парцијални притисак угљен-диоксида (енгл. *Partial Pressure of Carbon Dioxide*, PaCO₂), из крви жртвованих животиња.

Узорци артеријске крви су узети од свих мишева и анализиране непосредно након жртвовања помоћу инструмента за анализу гасова (GEM Premier 3500, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).

3.2.3. Патохистолошка анализа ткива плућа, црева и панкреаса

Плућа, црева и панкреас су изоловани, фиксирани у одговарајућој концентрацији (10%) и волумену (већи 10 пута у односу на волумен ткива) формалдехида на собној температури и од њих су добијени парафински пресеци дебљине 5 µm пресечени помоћу микротоме (Leica RM 2135, Austria) и нанети на предметна сталка која су потом обојена хематоксилин/еозином (енгл. *Haematoxylin&Eosin*, H&E). Парафински пресеци су прво загрејани на 56°C у термостату у одговарајућем временском интервалу (око 45 минута). Потом је извршена депарафинизација помоћу ксилола и рехидратација помоћу серијског разблажења етанола. Рехидратација је извршена тако што су ткивни исечци потопљени у растворима етанола различите концентрације у одговарајућим циклусима од 5 минута: двапут у апсолутном алкохолу у укупном трајању од 10 минута, а потом по 5 минута у апсолутном алкохолу, 96%, 90%, 70% алкохолу и на крају у дестилованој води. Препарати су потом бојени 10 минута Mayers-хематоксилином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), испрани првобитно дестилованом а потом обичном водом у трајању од 5 минута. Након бојења хематоксилином, ткивн исечци су бојени и еозином у трајању од 2 минута (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Након завршетка протокола бојења, препарати су дехидратисани (супротно рехидратацији, у растућим концентрацијама етанола, у истом броју и трајању циклуса) и третирани ксилолом у циљу просветљивања. Препарати су прво потопљени у мешавини ксилола и апсолутног алхолола (однос 1:1) у трајању од 1 минут, а потом у чистом ксилолу два пута такође у трајању од једног минута. Коначно, препарати су заштићени одговарајућим балзамом (Canada balsam, Centrohem, Србија) и покровним стаклима и подвргнути процесу сушења у трајању од 24 часова. Коначно, обојени и осушени ткивни исечци су тумачени под светлосним микроскопом (Zeiss Axioskop 40, Jena, Germany; BX51; Olympus, Japan) на основу чега је извршена њихова хистолошка класификација.

Плућа ХОБП мишева су уклоњена из грудног коша након еутаназије. Каудална шупља вена је пажљиво исечена да би се зауставио доток крви у плућа. Трахеја је канулирана са канилом фиксираним лигатуром, након чега је фиксатив (10% формалин) упумпан у трахеју. Инфузија фиксатора је изведена при константном притиску течности (25 cm, 5 минута) и прекинута чим су плућа била потпуно надувена (плућа проширена до нормалног нивоа). Коначно, плућа су ослобођена из трахеје, ускладиштена у 10% формалина, очишћена у раствору фосфатног пуфера (PBS) и уграђена у парафин. Затим су припремљени пресеци од 5 µm уграђених и фиксираних плућних ткива за H&E бојење. За одређивање степена оштећења плућа су коришћене већ утврђене патохистолошке скале. Патолози су на слепо оценили оштећење плућа на основу степена фиброзе, региона пнеумонитиса, хиперплазија или хипертрофија пнеумоцита, дебљине алвеоларних септи, ателектаза, компензационог емфизема и алвеолитиса. Оштећење је

категорисано у четири степена озбиљности: 0, 1, 2 и 3 (Табела 2.) (215). Укупна оцена оштећења плућа за сваког миша је одређена сумирањем свих резултата.

Параметар	Скор	Опис оштећења плућног паренхима
Фиброза Поља пнеумоније Хиперплазија/хипертрофија пнеумоцита тип I и II Задебљање алвеоларног септума Ателектаза Алвеолитис Компензаторни емфизем	0	Нема видљивог оштећења, или оштећењ захвата мање од 5% плућног паренхима
	1	Оштећење захвата 5–25% плућног паренхима
	2	Оштећење захвата 26–50% плућног паренхима
	3	Оштећење захвата више од 50% плућног паренхима

Табела 2. Параметри и скор патохистолошке анализе оштећења плућа.

Панкреаси ДМ мишева су уклоњени и складиштени у раствор 10% формалдехида преко ноћи на собној температури. Након тога, парафински пресеци ткива панкреаса су обојени Н&Е у сврху анализе лимфоцитних инфилтрату у Лангерхансовим острвцима панкреаса под микроскопом са увећањем од 40 пута. Патолог је извршио слепу анализу дистрибуције инфламаторног ћелијског инфилтрата у острвцима панкреаса (216). Нормално, здраво острвце је добило оцену 1, периваскуларна/перидуктална инфилтрација је оцењена са 2, периинуслитис са 3, благи инсулитис (мање од 25% острваца је инфилтриран) као 4, а тешки инсулитис (више од 25% острва инфилтрирано) као 5 (Табела 3.).

Оцена	Хистопатолошки налаз
1	Нормално, здраво острвце
2	Периваскуларна / перидуктална инфилтрација
3	Периинуслитис
4	Благи инсулитис (мање од 25% острваца инфилтрирано)
5	Тешки инсулитис (више од 25% острва инфилтрирано)

Табела 3. Параметри и скор патохистолошке анализе оштећења панкреаса.

Дебело црево УК мишева је уклоњено након еутаназије 19. и 33. дана. Ткиво је испрано DPBS-ом, направљен је лонгитудинално пресек који је потом умотан у „швајцарски ролат“ (енгл. *Swiss roll*). Ткиво је потом фиксирано у 10% формалина, уграђено у парафин и пресечено на 5 μm за бојење Н&Е на претходно описан начин. Хистолошки резултат за сваког миша је израчунат као збир епителног оштећења и подрезултата упале (Табела 4.) (217).

СКОР	Степен инфламације	Степен епителног оштећења	Степен деструкције крипти
0	0 – није детектована инфилтрација	0 – нема	0 – нема нарушена морфологија
1	1 – блага инфилтрација око базе крипте	1 – мукозно	1 – оштећена базална трећина, благ губитак пехарастих ћелија
2	2 – умерен, инфилтрати распрострањени до мишићног слоја слузнице	2 – мукозно и субмукозно (детектовано озбиљно истањење и едем)	2 – оштећене базалне две трећине, озбиљан губитак пехарастих ћелија,
3	3 – тежак, инфилтрати распрострањени до мишићног слоја слузнице/субмукозе	3 – трансмурално	3 – интактан само површински епител, делимична деструкција крипти
4			4 – потпуни губитак крипти и епитела, губитак пехарастих ћелија

Табела 4. Параметри и скор патохистолошке анализе оштећења колона.

3.2.4. Изолација мононуклеарних ћелија из плућа, ламине proprije зида дебелог црева и слезине

За изолацију мононуклеара из плућа, ламине proprije зида дебелог црева и слезине је коришћен метод механичке разградње. Након изолације циљних ткива, биће уклоњени трагови крви и нежељених ткива помоћу PBS-а. Ткива су потом уситњена маказицама и нежно здробљена кроз 200 μm челичну мрежу, коришћењем методе „полуге“ шприца. Добијени садржај је ресуспендован у DMEM медијуму са додатком FBS-а, колагеназе тип 4 (0.5 mg/mL) и говеђе панкреасне ДНАзе тип 4 (1 mg/mL) а потом инкубиран на температури од 37°C у временском периоду од 45 минута. Ћелијска суспензија је

пропуштена кроз ћелијско сито. Након завршетка инкубације, суспензије су центрифугиране 10 минута на брзини 300 g.

Добијени талог је ресуспендован у пуферу за лизирање еритроцита (енгл. *Lysing buffer*; 0.144 M NH₄Cl, 0.0169 M TRIS, pH 7.4) и инкубиран у трајању од 5 минута, на леду (на +4°C). Након истека инкубације, додат је DMEM медијум са 10% FBS-ом чиме је заустављено лизирање (114, 218, 219). Накнадним центрифугирањем добијен ћелијски талог је ресуспендовати у 1ml PBS који садржи 1% FBS. С обзиром на то да и механичка и ензимска разградња ткива може узроковати деструкцију и смрт изолованих ћелија, коришћен је MACS® Dead Cell Removal Kit (Milenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) за издвајање вијабилних ћелија које ће бити анализирани методом проточне цитометрије. Помоћу trypan blue реагенса, на претходно описан начин, извршено је бројање ћелија у изолованим ћелијским суспензијама и количина од 10⁷ ћелија, након центрифугирања и одстрањивања супернатанта, ресуспендована је у 100 µL магнетних микрокулица за уклањање мртвих ћелија (енгл. *Dead Cell Removal MicroBeads*) и инкубирана на собној температури у интервалу од 15 минута. Након инкубације, ћелије су нанете на одговарајуће MS колоне смештене у магнетном пољу и испране пуфером за везивање (енгл. 1× Binding Buffer). Ефлуент који је добијен из MS колоне представља ћелијску суспензију живих ћелија. Ћелије су потом поново избројане и одговарајућа количина ћелијске суспензије је центрифугирана, испрана и ресуспендована у 1ml PBS који садржи 0,1% NaN₃ како би се даље користила за методу проточне цитометрије.

3.2.5. Мерење цитокина у анималном серуму

Жртвованим мишевима је узета крв из трбушне аорте која је центрифугирана 10 минута на 300 g. Серум је потом издвојен и замрзнут на температури од -20°C до извођења анализе. ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) је измерена концентрација цитокина у серумима (TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17). Протокол је одрађен по истом принципу као што је претходно описано у одељку 3.1.4.

3.2.6. Имунохистохемијска анализа плућа

Ткива плућа експерименталних животиња коришћена су за имунохистохемијску анализу. Из парафинских блокова су добијени нови пресеци ткива (5 µm дебљине) који су постављени на стаклене плочице које су високоадхезивне адекватне за методу демаскирања антигена (енгл. *Antigen retrieval*) (SuperFrost Ultra Plus, ThermoScientific, SAD). Парафински ткивни исечци су депарафинизовани и рехидратисани на исти начин који је описан у одељку 3.2.3.. Након тога, извршено је демаскирање антигена помоћу њиховог урањања у цитратни пуфер (0,01M; pH=6) на високој температури. Ткивни исечци су сушени и охлађени на собној температури и потом испрани помоћу дестиловане воде и DPBS-а. Након фиксације помоћу ацетона у трајању од 5 минута и испирања фиксатива DPBS-ом, ткива су третирана 10 минута воденим раствором H₂O₂ (енгл. *Hydrogen Peroxide Block*) у циљу уклањања ендогених пероксидаза и превенирања неспецифичног бојења. Након инкубације, исечци су испрани и инкубирани 10 минута у пуферу за блокирање протеина (енгл. *Protein Blocking buffer*). Након завршетка блокирања, ткивни исечци су третирани биотинилованим моноклонским антителима F4/80 (ab15694, Abcam, UK) и Ly6G (13-9668-82, Invitrogen, USA) и инкубирани преко ноћи.

Присуство макрофага и неутрофила у изолованим плућним ткивима је потом визуализовано помоћу реагенса *Streptavidin-HRP*, који се везује за биотин, 3,3-диаминобензидина (енгл. *3,3'-diaminodbenzidine*, DAB) субстратом и контрабојени хематоксилином. Након тога је извршена дехидратација, третирање ксилолом и покривање покровним стаклом. Репрезентативне фотографије су добијене помоћу камере позициониране на светлосном микроскопу (Olympus BX51, Japan).

3.3. Клиничка студија

У клиничку ХОБП студију, укупан број од 73 пацијента (39 мушкараца и 34 жене) са хроничном опструктивном респираторном болешћу је регрутован. Просечна старост свих пацијената је 65 година. Најмлађи пацијент има 19, а најстарији 90 година. Критеријум за укључивање је дијагноза ограничења протока ваздуха које није потпуно реверзибилно. Дијагноза је потврђена спирометријом. Присуство $FEV_1 < 80\%$ од предвиђене вредности у комбинацији са односом $FEV_1/FVC < 70\%$ потврдило је присуство ограничења протока ваздуха које није у потпуности реверзибилно. Од свих укључених пацијената, 15% је имало благу болест ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 \geq 80\%$), 77% је имало умерену болест ($FEV_1/FVC < 70\%$; $30\% \leq FEV_1 < 80\%$), а 8% је имало тешку болест ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 < 30\%$). Критеријуми искључења укључивали су малигне болести, тешка и по живот опасна стања (срчана инсуфицијенција, аритмије, бубрежна инсуфицијенција, плућна инсуфицијенција, фулминантно оштећење јетре), плућну фиброзу, пнеумонију, аутоимуне болести и друге орган-специфичне и системске акутне или хроничне поремећаје. Пацијенти су регрутовани на Клиници за пулмологију, Универзитетском клиничком центру Крагујевац и Институту за плућне болести Војводине, Сремска Каменица. Пацијенти који користе CCs ($n=37$) и ENDS ($n=10$) су регрутовани у експерименталне, CCs и ENDS групе. Да би били укључени у експерименталне групе, пацијенти су морали редовно (сваког дана) да конзумирају или CCs или ENDS (IQOS или GLO) најмање 6 месеци. Пацијенти који користе и CCs и ENDS (двоструки/комбиновани корисници) су искључени из студије. Просечна старост пацијената који користе CCs је 69 година (55-90 година), а просечна старост пацијената који користе ENDS је 47 година (19-76 година). Пацијенти који никада нису користили CCs или ENDS, непушачи ($n=26$) су регрутовани у КОНТРОЛА групу. Просечна старост непушача је 67 година (55-83 године). Сви експерименти су одобрени од стране локалних Етичких комисија Универзитетског клиничког центра Крагујевац (бр. 01/22-341) и Института за плућне болести Војводине, Сремска Каменица (бр. 21-IV/3).

У клиничку ДМ студију је регрутовано 21 пацијената са ДМ. Критеријуми за укључивање ДМ су били гликемија наташте једнака или већа од 126 mg/dL. Критеријуми за искључење су обухватили трудноћу, орган специфичне и системске акутне или хроничне инфламаторне поремећаје, аутоимуне болести, тешке болести (улцерозни колитис, Кронова болест, срчана инсуфицијенција, аритмије, бубрежна инсуфицијенција, респираторна инсуфицијенција, фулминантно оштећење јетре), и малигне болести. Пацијенти су регрутовани у Центру за ендокринологију, Универзитетског клиничког центра Крагујевац и Центру за ендокринологију Универзитетског клиничког центра „Бежанијска коса“, Београд. Пацијенти који користе CCs ($n=7$) и ENDS ($n=7$) су регрутовани у експерименталне, CCs и ENDS групе, док су пацијенти који не користе CCs и ENDS, односно непушачи ($n=7$) регрутовани у КОНТРОЛА групу.

Сви експерименти су одобрени од стране локалних Етичких комисија Универзитетског клиничког центра Крагујевац (бр. 01/22-341) и Универзитетског клиничког центра „Бежанијска коса” (бр. 1711/1). Хелсиншка декларација и принцип добре клиничке праксе су увек поштовани. Сваки пацијент је дао информисани пристанак пре анализе крви.

У клиничку УК студију, регрутовано је укупно 76 пацијената са УК. Дијагноза је потврђена ендоскопским, хистолошким и клиничким резултатима. Активност ендоскопске болести је процењена са Mayo ендоскопским скором. Клинички скор је одређен коришћењем Truelove/Wittsova скале индекса клиничке активности. Хистолошки скор је одређен коришћењем Geboes оцене. Критеријуми за искључење су били трудноћа, орган-специфичне аутоимуне болести (Адисонова болест, аутоимуни хепатитис, целијакија, дијабетес мелитис тип 1, Гравесова болест, Гиљен-Бареов синдром, Хашимотов тироидитис, Кронова болест, мултипла склероза, мијастенија гравис, примарна пернициозна болест), билијарни холангитис, склероза холангитис, системске аутоимуне болести (системски еритематозни лупус, полимиозитис, дерматомиозитис, реуматоидни артритис, системска склероза, Сјогренов синдром), псоријаза, астма, хронична опструктивна болест плућа, болест масне јетре, дијабетес типа 2, хепатитис, цироза јетре, малигне и друге болести које угрожавају живот (срчана инсуфицијенција, аритмије, бубрежна инсуфицијенција, респираторна инсуфицијенција, фулминантна повреда јетре). Пацијенти су регрутовани у Центру за гастроентерологију, Универзитетском клиничком центру Крагујевац и Центру за гастронетерологију Универзитетског клиничког центра „Бежанијска коса“, Београд. Пацијенти са УК који користе CCs ($n=34$) и ENDS ($n=22$) су регрутовани у експерименталне (CCs и ENDS) групе, док су непушачи оболели од УК ($n=20$) регрутовани у контролну групу (КОНТРОЛА). Сви експерименти су одобрени од стране локалних Етичких комисија Универзитетског клиничког центра Крагујевац (бр. 01/22-341) и Универзитетског клиничког центра „Бежанијска коса” (бр. 1711/1).

3.3.1. Изолација мононуклеарних ћелија из периферне крви пацијената

За изолацију имунских ћелија, узорци крви су узети у хепаринизованим епруветама за сакупљање (50 μ л хепарина по 1 ml крви). Мононуклеарне ћелије периферне крви су одвојене од еритроцита и мртвих ћелија помоћу Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Otelfingen, Switzerland), реагенса који омогућава сепарацију преко градијента центрифугирања (220). Крв је првобитно пребачена у епрувету од 15ml у којој се налази иста количина DPBS (однос након мешања 1:1) и центрифугирана на собној температури 10 минута на 350 g. Центрифугирањем су еритроцити изоловани на дно епрувете, а плазма и слој леукоцита, издвојени изнад еритроцита, су пипетом пренети на Ficoll Paque, пажљиво како би се избегло мешања слојева, и центрифугирани на собној температури 30 минута при релативној центрифугалној сили од 400g. Пипетом је пажљиво сакупљен слој мононуклеарних леукоцита (облачаст слој између серума и слоја Ficoll Paque). Имунске ћелије су потом три пута испране DPBS-ом (центрифугирање на собној температури 5 минута, 400 g). Коначно, изолован ћелијски талог мононуклеарних леукоцита је ресуспендован у DMEM-у након чега је извршено бројање ћелија за анализу узорока проточном цитометријом.

3.3.2. Анализа фенотипа имунских ћелија изолованих из плућа, ламине проприје зида дебелог црева и слезине мишева, као и имунских ћелија изолованих из периферне крви пацијената

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-мишјих антитела за бојење мембранских маркера (CD4, CD3, Toll-сличног рецептора-2 (енгл. *Toll-like receptors*, TLR2), CD14, I-A, CD45, Ly6C/Ly6G, CD206, CD8, F4/80, CD11c, CD11b, CD40, CD49, CD86, CD19, CD56, CD66, IL-23R, CD49b, *BD Pharmingen, USA*) обележених различитим флуоресцентним бојама (allophycocyanin, APC; fluorescein, FITC; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein complex) одређен је процентуални удео и укупан број CD3-NKT ћелија; CD3+CD4+ Т лимфоцита, CD3+CD8+ Т лимфоцита, F4/80+ макрофага, CD11c+ дендритских ћелија, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+ инфламацијских дендритских ћелија, CD45+Ly6G/Ly6C+ гранулоцита (неутрофила и моноцита).

Коришћењем примарно коњугованих моноклонских анти-мишјих антитела (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IL-23, IL-35, Arginase 1, Foxp3, Т-кутија транскрипциони фактор 21 (енгл. *T-Box Transcription Factor 21*, Tbx21), TGF β , RAR-везани орфан рецептор гама (енгл. RAR-related orphan receptor gamma, ROR γ), GATA3, iNOS, NLRP3, *BD Pharmingen*) за интрацелуларно бојење је одређен процентуални удео и укупан број мембрански обележених ћелија које их продукују. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије су инкубирале 4 h на 37°C у присуству 5 μ g/mL форбол 12-миристат 13-ацетата (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) (*Sigma-Aldrich St. Louis, USA*), 5 μ g/ml јономицина (*Sigma-Aldrich St. Louis, USA*) и 0,8 μ l Golgi plug (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Након инкубације, ћелије су фиксирале и пермеабелизоване употребом BD Cytofix/Cytoperm кита (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*) и обележене одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима.

Добијени подаци су анализирани коришћењем програма за анализу софтвера *Flowing* (*Turku Bioscience Centre*). Стратегија гејтинга је коришћена за одређивање присуства различитих субпопулација имуних ћелија у добијеним узорцима и ослањала се на геометрију импулса и гејтинг напред/бочно (енгл. *Forward scatter*, FSC; *Side scatter*, SSC) распршивање. За уклањање дублета биће коришћен гејтинг пулсне геометрије. Појединачне ћелије, које су постављене дуж дијагонале унутар графикона површине, одабране су за накнадну анализу помоћу гејтинг стратегије FSC/SSC за уклањање остатака, фрагмената ћелија и пикнотичких ћелија. Затим су постављене FMO контроле (енгл. *Fluorescence Minus One*) за свако антитело обележено флуорофором у панелу за бојење, омогућавајући одређивање граничне вредности између ћелија које су негативне и позитивне за дату емисију флуорофора. Коначно, ћелије које су биле позитивне за сваки од тестираних површинских и интрацелуларних маркера издвојене су и коришћене су за накнадну статистичку анализу.

3.3.3. Мерење цитокина у хуманом серуму

Из крвних узорака добијених од учесника студије је изолован серум. Пуна крв је центрифугирана 15 минута на 300 g, а затим је серум изолован и чуван на температури од -20°C до извођења анализе. ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) је измерена концентрација цитокина у хуманим серумима (TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IL-23, IL-35). Протокол је одрађен по истом принципу као што је претходно описано у одељку 3.1.4.

3.4. Статистичка обрада података

Резултати докторске дисертације су приказани као Mean $\pm$ SE. Дистрибуција података, односно нормалност расподеле, је проверена помоћу одговарајућег теста Shapiro–Wilk или Kolmogorov–Smirnov у зависности од броја животиња/пацијената. Једнофакторска анализа варијанси (енгл. *One-way analysis of variance*, ANOVA) метода је коришћена за сумирање резултата експерименталних и контролне групе, а потом су за накнадну анализу података између комбинација двеју различитих група коришћени параметријски или непараметријски тестови у односу на нормалност расподеле (Tukey HSD post hoc тест). Корелације између варијабли су испитане помоћу одговарајућег коефицијента корелације — Pearson или Spearman. Регресиони модел (енгл. *Multivariate linear regression model*) коришћен је у циљу детаљнијег детектовања односа између клиничких фактора и измерених нивоа цитокина у серуму пацијената.

Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика $p < 0.01$. За статистичку обраду свих података коришћен је SPSS пакет, верзија 21.0. Рачунарски програм *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикона и фигура.

4. РЕЗУЛТАТИ

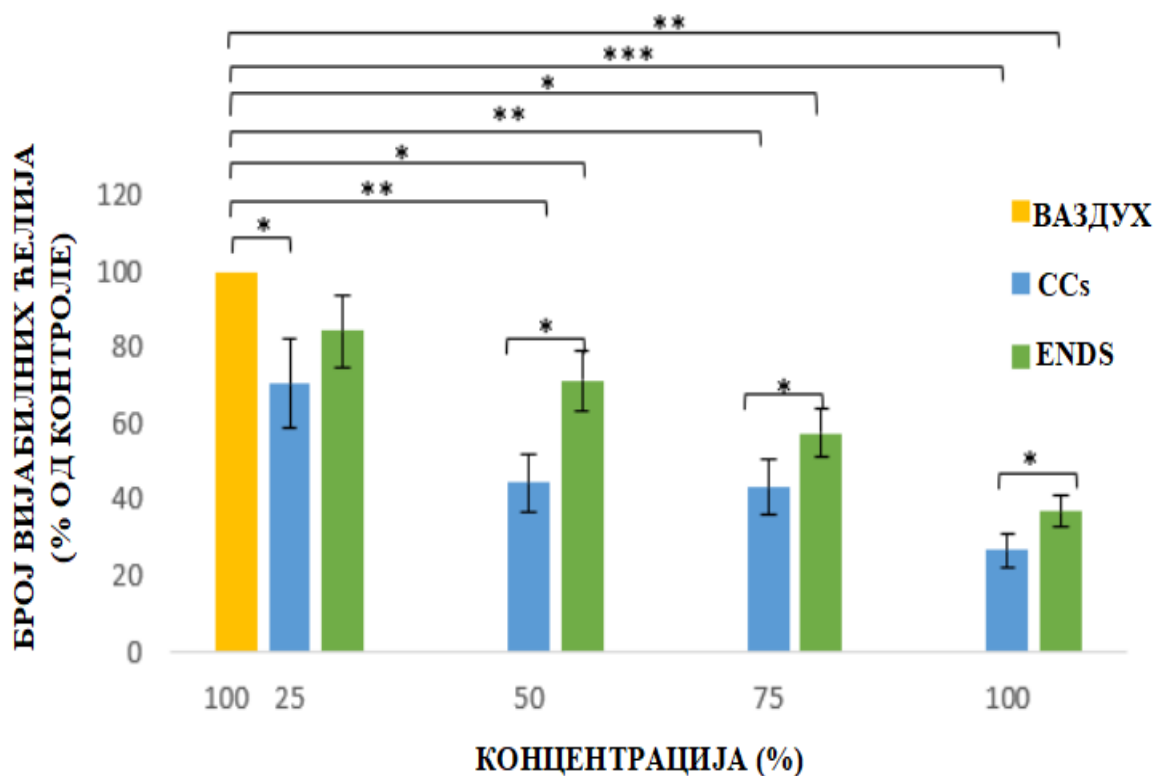
4.1. Утицај CCs и ENDS-а на регенеративни потенцијал PDL-MSCs

4.1.1. Дувански дим CCs и аеросол ENDS-а негативно утичу на вијабилност и способност пролиферације PDL-MSCs у дозно-зависном маниру

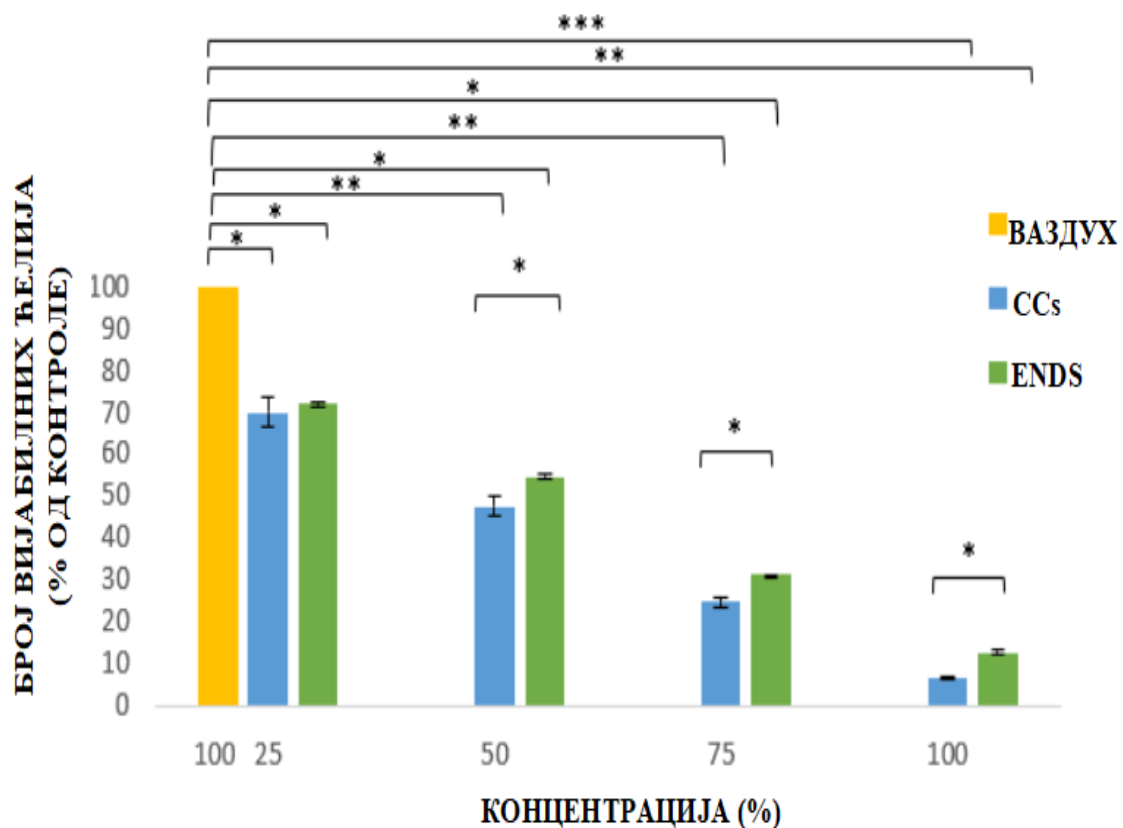
Дим цигарета и аеросол ENDS-а испољавају негативан ефекат на вијабилност и пролиферацију PDL-MSCs. Резултати есеја NRU (Графикон 1) и MTS (Графикон 2) показују да јачина ефекта зависи од дозе хазарда.

Изложене чистом ваздуху, PDL-MSCs су постигле оптималне вредности броја вијабилних ћелија захваљујући очуваном капацитету пролиферације.

Међутим, након третирања PDL-MSCs дуванским димом CCs и аеросолом ENDS-а, детектована је редукована присутност вијабилних пролиферишућих ћелија. Укупан број ћелија након третмана зависио је од врсте и концентрације хазарда (Графикони 1-2).



Графикон 1. Укупан број вијабилних PDL-MSCs је значајно смањен након излагања ћелија различитим концентрацијама CCs и ENDS-а у поређењу са контролним, само ваздуху изложеним PDL-MSCs. Резултати NRU теста показују значајно ниже вредности укупног броја живих ћелија након CCs третмана у поређењу са ENDS-ом и контролном групом. Вредности укупног броја ћелија су приказане као проценат контролних, здравих PDL-MSCs; n=2 узорка по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

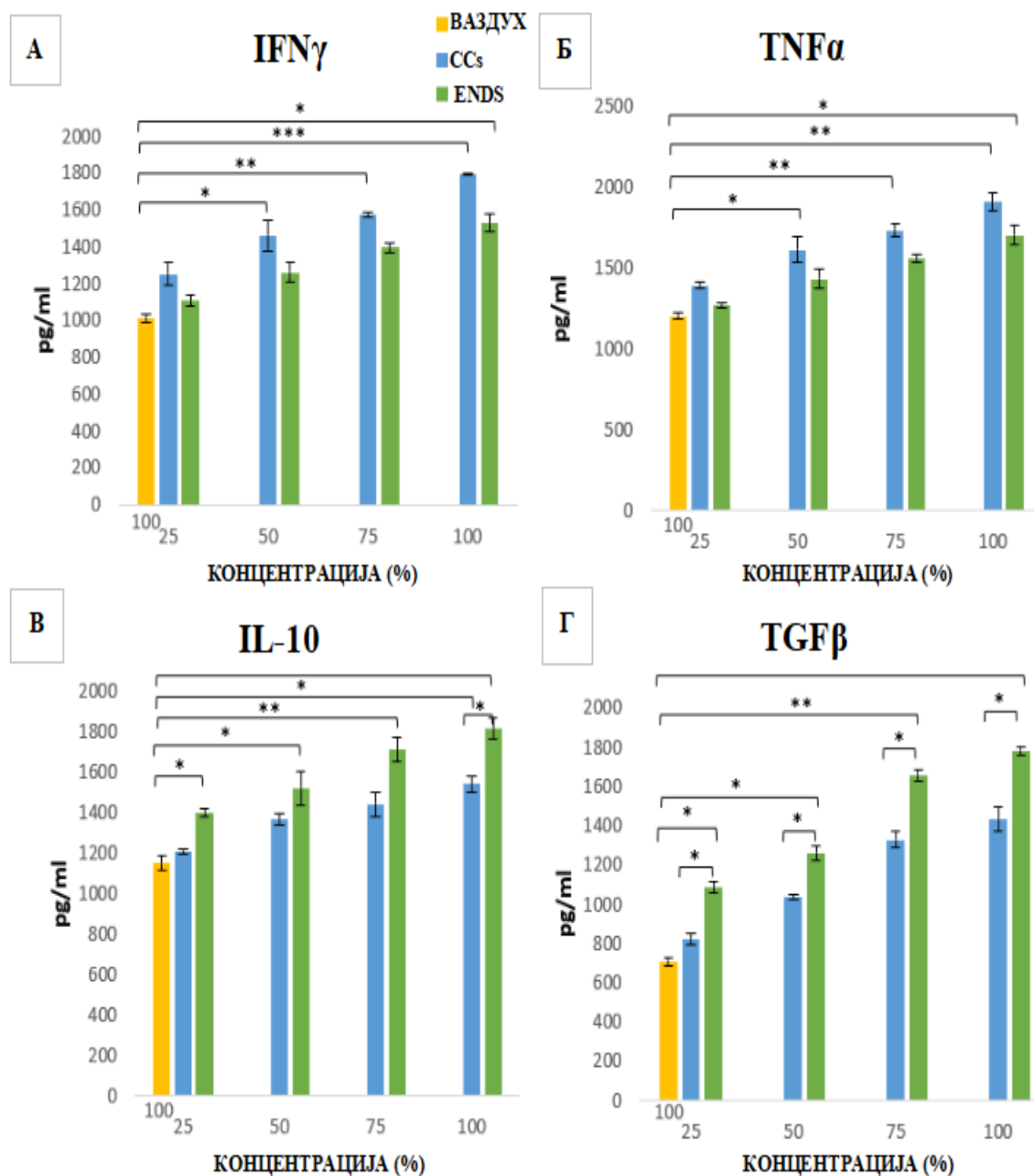


Графикон 2. Капацитет пролиферације PDL-MSCs након излагања CCs и ENDS-у је био значајно ослабљен у поређењу са контролним ћелијама. Резултати MTS testa су показали снажнији интензитет CCs-посредованог нарушавања пролиферације у односу на ENDS ефекте. Вредности укупног броја ћелија су приказане као проценат контролних, здравих PDL-MSCs; n=2 узорка по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.1.2. CCs и ENDS су индуковавали промену фенотипа PDL-MSCs

Након третмана димом цигарета и аеросолом ENDS-а, у супернатантима PDL-MSCs измерени су различити нивои проинфламацијских цитокина. Третман CCs узроковао је повећану концентрацију IFN- γ и TNF- α у супернатанту PDL-MSCs у поређењу са чистим ваздухом и ENDS-ом (Фигура 1А-Б). IFN- γ и TNF- α су инфламацијски цитокини круцијални за Th1 ћелијски имуни одговор и, присутни у супернатанту PDL-MSCs, показатељи су инфламацијског фенотипа покренутог третманом CCs. Третман ENDS-ом и изложеност чистом ваздуху узроковали су знатно ниже концентрације ових цитокина у супернатантима PDL-MSCs.

Са друге стране, изложеност ENDS-у промовисао је имуносупресивни фенотип PDL-MSCs преко повећане секреције цитокина TGF- β и IL-10 (Фигура 1Б-Г). Концентрације ових антиинфламацијских цитокина су биле више у супернатантима PDL-MSCs изложених ENDS-у у поређењу са контролним и CCs-изложеним ћелијама (Фигура 1Б-Г).



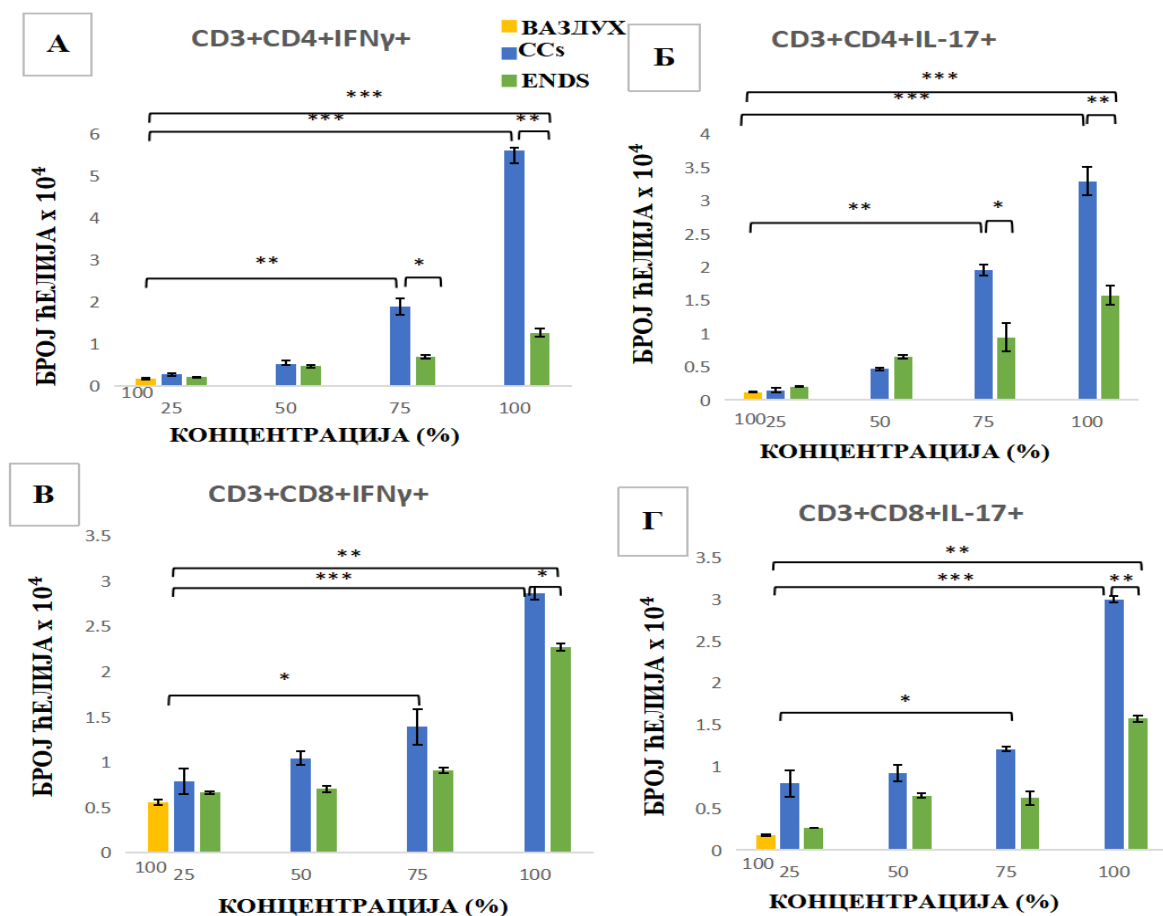
Фигура 1. Концентрације проинфламацијских цитокина (IFN γ , TNF α) биле су веће у супернатантима CCs-изложеним него ENDS-третираним ћелијама (А-Б). са друге стране, концентрације имуносупресивних цитокина (TGF β , IL-10) биле су ниже у супернатантима ћелија након CCs него након ENDS третмана (В-Г). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 супернатаната по групи; **p<0,05, ***p<0,01, ****p<0,001.

4.1.3. PDL-MSCs изложене дуванском диму CCs промовишу стварање про-инфламацијских цитокина у Т лимфоцитима, док PDL-MSCs третиране аеросолом ENDS-а фаворизују синтезу имуносупресивних цитокина у Т ћелијама

Анализа ко-културе Т ћелија са PDL-MSCs је показала различите ефекте третмана на имунолошки фенотип. Изложеност кокултуре дуванском диму CCs је довело до испољавања проинфламацијског фенотипа (Фигура 2А-Г).

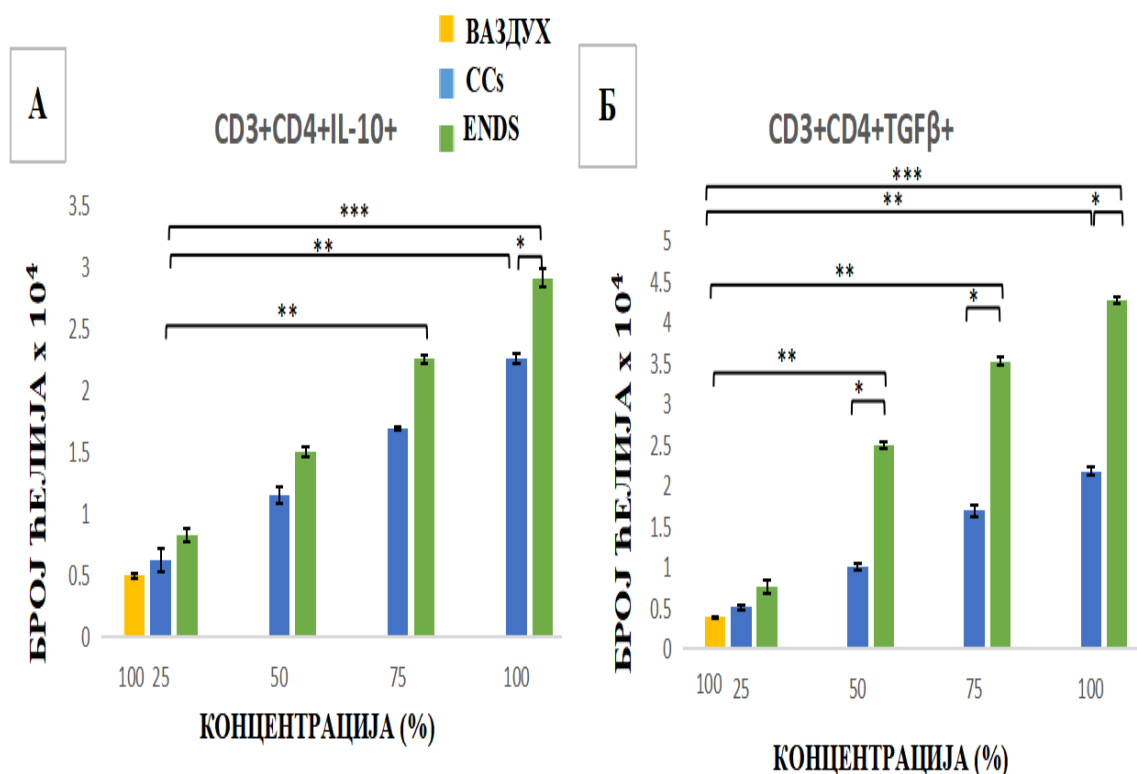
Т ћелија кокултивисане са PDL-MSC изложеним CCs показале су проинфламацијски фенотип (Фигура 2А-Г) услед повећане присутности IFN- γ - и IL-17-продукујућих CD3+CD4⁺ (Фигура 2А-Б) и CD3+CD8⁺ Т ћелија (Фигура 2В-Г). Повећана концентрација CCs узроковала је повећан укупан број проинфламацијских CD3+CD4⁺ и CD3+CD8⁺ Т ћелија.

Укупан број CD3+CD4⁺ (Фигура 2А-Б) и CD3+CD8⁺Т ћелије (Фигура 2В-Г) које секретују IFN- γ - и IL-17 био је приближан у кокултури изложеној чистом ваздуху и ENDS-у у најмањој испитиваној концентрацији (25%). Са повећањем концентрације, ENDS је узроковао повећање броја ових инфламаторних ћелија, али значајно мањим интензитетом у односу на CCs.



Фигура 2. Мањи број проинфламацијских IFN- γ + и IL-17+-продукујућих CD3+CD4+ (А-Б) и CD3+CD8+Т ћелија (В-Г) детектоване су у кокултури MSCs:Т ћелија третираних ENDS-ом у односу на CCs третман. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=2 узорка по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

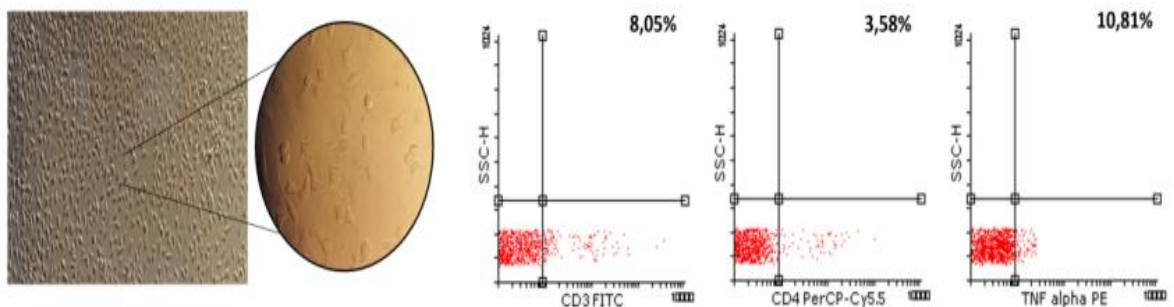
Са друге стране, анализа кокултуре Т-ћелије са PDL-MSCs изложених ENDS-у детектовала је повећан број CD3+CD4+Т ћелија које секретују IL-10 и TGF- β услед чега се испољава имуносупресивни фенотип (Фигура 3А-Б). Ефекат ENDS-а, као и ефекат CCs, испољава дозно-завистан карактер: већи број имуносупресивних CD3+CD4+Т ћелија пратио је већу концентрацију аеросола. Третман CCs је такође повећао број IL-10 и TGF- β - продукујућих CD3+CD4+Т ћелија, али у блажем степену у поређењу са ENDS-ом.



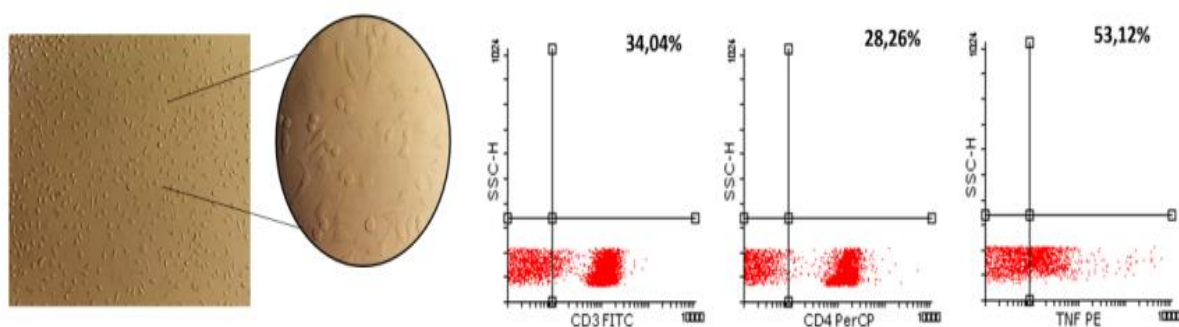
Фигура 3. Већи број имunosупресивних CD3+CD4+T ћелија које продукују IL-10 и TGF-β (Д-Ђ) су детектовани након излагања кокултуре Т ћелије-PDL-MSCs ENDS-у у поређењу са излагањем CCs. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=2 узорка по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.1.4. CCs и ENDS испољавају различите ефекте на вијабилност и имунорегулаторна својства PDL-MSCs кокултивисаних са Т лимфоцитима

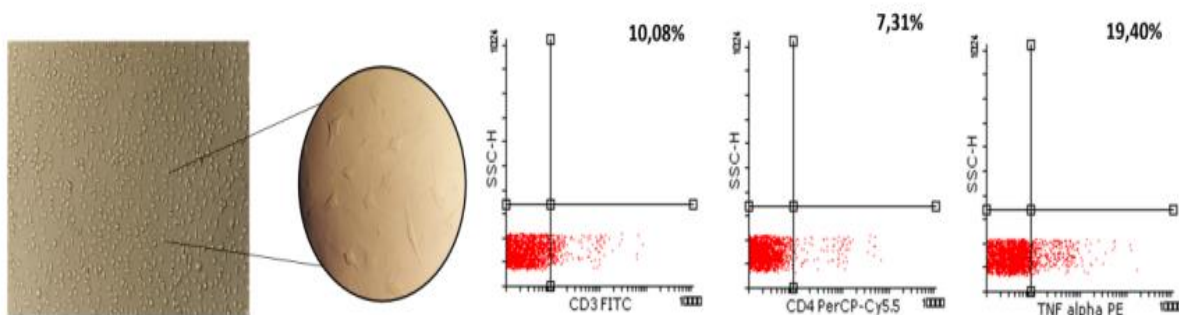
Третмани CCs и ENDS смањују способност преживљавања PDL-MSCs и Т ћелија у поређењу са чистим ваздухом, али различитим интензитетом. Међутим, у средини у којој је присутан мањи број вијабилних ћелија у поређењу са контролом, CCs промовише активацију CD3+CD4+Т ћелија и подстиче њихов проинфламацијски фенотип. Аеросол ENDS-а, иако такође компромитује одрживост ћелија, у мањем степену подстиче Т ћелијама посредован развој инфламације (Слика 9).



ВАЗДУХ



CCs



ENDS

Слика 8. Већи број PDL-MSCs и њихов слабији потенцијал да покрену инфламацију модулацијом фенотипа и повећањем броја CD3⁺CD4⁺TNF- α -продукујућих Т ћелија су узроковани третманом CCs у поређењу са ENDS-ом. Десни део фигуре приказује репрезентативне дијаграме CD3⁺CD4⁺TNF- α Т ћелија након култивације са PDL-MSCs третираним ваздухом, CCs и ENDS-ом. Леви део фигуре приказују PDL-MSCs изложене различитим третманима. Фотографије су добијене дигиталним фотоапаратом постављеним на светлосни микроскоп (Olympus BX51, Јапан), са увећањем од 100x (у квадрату) и 10x (у кругу).

4.2. Утицај CCs и ENDS-а на системску инфламацију у хроничним инфламацијским болестима

Хронична, дуготрајна употреба CCs и ENDS-а индукује промене у секрецији цитокина у имуним ћелијама пацијената оболелих од хроничних инфламацијских болести.

4.2.1. У поређењу са CCs, ENDS-а слабијим интензитетом индукују синтезу инфламацијских цитокина у имунским ћелијама пацијената оболелих од ХОБП-а

Значајно већи укупан број имуних ћелија које производе проинфламацијске цитокине попут TNF- α -, IL-1 β -, IL-13-, IL-17-, IL-22-, IL-23 (Фигура 4А-Ђ) и IFN- γ (Фигура 5) је детектован у крвним узорцима пацијената оболелих од хроничне опструктивне болести плућа у поређењу са здравим особама. Анализа концентрације ових цитокина у серуму је потврдила више вредности код ХОБП пацијената у односу на волонtere (Фигура 6).

Компарацијом цитокинских профила непушача, пушача и ENDS корисника, утврђен је различит ефекат на имуномодулацију. Повишен серумски ниво проинфламацијских цитокина је детектован у групи ХОБП^{CCs} у односу на друге ХОБП испитанике. Значајно већи број имуних ћелија које производе IL-17 (Фигура 4Г, $p < 0,05$) и IFN- γ (Фигура 5, $p < 0,05$) и повећани серумски нивои TNF- α -, IL-1 β -, IL-17-, IL-23 и IL-13 (Фигура 6) примећени су код ХОБП пушача у поређењу са ХОБП непушаче.

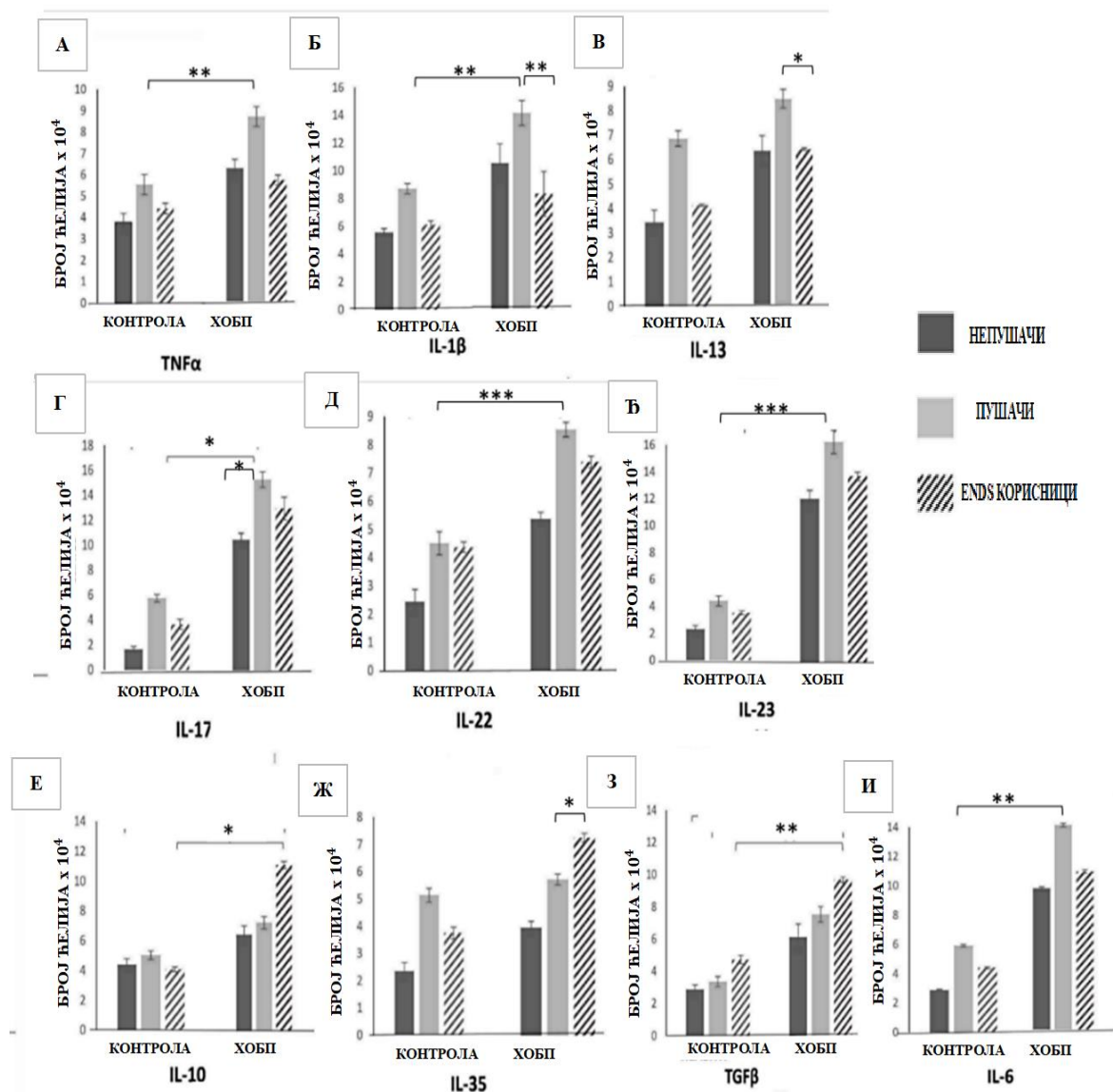
Већи број TNF- α -, IL-1 β -, IL-6-, IL-17- и IFN- γ -продукујућих леукоцита (Фигура 4) и повећане серумске концентрације TNF- α -, IL-1 β -, IL-6-, IFN- γ -, IL-17 и IL-22 (Фигура 6) примећени су код ХОБП пушача у поређењу са ХОБП кориснике ENDS-а. Међутим, у односу на ENDS, CCs су нижим интензитетом узроковале синтезу имуносупресивних цитокина (IL-10, IL-35 и TGF- β) код пацијената са ХОБП-ом.

Већи укупни број имунских ћелија које секретују IL-10- и TGF- β (Фигура 4.), као и виши нивои IL-10, IL-35 и TGF- β су детектовани у серуму ХОБП корисника ENDS-а у односу на ХОБП непушаче и пушаче (Фигура 6.). У крвним узорцима корисника ENDS-а је детектован повећан број имуних ћелија које секретују имуносупресивне цитокине производе IL-10-, TGF- β - и IL-35 (Фигура 6).

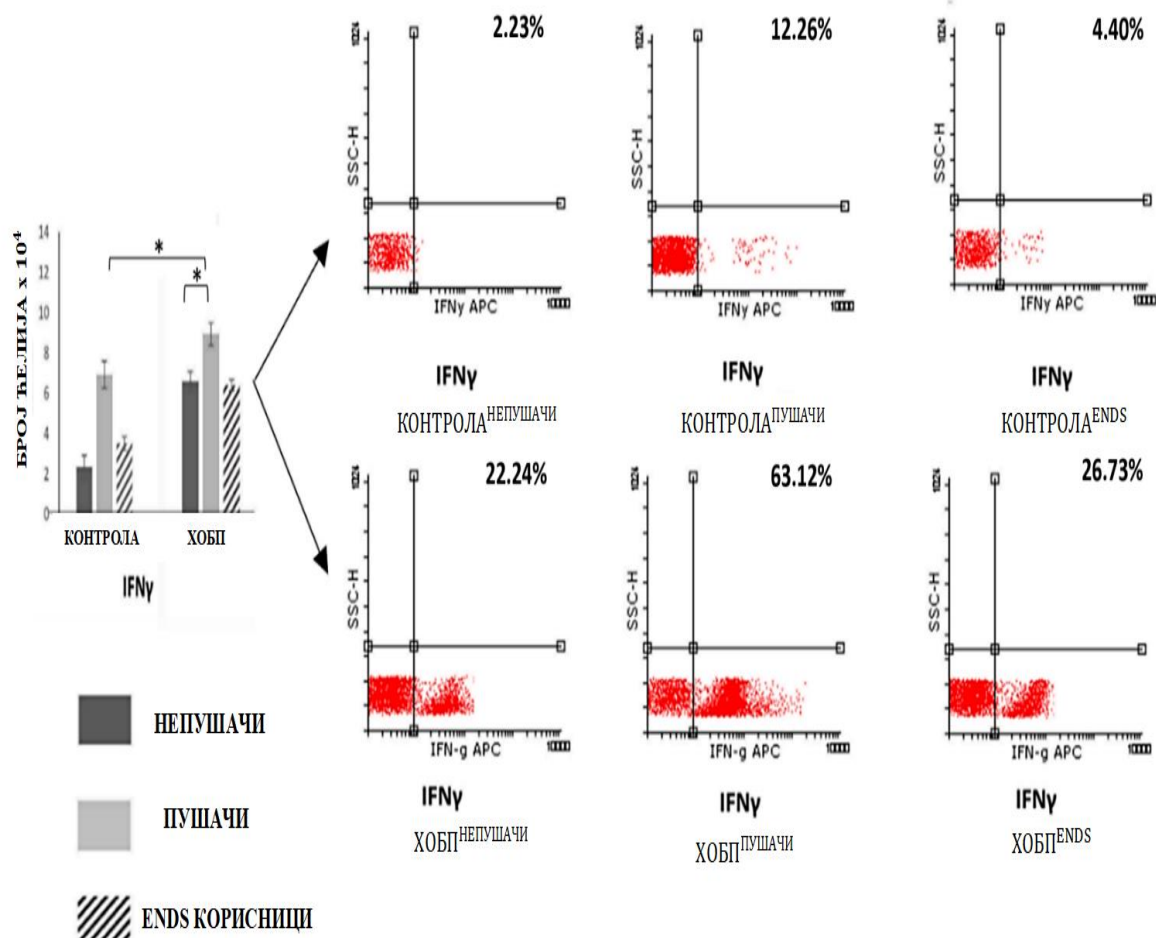
Употреба CCs и ENDS-а је узроковала повећану Th17 ћелијску продукцију цитокина (IL-17, IL-22).

Резултати су показали да дуготрајно коришћење ових производа повећава производњу инфламацијских цитокина TNF- α -, IL-1 β -, IL-6-, IL-13-, IL-17-, IL-22 и IL-23 чиме узрокују хроничну упалу плућа, хиперсекрецију слузи и цилијарну дисфункцију. На овај начин дувански производи подстичу развој опструкције протока ваздуха код пацијената оболелих од ХОБП-а и индукују убрзану прогресију и учесталије егзацербације болести. Развој и прогресија болести се клинички дијагностикују смањеном плућном функцијом: вредности FEV1 код ХОБП непушача ($74,57 \pm 5,34$) су више у односу на пушаче ($61,97 \pm 7,12$) и кориснике ENDS-а ($66,75 \pm 4,94$) (221).

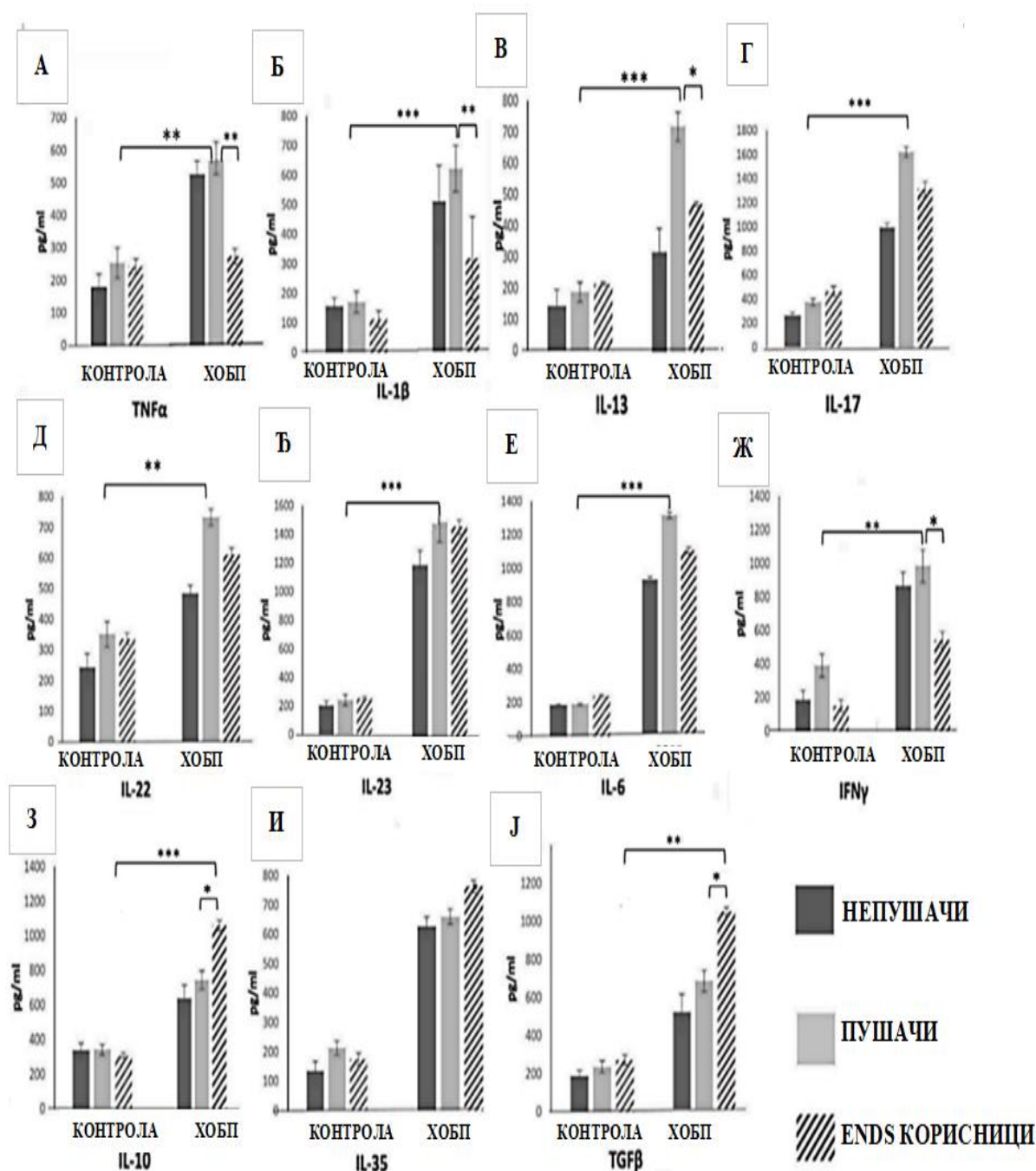
Испитивањем повезаности између нивоа проинфламацијских цитокина у серуму и вредности FEV1, клиничког параметра болести, детектована је повезана корелација (коэффициенти корелације били су у распону од 0,133–0,403; $p < 0,05$). Са друге стране, негативна корелација је уочена између FEV1 вредности и нивоа имуносупресивног цитокина IL-35 (коэффициенти корелације били су у распону вредности од 0,064–0,642 са $p < 0,05$). Додатно, мултиваријантна линеарна регресија (прилагођени $R^2 = 28,2\%$, $F = 7,887$; $p < 0,001$) показала је да хронична употреба конвенционалних цигарета има значајан утицај на вредности FEV1 (вредности FEV1 су биле веће од 0,728 у СС групи, у поређењу са AIR групом).



Фигура 4. Дуготрајна употреба ССс или ENDS-а индукује промене у производњи цитокина у имуним ћелијама пацијената оболелих од ХОБП-а. Укупни бројеви TNF-α- (А), IL-1β- (Б), IL-13- (В), IL-17- (Г), IL-22- (Д), IL-23- (Ђ), IL-10- (Е), IL-35- (Ж), TGF-β- (З), IL-6- (И) продукујућих имуних ћелија у крвним узорцима непушача, пушача и ENDS корисника међу здравим добровољцима (контрола) и пацијентима са ХОБП-ом, показују модулирани капацитет за цитокинску секрецију у леукоцитима ХОБП пацијената који користе ССс или ENDS. Вредности су приказане као средња вредност ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Фигура 5. Укупни бројеви IFN- γ - продукујућих имуних ћелија у крвним узорцима непушача, пушача и ENDS корисника међу здравим добровољцима (контрола) и пацијентима са ХОБП-ом, са репрезентативним тачкастим дијаграмима, показују модулирани капацитет за цитокинску секрецију у леукоцитима ХОБП пацијената који користе CCs или ENDS. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



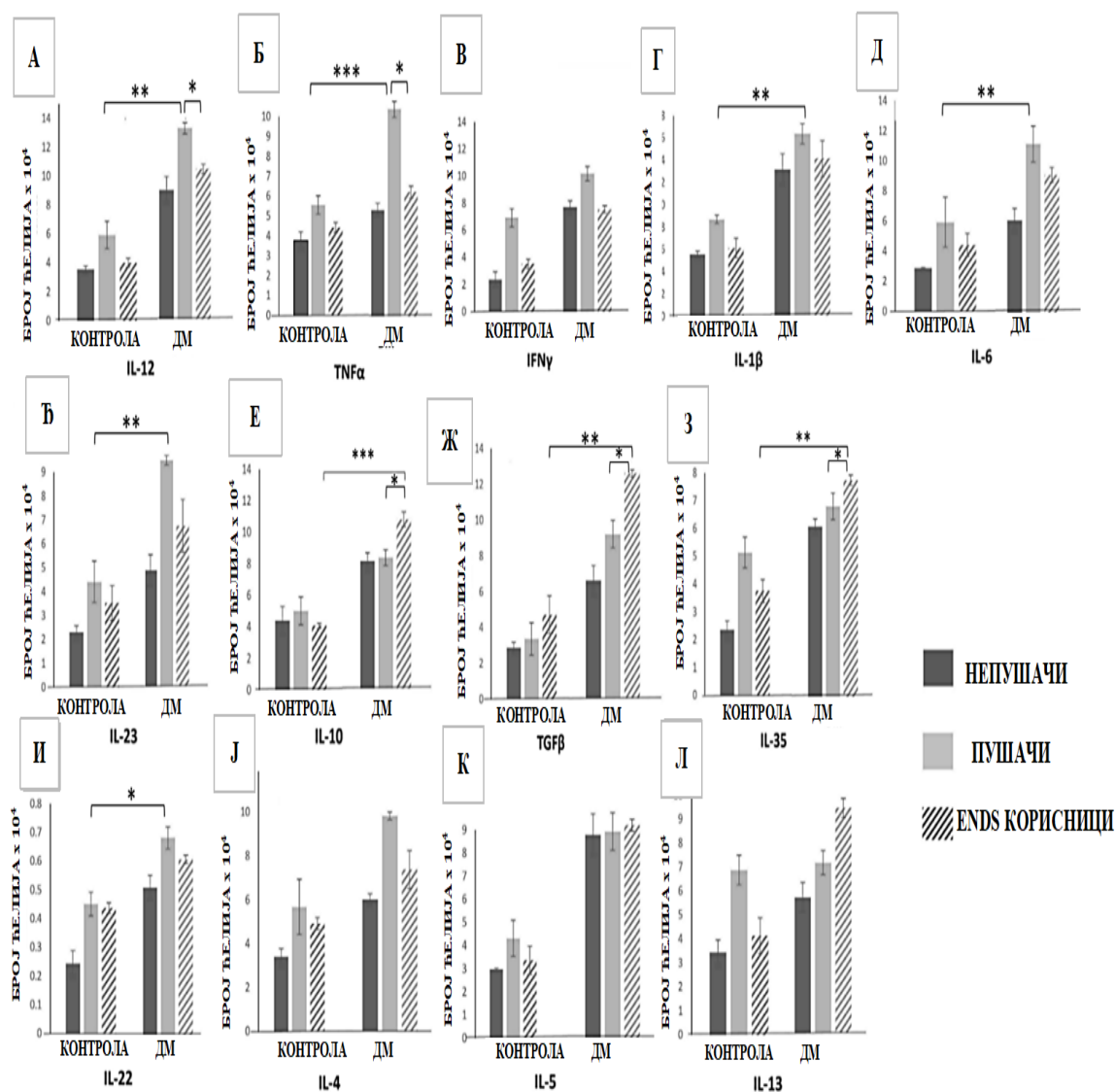
Фигура 6. Ефекти узроковани применом CCs и ENDS-а на ниво проинфламацијских и имуносупресивних цитокина у серуму здравих контрола и ХОБП пацијената. Измерене серумске концентрације TNF- α (А), IL-1 β (Б), IL-13 (В), IL-17 (Г), IL-22 (Д), IL-23 (Ђ), IL-6 (Е), IFN γ -(Ж), IL-10 (З), IL-35 (И) и TGF- β (Ј) у узорцима непушача, пушача и ENDS корисника међу волонтерима и ХОБП пацијентима показују измењену продукцију проинфламацијских и имуносупресивних цитокина код пацијената оболелих од ХОБП-а. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.2. У поређењу са CCs, ENDS су показали слабији капацитет да промовишу производњу инфламацијских цитокина у Th1 и Th17 лимфоцитима пацијената оболелих од ДМ-а

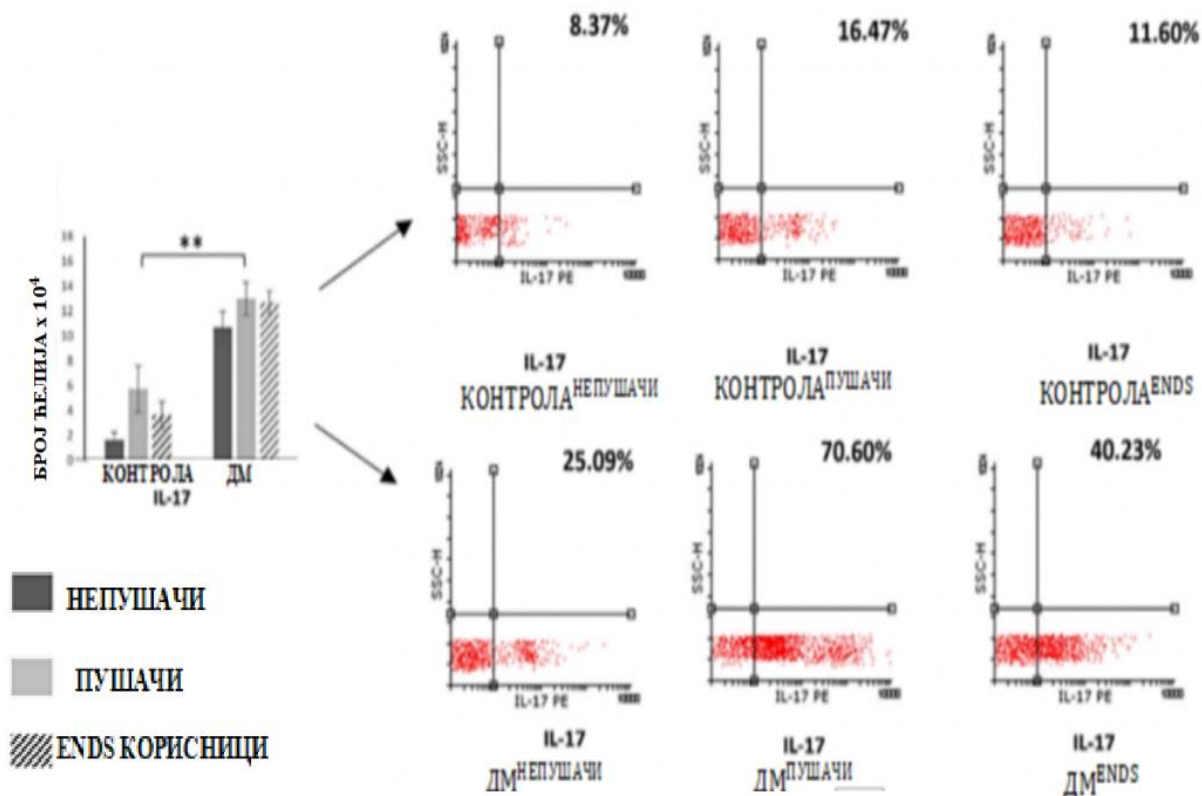
Анализом серумских концентрација цитокина TNF- α и IL-1 β и параметара прогресије шећерне болести, нивоа гликемија и гликолизираног хемоглобин (енгл. *Glycosylated hemoglobin*, HbA1c) у крви пацијената који су користили CCs и ENDS, уочена је позитивна корелација (коефицијенти корелације су били у распону од 0,066–0,849; $p < 0,05$). Наиме, системска инфламација, подстакнута проинфламацијским цитокинима TNF- α и IL-1 β и инфилтрацијом циркулишућих леукоцита у оштећени панкреас, промовише прогресију ДМ-а (222). Са друге стране, повишени нивои имуносупресивног цитокина IL-35 који ублажава интензитет системске инфламације, негативно су корелирали са HbA1 нивоом код CCs и ENDS корисника који су оболели од ДМ-а (коефицијенти корелације били су у распону од 0,383–0,775 са $p < 0,05$). Мултиваријантна линеарна регресија (са прилагођеним $R^2 = 62,5\%$, $F = 42,594$; $p < 0,001$) показала је да дуготрајна CCs употреба има значајан ефекат на нивое гликемије (вредности веће од 0,153 у CCs групи у поређењу са групом непушача) и вредности HbA1c (вредности веће од 0,09 у CCs групи у поређењу са групом непушача).

Th1 и Th17 имунски одговор има важну улогу у деструкцији бета ћелија панкреаса које производе инсулин (223). У складу са тим, повећани нивои Th1- и Th17-повезаних инфламаторних цитокина у серуму ДМ пацијената значајно доприносе промоцији системског инфламацијског одговора и последично развоју дијабетес-специфичних компликација (224).

У крви ДМ пацијената који користе CCs и ENDS је детектован повећан укупни број имунских ћелија које производе Th1-(IL-12, TNF- α , IFN- γ (Фигура 7)) и Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-23 (Фигура 7) и IL-17 (Фигура 8.)) цитокине у поређењу са ДМ пацијентима који су непушачи. Сходно томе, уочене су и повећане концентрације ових проинфламацијских цитокина у серумским узорцима пушача и ENDS корисника у поређењу са непушачима оболелих од ДМ-а (Фигура 9).

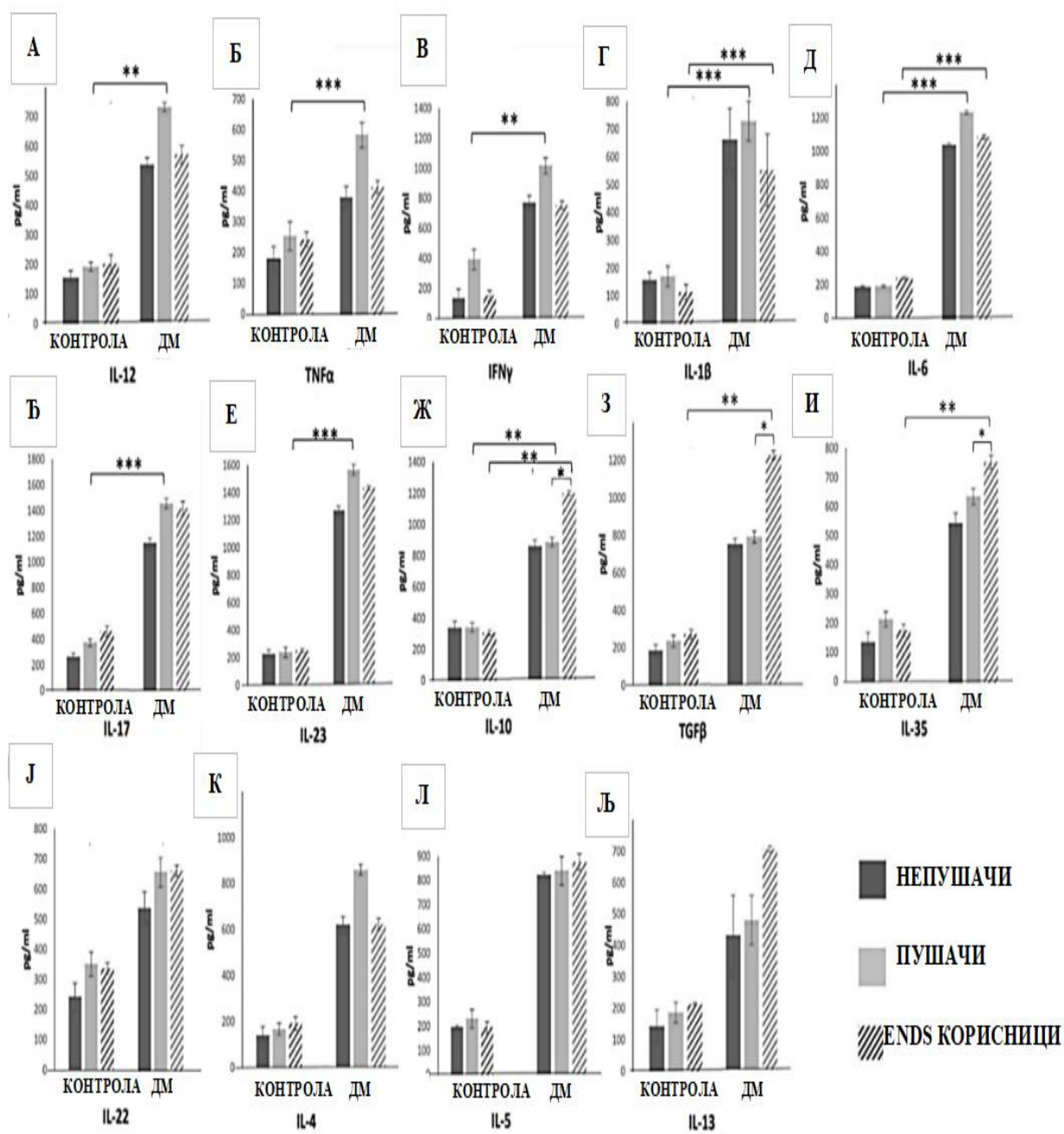


Фигура 8. Ефекти CCs и ENDS-а на модулацију секреције цитокина код здравих волонтера и пацијената оболелих од ДМ-а. Ниже вредности укупног броја Th1 ћелија које производе проинфламацијске цитокине IL-12(A), TNF-α (Б), IFN-γ (В) и Th17 ћелија које секретују IL-1β (Г), IL-6(Д), IL-23(Ѕ) а више вредности укупног броја имуносупресивних IL-10-(Е), TGF-β-(Ж) и IL-35-(З)-продукујућих имунских ћелија детектоване су у крви ДМ пацијената који су ENDS корисници у поређењу са CCs. Статистички значајна разлика између ефеката употребе CCs и ENDS-а на укупан број имунских ћелија које секретују IL-22(И), IL-4(Ј), IL-5(К) или IL-13(Л) није детектована. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM;* $p < 0,05$,** $p < 0,01$,*** $p < 0,001$.



Фигура 8. Секреција цитокина IL-17 је значајно промовисана конзумацијом CCs. Репрезентативни тачкасти дијаграми приказују IL-17-продукујуће ћелије у узорцима непушача, пушача и ENDS корисника из групе здравих волонтера и групе ДМ пацијената (Е). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Коришћење ENDS-а, у поређењу са CCs, блажим интензитетом индукује производњу Th1- и Th17-проинфламацијских цитокина код пацијената оболелих од ДМ-а. У крви ДМ пацијената који су корисници ENDS-а је запажен мањи укупан број имунских ћелија које производе TNF- α -, IL-12-, IFN- γ -, IL-1 β -, IL-6- (Фигура 7) и IL-17 (Фигура 8), док су у њиховим серумским узорцима детектовани нижи нивои TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17 (Фигура 9) цитокина, у односу на ДМ пацијенте који користе CCs. Супротно слабијем ефекту да промовишу секрецију проинфламацијских цитокина у поређењу са CCs, ENDS ефикасније подстиче експанзију леукоцита који секретују имunosупресивне цитокине IL-10 и TGF- β што се манифестује и повећаним концентрацијама ових цитокина у серуму. Додатно, ENDS подстиче имunosупресију и преко секреције цитокина IL-35, чије повишене вредности концентрације су детектоване у серумима ДМ пацијената који су ENDS корисници у поређењу са непушачима и корисницима CCs. Употреба и CCs и ENDS-а је узроковала повећану синтезу цитокина IL-22, али није показала значајан ефекат у продукцији Th2-повезаних цитокина (IL-4, IL-5, IL-13) код ДМ пацијената (Фигура 7,9).



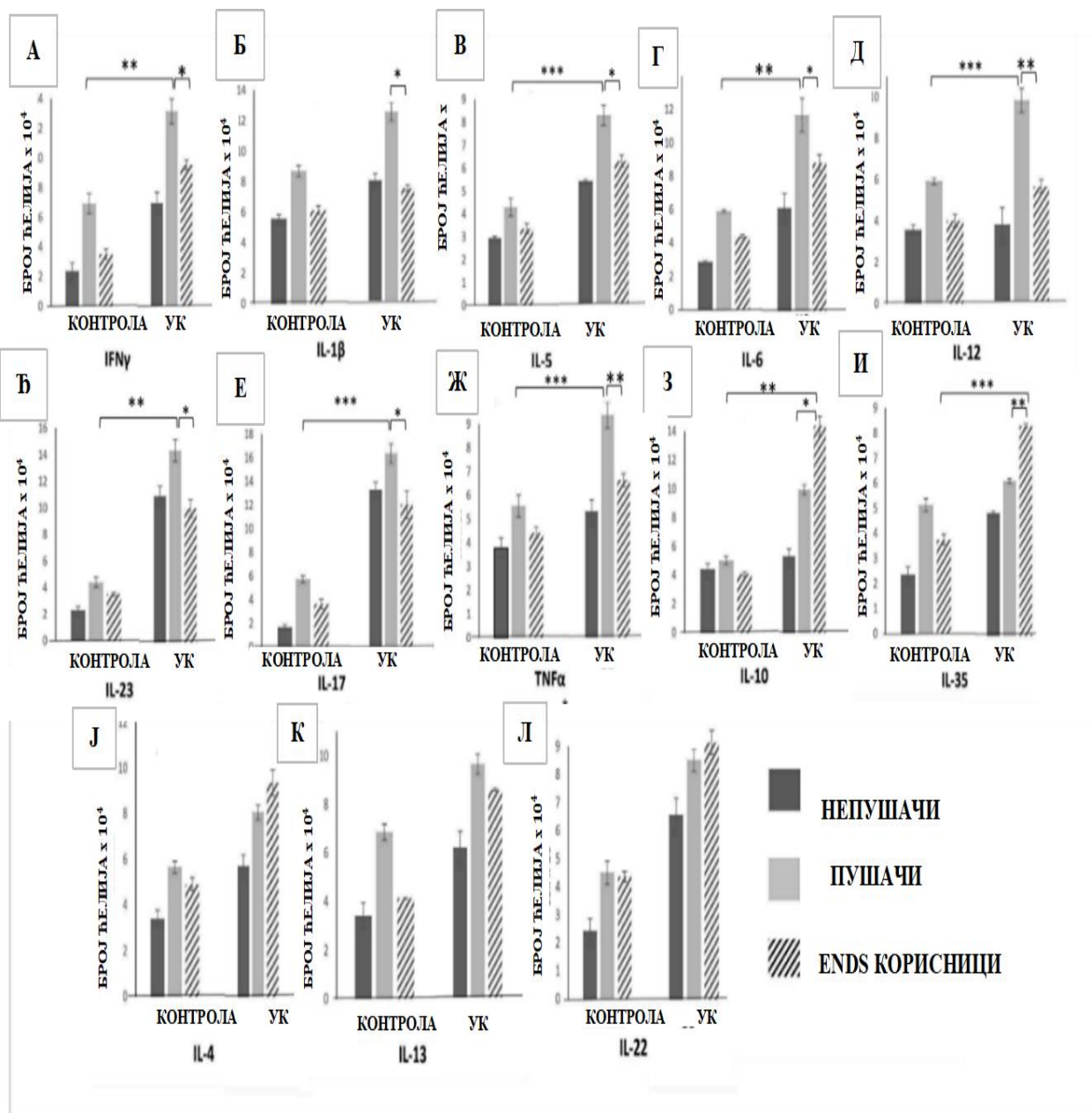
Фигура 9. Имуномодулаторна дејства CCs и ENDS-а на ниво проинфламацијских и имуносупресивних цитокина у серуму здравих и ДМ испитаника. CCs узрокује већи пораст концентрације Th1- (IL-12 (A), TNF-α (Б), IFN-γ (В)) и Th17- ((IL-1β (Г), IL-6 (Д), IL-17 (Ђ), IL-23 (Е)) цитокина у серуму ДМ пацијената у односу на ENDS. Међутим, ENDS показује већи капацитет да индукује секрецију имуносупресивних цитокина TGF-β (Ж), IL-10 (З) и IL-35 (И). Није детектована статистички значајна разлика у концентрацији цитокина IL-22(Ј), IL-4(К), IL-5(Л), IL-13(Љ) у серуму пушача и ENDS корисника оболелих од ДМ-а. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.2.3. У поређењу са CCs, ENDS ефикасније подстичу синтезу имуносупресивних цитокина у имунским ћелијама пацијената оболелих од УК-а

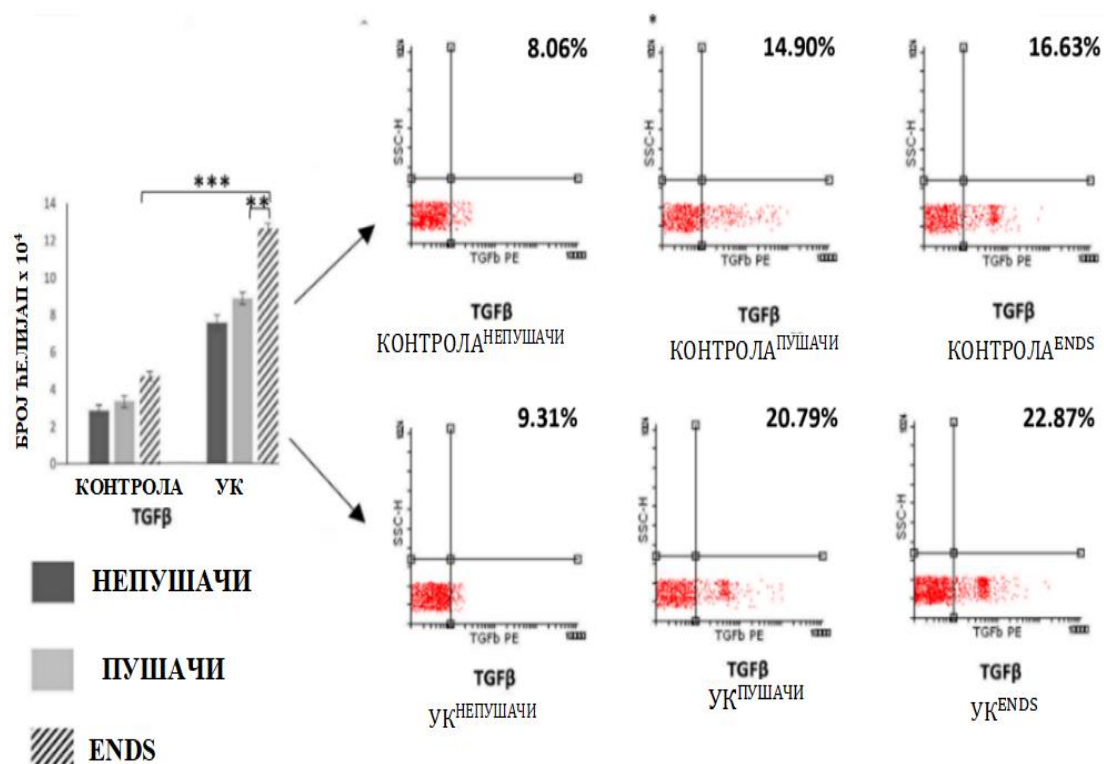
Имунске ћелије преко свог секрета модулирају системски инфламацијски одговор и утичу на ток УК-а (225-226). Повећан укупан број моноклеарних ћелија (Фигуре 10-11.) и значајно повишене концентрације инфламацијских цитокина (Фигура 12) детектовани су код УК пацијената у односу на здраве волонtere. Анализа крвних узоракa пацијената указује да лонгитудинална употреба CCs и ENDS-а узрокује промене у секреторном капацитету имунских ћелија и последично узрокује прогресију болести.

Статистички значајно мање вредности укупног броја имунских ћелија које секретацијом IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, IL-23, IL-17 покрећу проинфламацијски одговор и вредности серумских концентрација ових цитокина су детектоване код УК пацијената који користе CCs и ENDS у поређењу са УК непушачима (Фигура 10.).

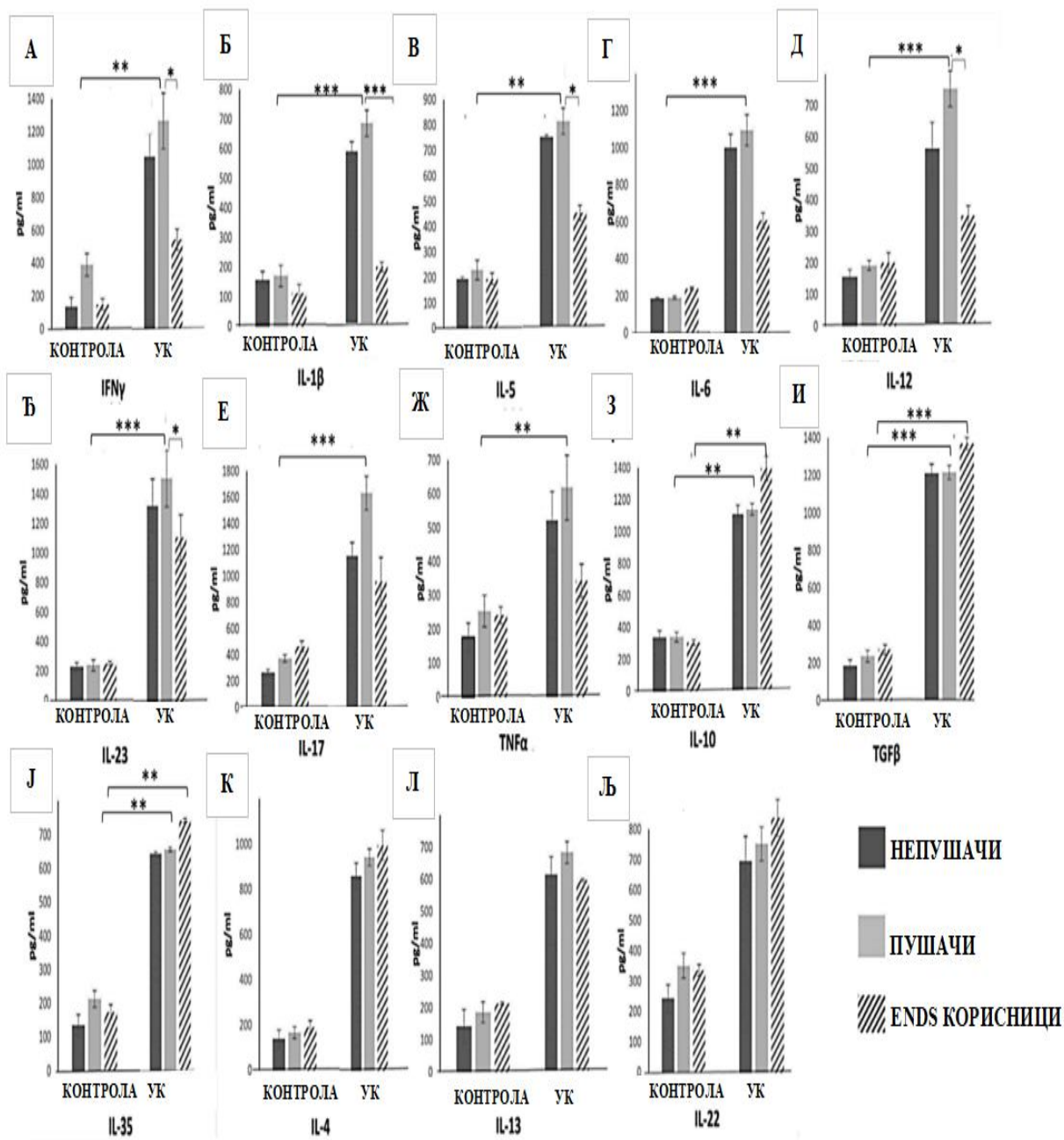
Међутим, детектоване су значајне варијације у имуномодулацији које изазивају CCs и ENDS код УК пацијената. ENDS мањим капацитетом узрокују експанзију ћелија које секретују IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, IL-23, IL-17- и TNF- α , и ефикасније повећавају број имунских ћелија које секретују IL-10, IL-35 (Фигура 10) и TGF- β (Фигура 11.). Овај тренд је потврђен у серумским узорцима УК пацијената где су детектоване ниже концентрације цитокина IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, IL-23, IL-17 и TNF- α и повишени нивои IL-10, IL-35 и TGF- β код ENDS корисника у поређењу са CCs (Фигура 12). Нису уочене значајне разлике у секретацији цитокина IL-4, IL-13 и IL-22 између УК пацијената који су непушачи или корисници CCs и ENDS-а.



Фигура 10. Коришћење ENDS-а индукује повећану секрецију имunosупресивних цитокина у имунским ћелијама УК пацијената. Анализа вредности укупног броја IFN-γ-(А), IL-1β-(Б), IL-5-(В), IL-6-(Г), IL-12-(Д), IL-23-(Ѕ), IL-17-(Е), TNF-α-(Ж), IL-10-(З), IL-35-(И), IL-4-(Ј), IL-13-(К) и IL-22 (Л)-секретујућих имунских ћелија, показује да ENDS узрокују значајно већу експанзију леукоцита који ослобађају имunosупресивне цитокине у односу на УК непушаче и CCs кориснике. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.



Фигура 11. Анализа проточне дитометрије је детектовала значајно већи број TGF- β -секретујућих имунских ћелија. Репрезентативан тачкасти графикон показује да ENDS узрокују значајно већу експанзију леукоцита који ослобађају имunosупресивне цитокине у односу на УК непушаче и CCs кориснике. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Фигура 12. CCs и ENDS употреба различито утичу на нивое проинфламацијских и имunosупресивних цитокина у серумским узорцима здравих волонтера и УК пацијената. Вредности серумских концентрација IFN- γ (А), IL-1 β (Б), IL-5 (В), IL-6 (Г), IL-12 (Д), IL-23 (Ђ), IL-17 (Е), TNF- α (Ж), IL-10 (З), IL-35 (И), TGF- β (Ј), IL-4 (К), IL-13 (Л) и IL-22 (Љ) код здравих волонтера и УК пацијената који су непушачи или корисници CCs или ENDS-а показују да ENDS промовише производњу инфламацијских цитокина слабијим интензитетом, а производњу имunosупресивних цитокина значајно јачим интензитетом у поређењу са CCs. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3. Утицај CCs и ENDS-а на развој и прогресију хроничне опструктивне болести плућа

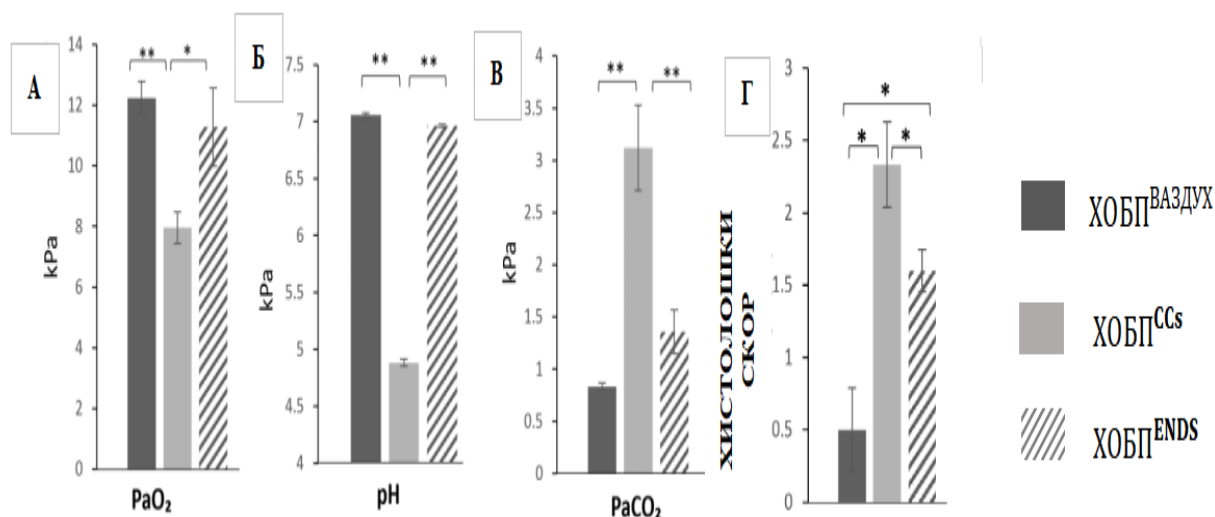
Хронична изложеност дуванском диму CCs или аеросолу ENDS-а у трајању од 4 недеље изазвало је оштећење плућа посредовано имунским ћелијама. Дакле, иако су CCs и ENDS узроковале развој ХОБП-а, ENDS је промовисао имунски одговор слабијег интензитета у поређењу са CCs и самим тим изазвао нижи степен упале и оштећења плућа код експерименталних животиња.

С обзиром на то да је потврђено успостављање ХОБП-а након излагања експерименталних животиња дуванском диму CCs у интервалу од 4 недеља, у циљу испитивања прогресије болести, мишеви након ХОБП-индукције подељени у 3 групе ХОБП^{ВАЗДУХ}, ХОБП^{CCs} и ХОБП^{ENDS} на основу третмана којима су били изложени наредне 4 недеље.

Узорци периферне крви ХОБП пацијената из групе непушача, пушача и ENDS корисника су коришћени за испитивање утицаја CCs и ENDS-а на прогресију ХОБП код људи.

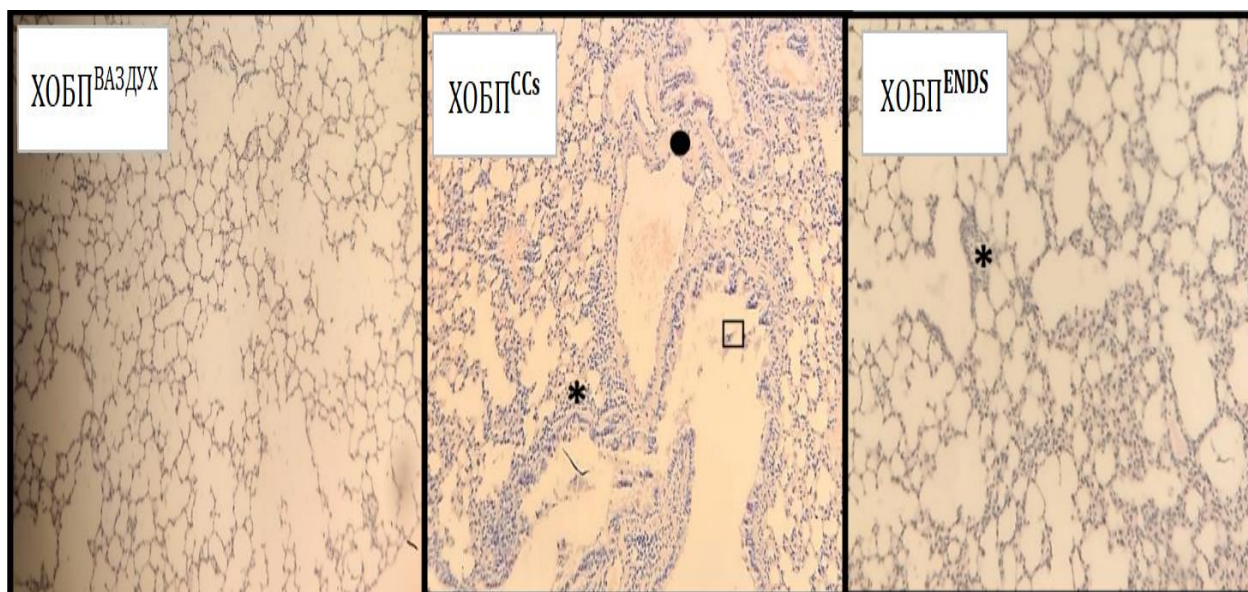
4.3.1. Оштећење ткива и инфламација су били израженији у плућима мишева изложених дуванском диму у поређењу са мишевима који су били изложени аеросолу ENDS-а

Озбиљна респираторна дисфункција је детектована код мишева изложених CCs (Фигура 13А–В). Значајно смањене вредности PaO_2 (Фигура 13А, $p < 0,01$) и pH (Фигура 13Б, $p < 0,05$) и значајно повећане вредности $PaCO_2$ (Фигура 13В, $p < 0,01$) уочене су у артеријској крви животиња које су биле изложене CCs, у поређењу са контролном групом животиња изложених чистом ваздуху. Ови резултати указују да CCs-изложеност испољава снажан негативан ефекат на размену гасова између алвеола и плућних капиlara. Са друге стране, изложеност ENDS-у није довела до значајних промена у плућној вентилацији кисеоника и угљен-диоксида у односу на контролну групу мишева (Фигура 13А–В). Такође, изложеност ENDS-у није узроковала значајни пад нивоа PaO_2 и pH и раст нивоа $PaCO_2$ као CCs, потврђујући да загревање дувана изазива штетне ефекте на респираторну функцију мишева у мањој мери него сагоревање. Нижи степен инфламације и оштећења плућног ткива потврђени су хистолошким скором који је био знатно нижих вредности код ENDS мишева у поређењу са мишевима из CCs групе (Фигура 13Г, $p < 0,01$).



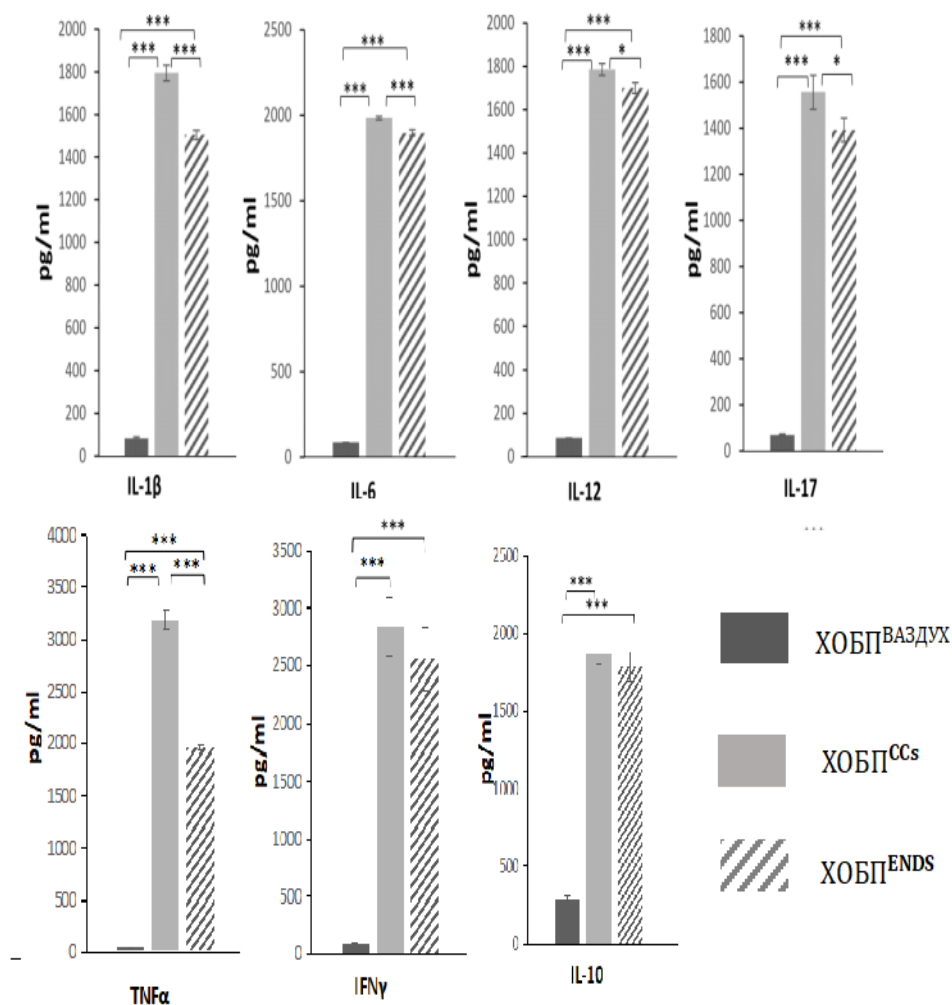
Фигура 13. Нижи степен упале и оштећења плућа детектовани су код ENDS-изложених мишева у поређењу са CCs групом. Гасне анализе су потврдиле поремећаје у размени гасова односно ниже вредности PaO₂ (A) и pH (Б) и више вредности PaCO₂ (В) у CCs групи у односу на контролну и ENDS групу. Хистолошки скор оштећења плућа (Г) приказује најозбиљнији степен упале у групи CCs-изложеним мишевима. Вредности су приказане као средња вредност ±SEM; n=6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Хистопатолошка анализа је показала да су зидови алвеола и капилара били интактни и да је свега пар лимфоцита било присутно у паренхиму плућа експерименталних животиња изложених чистом ваздуху (Слика 10). Међутим, инфламацијске промене у плућима животиња су очене након излагања CCs и ENDS-у (Слика 10). Мањи степен ћелијске инфилтрације и алвеоларне деструкције је уочен у плућном паренхиму мишева изложених ENDS-у (Слика 10) него код мишева изложених CCs (Слика 10). У плућним ткивима мишева изложених CCs су детектоване бројне промене попут разарања алвеоларног зида, дилатације алвеоларне септе, проширења крвних судова и конгестија узроковане импозантном инфилтрацијом леукоцита (Слика 10). Насупрот томе, плућа изложена ENDS-у су била очувана са свега пар инфилтрата имунских ћелија (Слика 10).



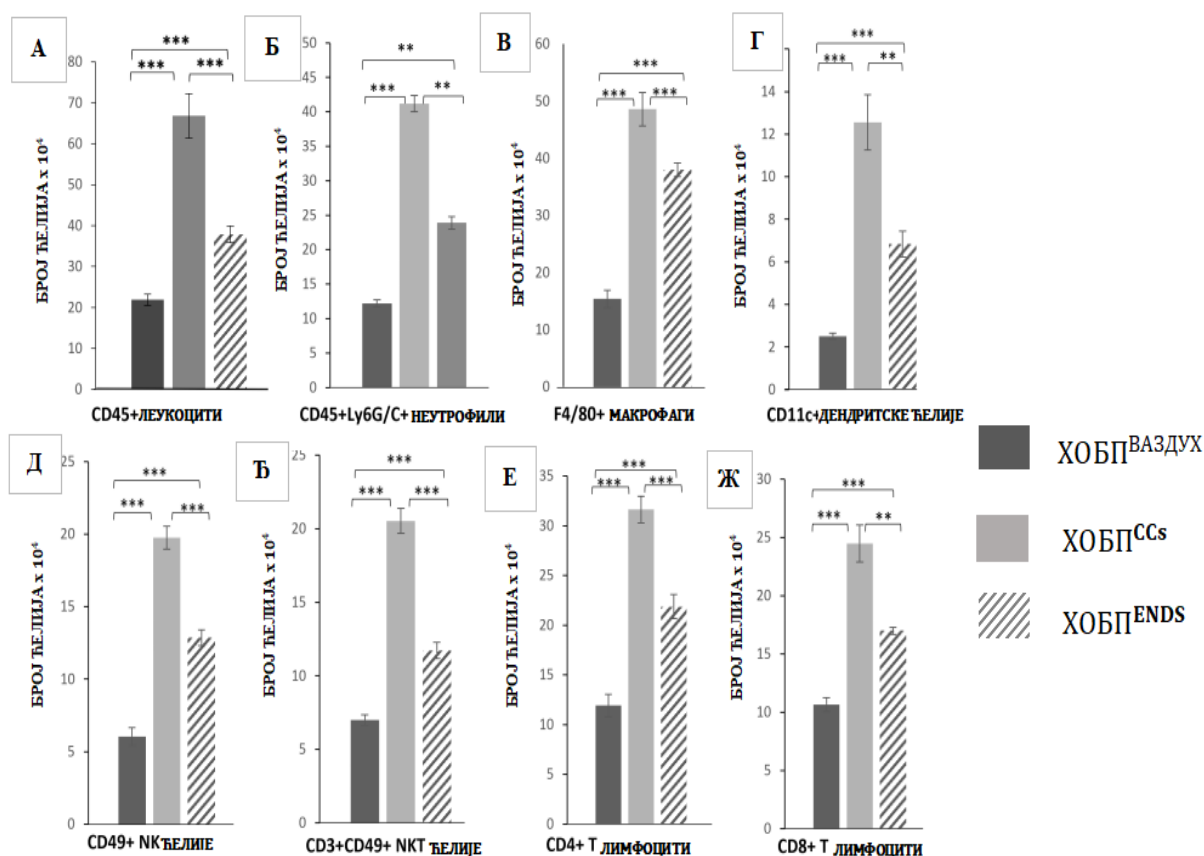
Слика 9. Репрезентативне фотографије плућних ткива бојених Н&Е приказују најозбиљније патолошке промене узроковане упалом (* инфилтрација леукоцита, □ десквамација епитела, ● проширење епитела) у групи CCs-изложеним мишевима у компарацији са контролним и ENDS-у изложеним мишевима (увећања (×100).

У складу са резултатима хистолошке анализе, измерене серумске концентрације цитокина IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, TNF α , IFN γ и IL-10 важних за развој и прогресију респираторне дисфункције, значајно су биле повишене код мишева изложених CCs и ENDS-у у односу на контролну групу (Фигура 14). Значајно нижи нивои инфламацијских цитокина детектовани су у серумским узорцима ENDS-изложених мишева у поређењу са мишевима третираним CCs (Фигура 14), имплицирајући да изложеност ENDS-у узрокује системски инфламацијски одговор мањег интензитета него CCs. Нису уочене значајне разлике у степену инфламације и оштећења плућа између мушког и женског пола мишева изложених CCs и ENDS-у.



Фигура 14. Серумске концентрације инфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, TNF α , IFN γ , IL-10) биле су значајно повећане у узорцима CCs мишева него у узорцима контролних и ENDS-мишева (Ћ). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

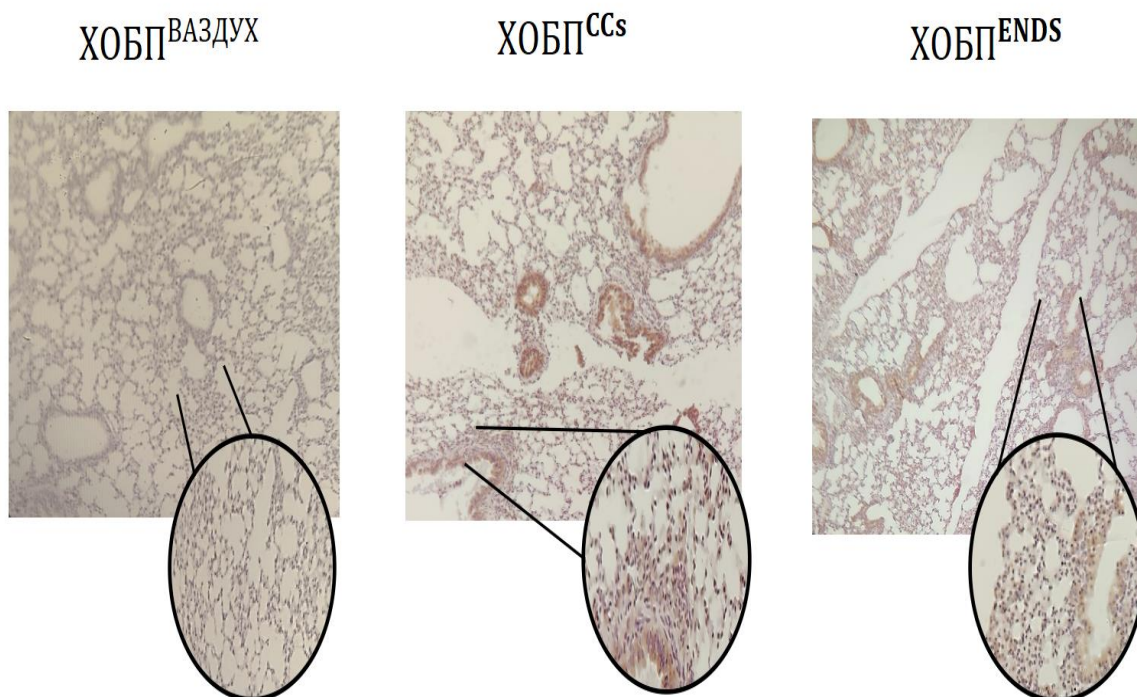
Повећан број имунских ћелија, укључујући макрофаге, Т лимфоците, дендритске ћелије, NK и NKT ћелије, уочен је у узорцима плућа CCs- и ENDS-изложеним мишевима у односу на контролну групу (Фигура 15А–Ж). Значајно мањи број CD45+леукоцита (Фигура 15А, $p < 0,001$), CD45+Ly6G/C+неутрофила (Фигура 15Б, $p < 0,01$), F4/80+макрофага (Фигура 15В, $p < 0,001$), CD11c+DC ћелија (Фигура 15Г, $p < 0,01$), CD49b+NK и CD3+CD49b+NKT ћелија (Фигура 15Д–Ђ, $p < 0,001$), CD4+ (Фигура 15Е, $p < 0,01$) и CD8+Т лимфоцита (Фигура 15Ж, $p < 0,01$) детектован је у плућима мишева из групе ENDS у односу на CCs групу, потврђујући да загревање дувана и генерисање аеросола изазива слабију инфламацију изазвану имунским ћелијама у поређењу са сагоревањем дувана, односно дуванским димом.



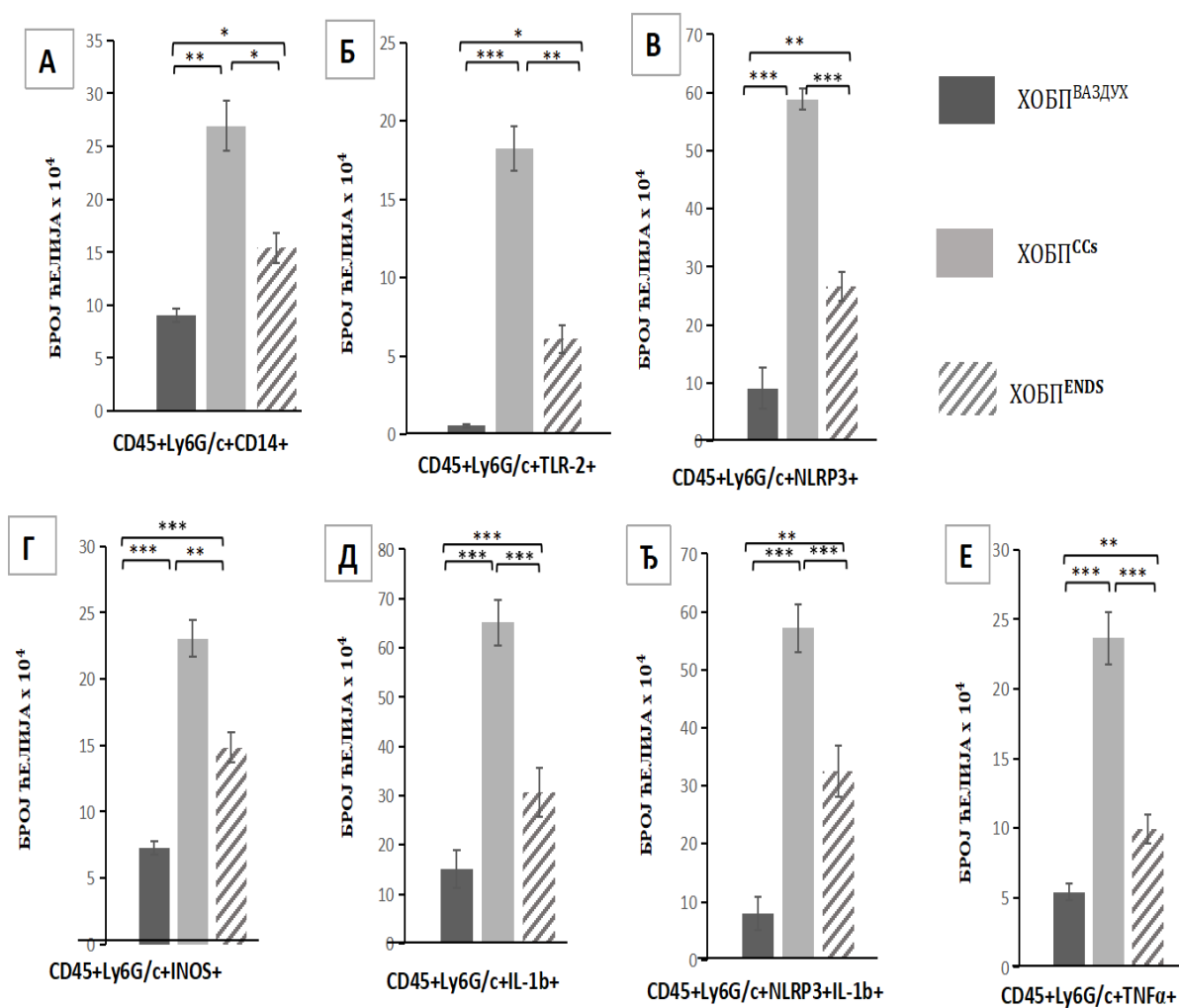
Фигура 15. Проточна цитометрија је открила највећи број CD45+леукоцита (А), CD45+Ly6G/C неутрофила (Б), F4/80+макрофага (В), CD11c+дендритске ћелије (Г), CD49+природне ћелије убице (NK) (Д), CD3+CD49+природне ћелије убице Т (NKT) (Ђ), CD4+Т лимфоцити (Е), CD8+Т лимфоцити (Ж) у плућима CCs-мишева у поређењу са контролним и ENDS-мишевима. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.2. Слабији интензитети активације инфламазома и секреције проинфламацијских цитокина детектовани су у неутрофилима и макрофагима инфилтрираним у плућима мишева изложеним аеросолима ENDS-а у односу на неутрофиле и макрофаге из плућа мишева излаганих дуванском диму

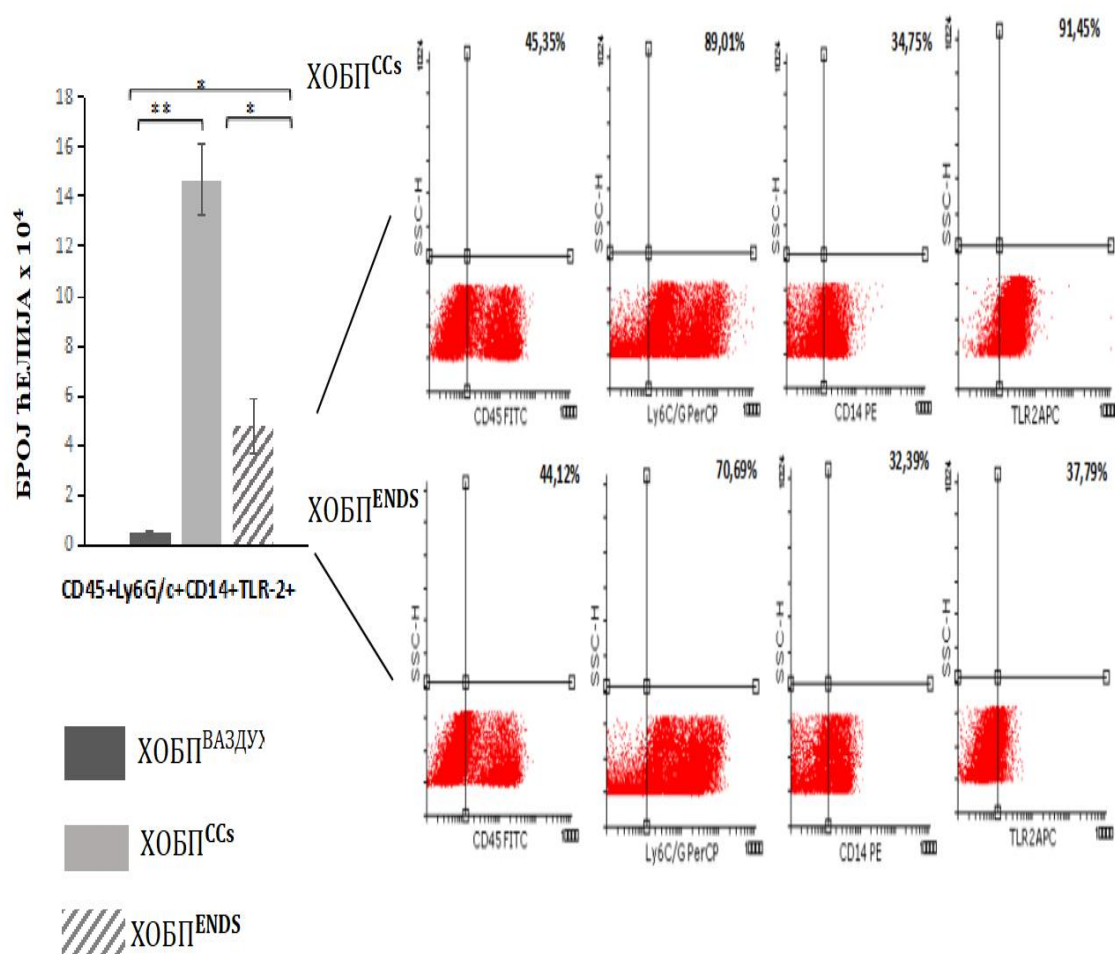
Имунохистохемијом (Слика 11) и проточном цитометријом (Фигура 16-17) анализирани су неутрофили који су били инфилтрирани у плућима мишева и резултати су показали значајно већи укупан број CD14+, TLR2+, NLRP3+, iNOS-експресујућих и TNF- α или IL-1 β -секретујућих CD45+Ly6G/C неутрофила након излагања CCs и ENDS-у у односу на чист ваздух. Дакле, и CCs и ENDS узрокују активацију инфламазома што последично води до повећане секреције NO и инфламацијских цитокина у оштећеним плућима (Фигура 16-17). Ипак, компарацијом њихових ефеката, уочен је мањи број неутрофила након излагања ENDS-у у односу на CCs, и то CD14-, TLR2- (Фигура 16А-Б, $p < 0,05$), CD14-TLR2- (Фигура 17, $p < 0,05$), NLRP3- (Фигура 16В, $p < 0,001$) и iNOS- (Фигура 16Г, $p < 0,01$) експресујућих и IL-1 β и TNF- α (Фигура 16Д-Е $< 0,001$)-секретујућих Ly6G/C+ ћелија. Дакле, ENDS поседује слабији капацитет да промовише инфламацијски фенотип у неутрофилима инфилтрираних у плућа мишева него CCs.



Слика 10. Имунохистохемијском анализом је детектовано редуковано присуство Ly6G/c+ неутрофила у оштећеним, инфламраним плућима експерименталних животиња изложених ENDS-у у односу на мишеве из групе CCs.



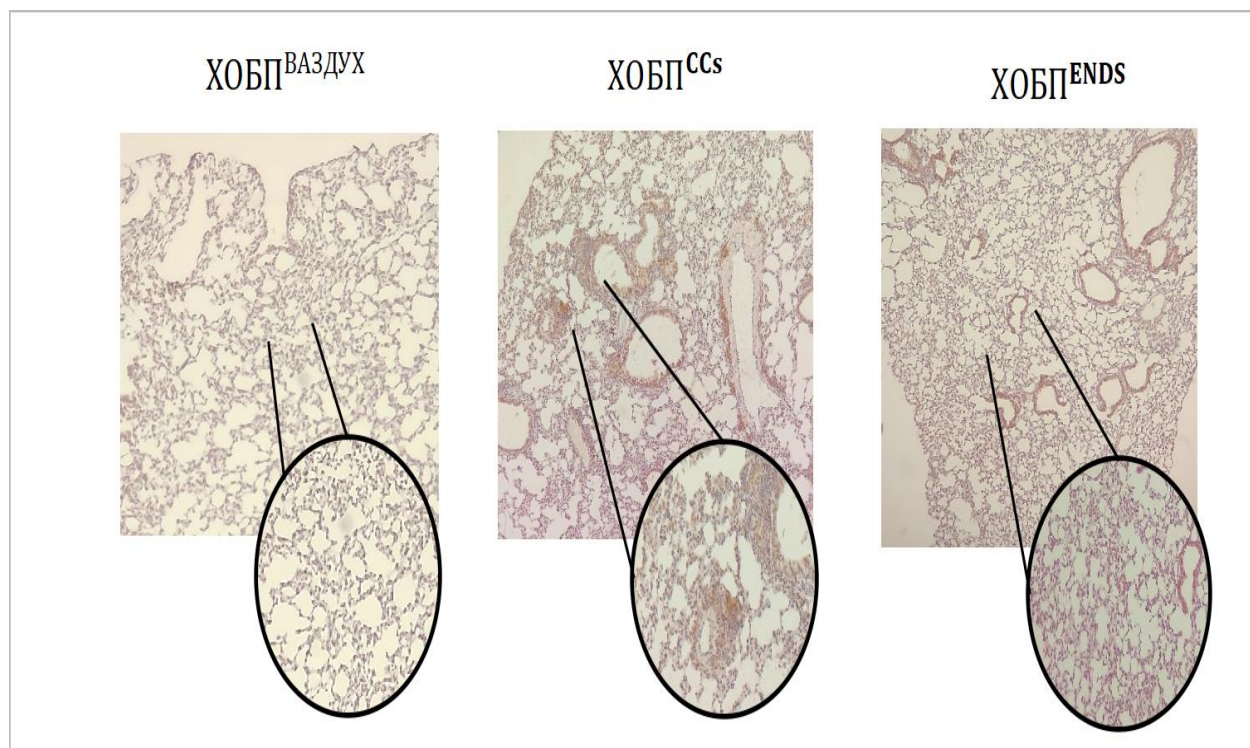
Фигура 16. Значајно слабија активација инфламазома и промоција проинфламацијског фенотипа у неутрофилима детектована је у инфилтрираним плућима мишева изложених ENDS-у у односу на CCs. Повећан укупан број CD14+(А), TLR2+(Б), NLRP3+(В), iNOS+(Г) IL-1β+(Д), NLRP3+IL1β+(Ђ), TNF-α+(Е) CD45+Ly6G/C+ неутрофила уочен је у плућима мишева из групе CCs у односу на контролну и ENDS групу. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n = 6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



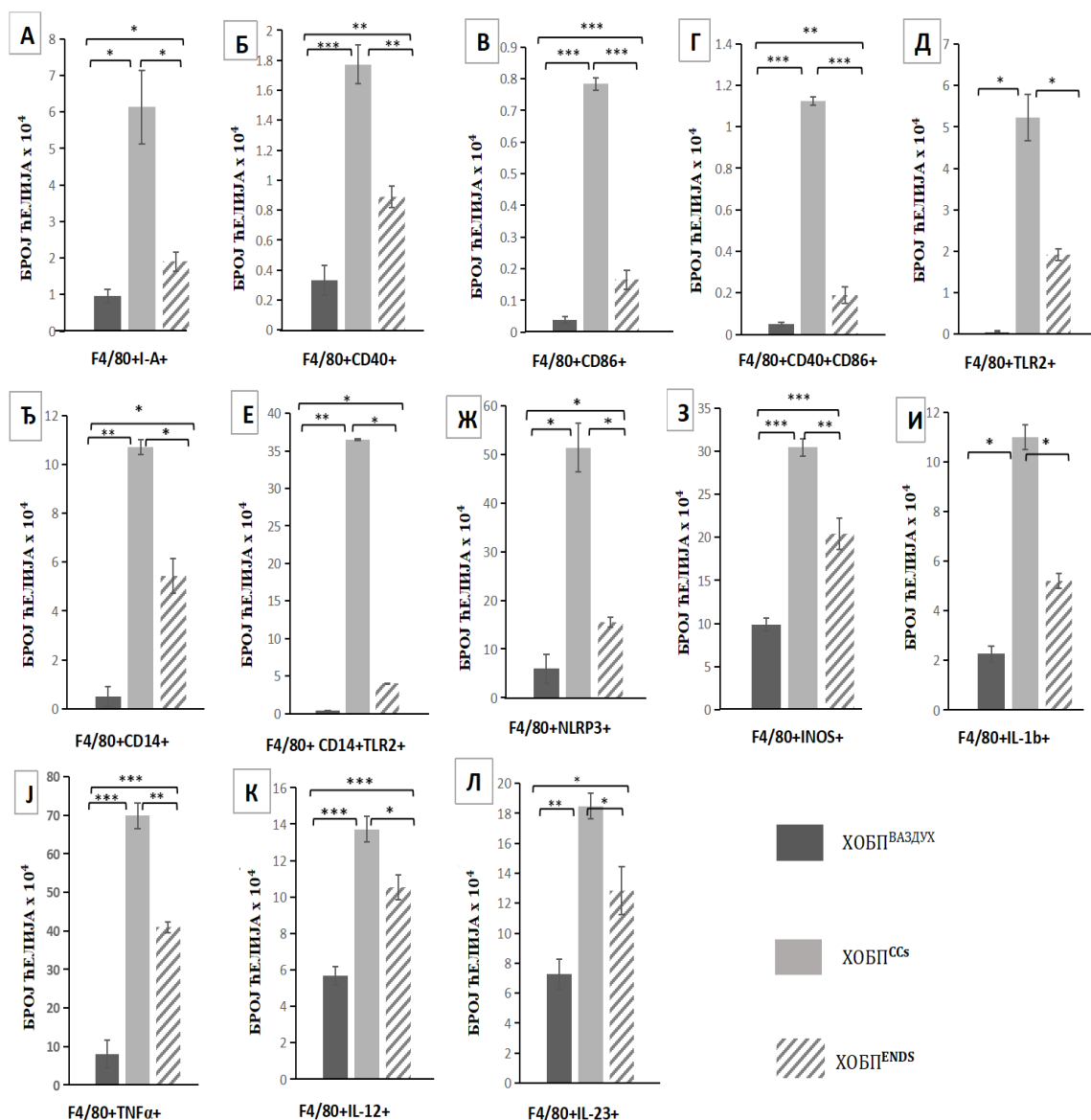
Фигура 17. Репрезентативни тачкасти дијаграми CD45+Ly6C/G+CD14+TLR2+ неутрофила изолованих из плућа мишева показују разлике у ефектима изложености CCs и ENDS-у. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n = 6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Аналогно томе, имунохистохемијска анализа (Слика 12.) и проточна цитометрија популације макрофага CCs и ENDS су узроковали повећање броја I-A+, CD40+, CD86+, TLR2+, CD14+, NLRP3+и INOS+ експресујућих и IL-1 β +, TNF- α +, IL-12 и IL-23-продукујућих F4/80+макрофага у односу на изложеност ваздуху (Фигура 18А-Ј). Макрофаги који су изоловани из плућа мишева изложених ENDS-у имали су слабији капацитет за презентацију антигена услед ниже експресије I-A молекула (МНС класа II) (Фигура 18А, p<0,05) и костимулаторних молекула CD40 и CD86 (Фигура 18Б-Г, p<0,001) у односу на мишеве изложене ваздуху и CCs.

Додатно, детектована је и смањена активација NLRP3-инфламазома зависна од TLR2 и CD14 (Фигура 18Д-Ж, $p < 0,01$), слабија iNOS активност (Фигура 18З, $p < 0,01$) и снижена секреција инфламацијских цитокина IL-1 β , TNF- α , IL-12 и IL-23 (Фигура 18И-Л, $p < 0,05$), што указује да ENDS мањим интензитетом од CCs активирају инфламазом и промовишу проинфламацијски фенотип у макрофагима инфилтрираним у оштећеним плућима.



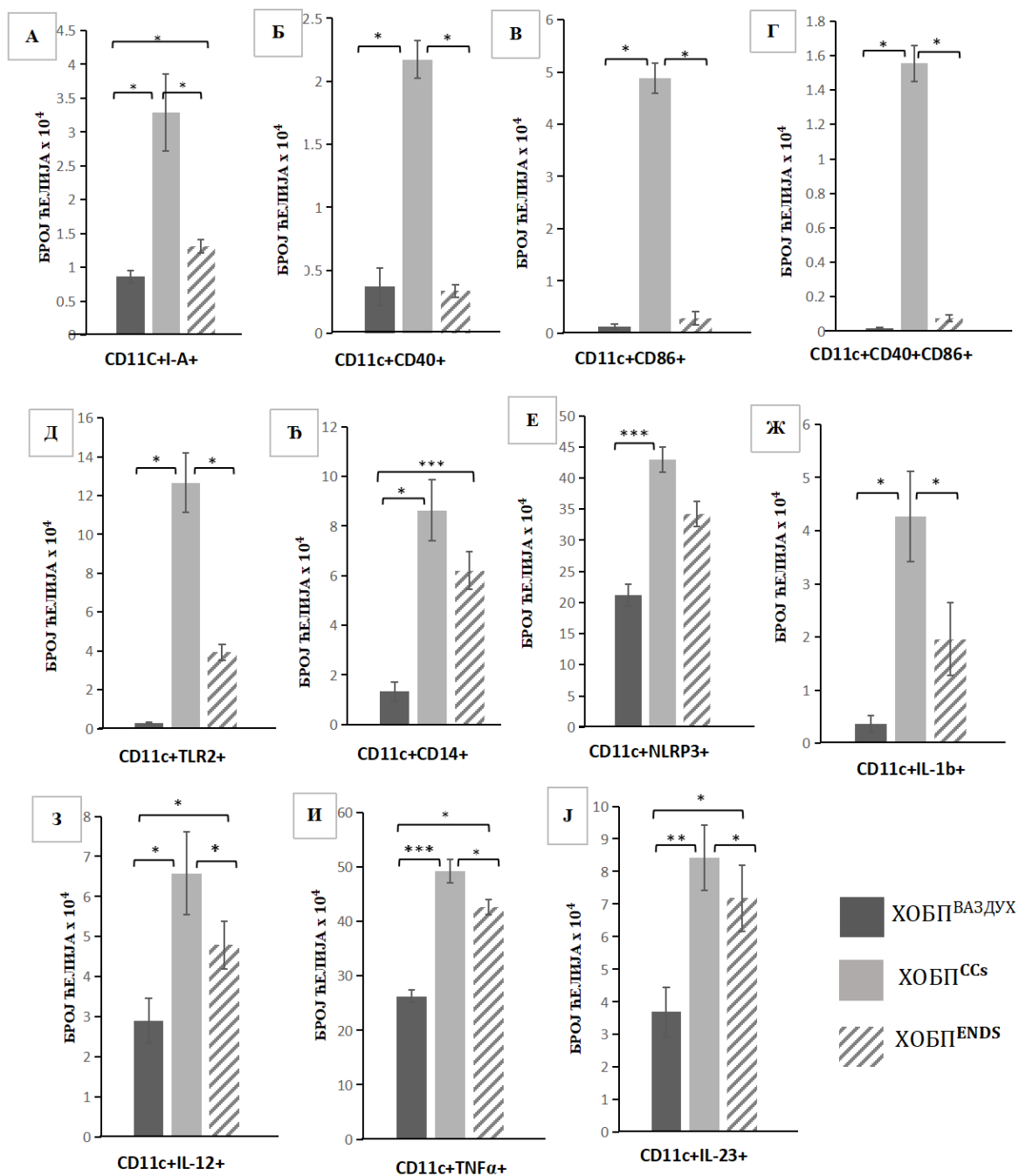
Слика 11. Имунохистохемијска анализа је детектовала значајно нижи број проинфламацијских макрофага у плућима мишева изложених ENDS-у у поређењу са CCs-групом мишева.



Фигура 18. Значајно нижи број проинфламацијских макрофага детектован је у плућима мишева изложених ENDS-у у поређењу са CCs. F4/80+ макрофаги који експримирају I-A+(A), CD40+(Б), CD86+(В), CD40+CD86+(Г), TLR2+(Д), CD14+(Ђ), TLR2+CD14+(Е), NLRP3+(Ж) и INOS+(З) и секретију IL-1β+(и), TNF-α+(Ј), IL-12+(К) и IL-23+(Л) били су присутни у већем броју након излагања дуванском диму CCs него ваздуху и аеросолу ENDS-а. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n = 6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

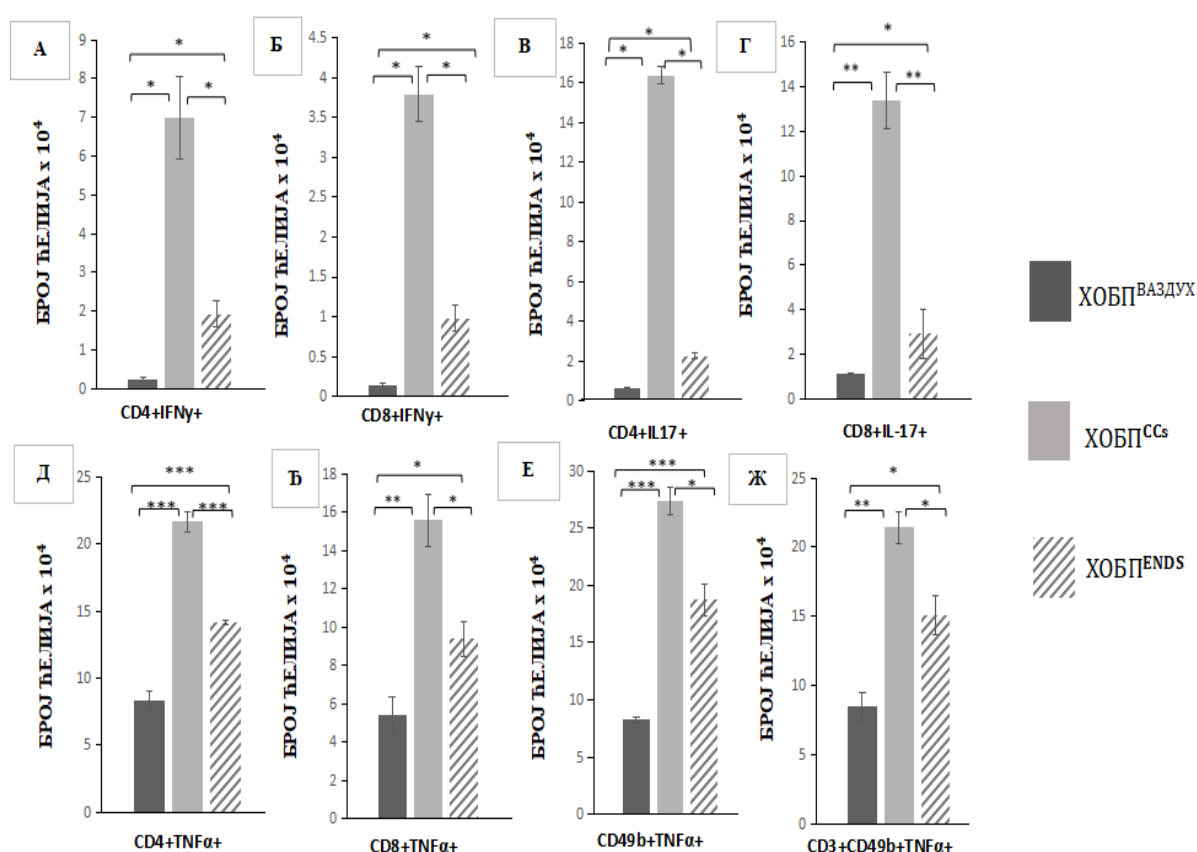
4.3.3. Након излагања ENDS-у, DC показују смањен антиген-презентујући капацитет и нижим интензитетом промовишу инфламацију плућа зависну од Th1 и Th17 ћелија у односу на имунски одговор узрокован изложеношћу дуванског дима

Изложеност CCs или ENDS-у узрокује побољшану способност плућних DC да презентују антигене у односу на изложеност чистом ваздуху (Фигура 19А–Г). У поређењу са CCs, ENDS узрокују значајно слабију експресију I-A (Фигура 19А, $p < 0,05$), CD40, CD86 (Фигура 19Б–Г, $p < 0,05$), TLR2, CD14, NLRP3 (Фигура 19Д–Е, $p < 0,05$) и снижену секрецију Th1 цитокина TNF- α и IL-12 (Фигура 19Ж-З, $p < 0,05$) и Th17 цитокина IL-1 β и IL-23 (Фигура 19И-Ј, $p < 0,05$) у DC локализованих у плућима животиња. Дакле, излагање ENDS-у смањује капацитет DC да стварају ефекторске Th1 и Th17 лимфоците у поређењу са CCs.



Фигура 19. Плућне DC мишева изложених ENDS-у поседују слабији антиген-презентујући капацитет у односу на DC мишева из CCs групе, што последично узрокује слабију инфламацију зависну од Th1 и Th17 ћелија. У односу на контролну групу, и CCs и ENDS су узроковали повећање броја инфламацијских DC које су инфилтрирале плућа. Значајно мањи број DC које експримирају I-A (А), CD40, CD86 (Б-Г), TLR2, CD14, NLRP3 (Д-Е) и продукују IL-1β (Ж), TNF-α (З), IL-12 (И) и IL-23 (Ј) изолован је из плућа ENDS мишева у поређењу са CCs групом. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n = 6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001

У складу са тим, повећана инфилтрација плућа проинфламацијским CD4⁺ и CD8⁺Th1 и Th17 лимфоцитима је детектована у плућима мишева изложених CCs и ENDS-у него у плућима мишева изложених ваздуху (Фигура 20А-З). Значајно мањи укупан број CD4⁺ и CD8⁺Th1 ћелија које секретују IFN- γ (Фигура 20А-Б, $p < 0,05$) и CD4⁺ и CD8⁺Th17 ћелија које продукују IL-17 (Фигура 20В-Г, $p < 0,05$) уочен је у плућима мишева изложених ENDS-у у односу на CCs групу. Додатно, значајно нижи укупан број алвеолотоксичних TNF- α -секретујућих CD4⁺ и CD8⁺Т лимфоцита (Фигура 20Д-Ђ, $p < 0,01$), CD49b + NK и CD3 + CD49b NKT ћелија (Фигура 20Е-Ж, $p < 0,05$) је детектован у оштећеним плућима мишева третираних ENDS-ом у поређењу са резултатима из CCs групе, што указује на слабији капацитет ENDS-а да узрокује озбиљно оштећење плућа и масовну инфламацију посредовану имунских ћелијама него CCs.

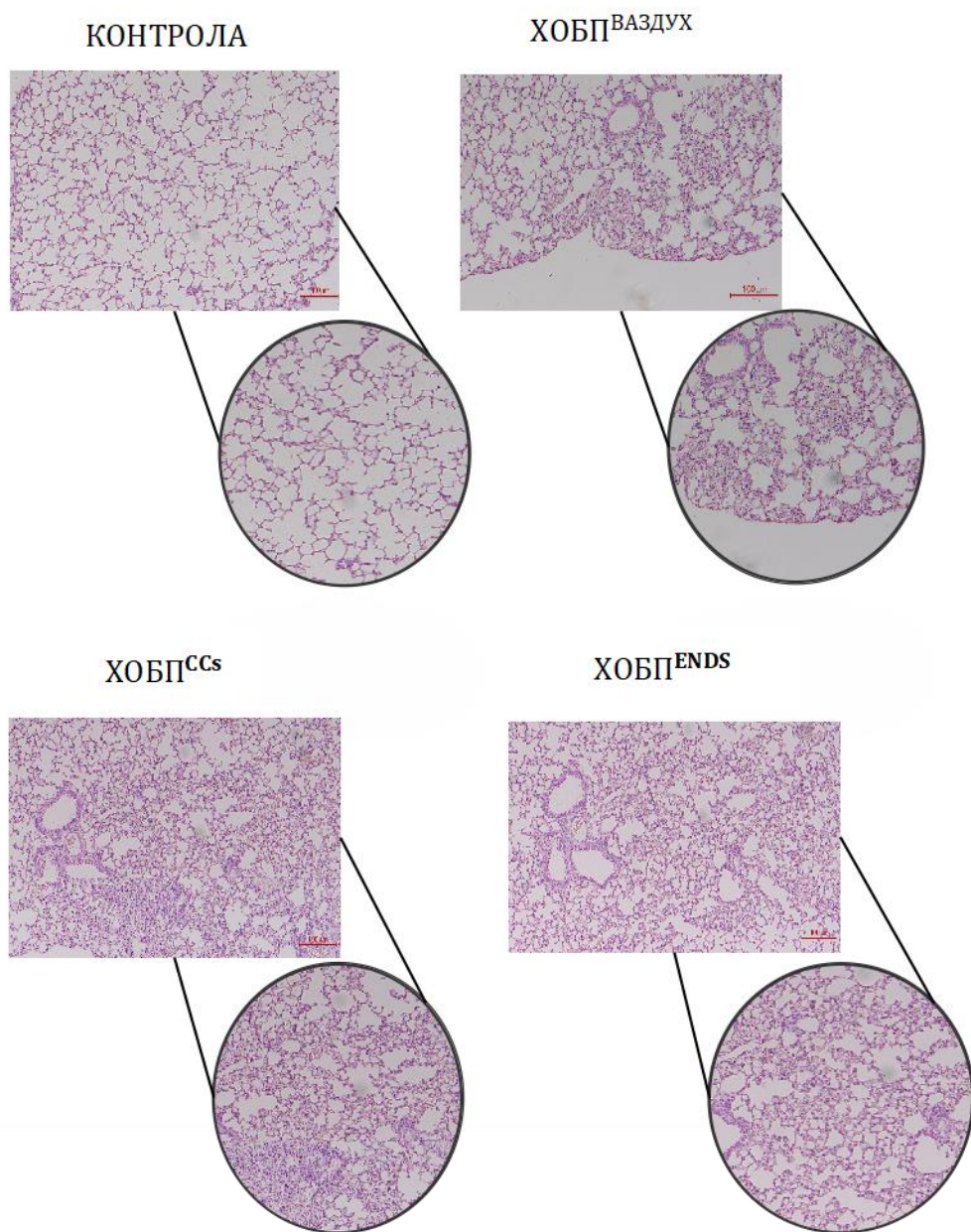


Фигура 20. Повећана инфилтрација плућа CD4⁺ и CD8⁺Т лимфоцитима које продукују TNF- α , IFN- γ и IL-17, и NK и NKT ћелија које које секретују TNF- α и IFN- γ детектована је у групама CCs и ENDS у односу на контролну групу. Значајно мања инфилтрација плућа IFN- γ -продукујућих CD4⁺ (А) и CD8⁺Th1 ћелијама (Б), IL-17-продукујућих CD4⁺ (В) и CD8⁺Th17 ћелијама (Г) и TNF- γ -продукујућих- CD4⁺ и CD8⁺Т лимфоцита (Д-Ђ), TNF- γ -продукујућих-CD49b + NK и CD3+CD49b NKT ћелијама (Е-Ж) узрокована је ENDS-ом у поређењу са CCs-узрокованом инфилтрацијом плућа имунским ћелијама. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n = 6$ мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

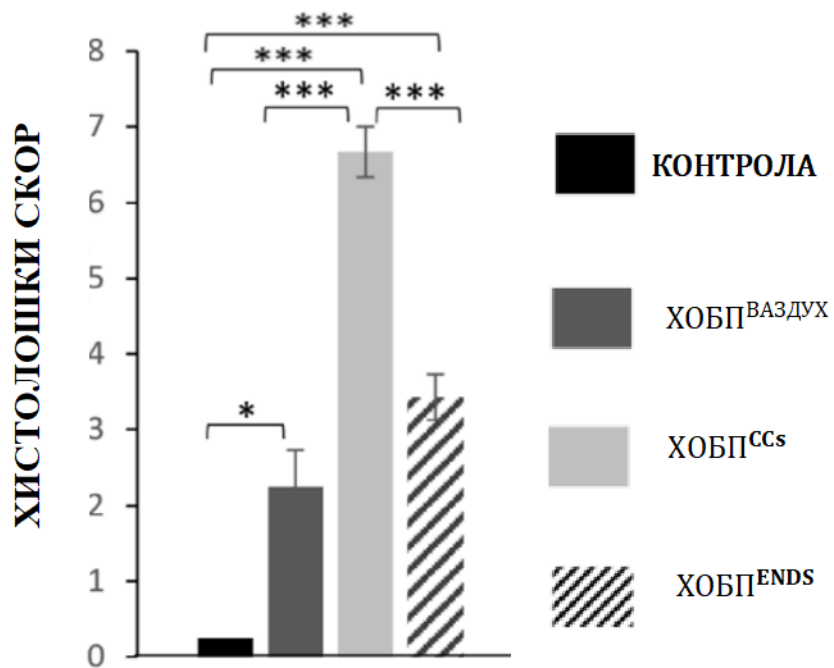
4.3.4. Код експерименталних мишева, ENDS је узроковао блажу прогресију оштећења плућа у успостављеном ХОБП-у у односу на ССs

Ткива плућа мишева из контролне групе која је била изложена ваздуху 8 недеља (КОНТРОЛА) су била интактна са малим бројем присутних имунских ћелија (Слика 13). Излагање мишева дуванском диму ССs у периоду од 4 недеља узроковао је развој ХОБП-а, чије су последице детектоване и након 4 недеља излагања ХОБП мишева чистом ваздуху (ХОБП^{ваздух}): деструкција алвеоларног зида, повећана дебљина алвеоларних септи, дилатација капилара, присуство еритроцита (Слика 13). Ове патолошке промене у паренхиму плућа су биле интензивније код ХОБП мишева изложених дуванском диму ССs 4 недеља након развоја болести где су детектоване масовне хиперплазије пехарастих ћелија, губитак алвеоларних зидова и повећани региони инфилтрисаних имунских ћелија и еритроцитима-богатих капилара (Слика 13). Изложеност ENDS-у након развоја ХОБП-а није довело до опсежног оштећења алвеоларних и капиларних структура (Слика 13). Слабији интензитет инфламације и оштећења плућа потврђени су нижим вредностима хистолошког скорa код ХОБП мишева третираних ENDS-ом (ХОБП^{ENDS}) у поређењу са ССs-третираним ХОБП мишевима (ХОБП^{CCs}) (Графикон 3). Компарацијом резултата у мушком и женском полу нису уочене разлике у степену прогресије ХОБП-а узроковане ССs или ENDS-ом. У поређењу са ефектима ССs, ENDS је узроковао нижи степен прогресије болести и код мушких и код женских мишева.

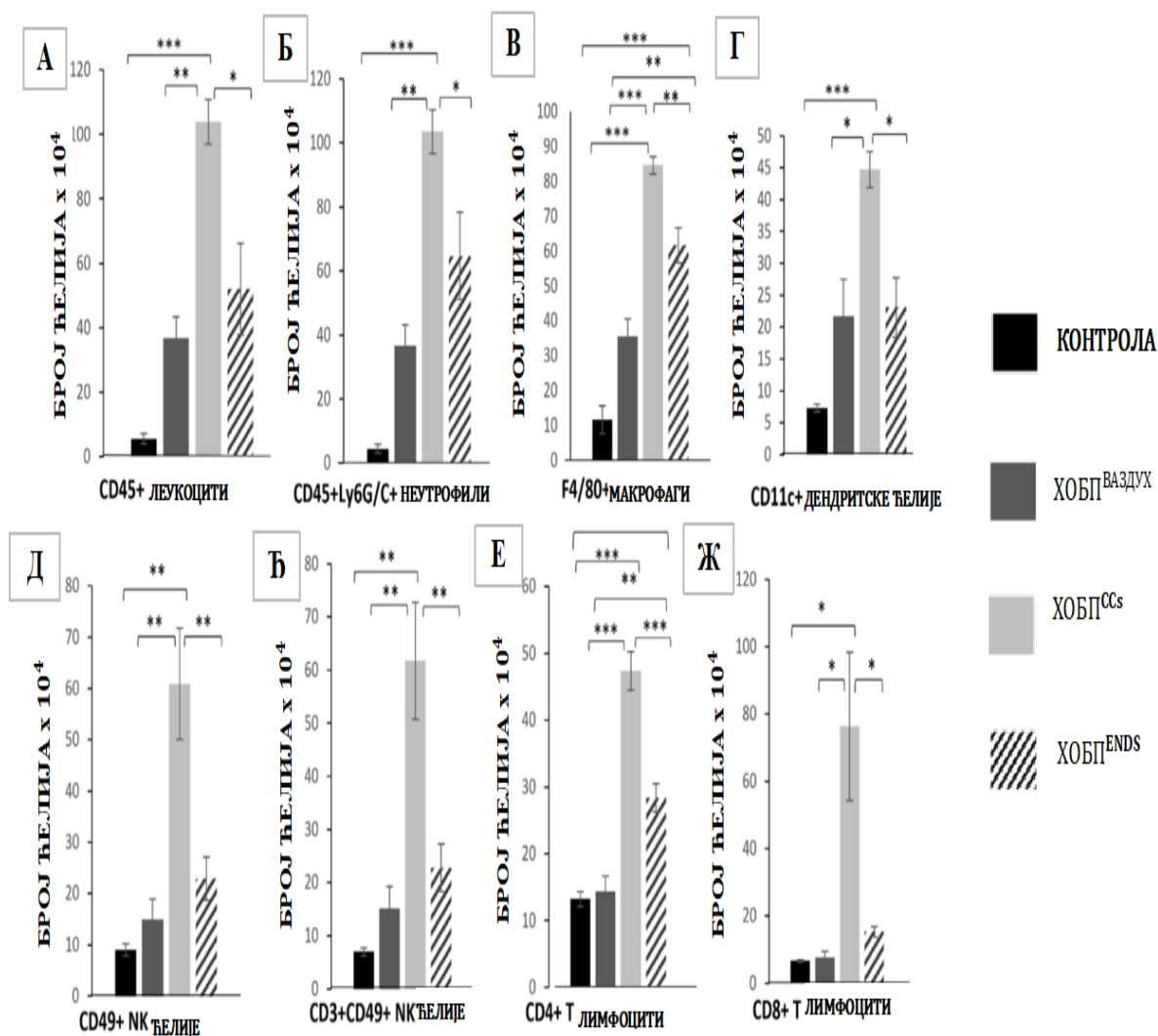
Значајно мањи укупан број CD45⁺ леукоцита (Фигура 21А, $p < 0,05$), CD45⁺Ly6G/C⁺ неутрофила (Фигура 21Б, $p < 0,05$), F4/80⁺ макрофага (Фигура 21В, $p < 0,005$), CD11c⁺ DC ћелија (Фигура 21Г, $p < 0,05$), CD49b⁺NK и CD3⁺CD49b⁺NKT ћелија (Фигура 21Д-Ђ, $p < 0,005$), CD4⁺ (Фигура 21Е, $p < 0,001$) и CD8⁺T лимфоцита (Фигура 21Ж, $p < 0,05$) детектован је у плућима ХОБП^{ENDS} у односу на ХОБП^{CCs}. Овај резултат, заједно са резултатима хистолошке анализе, потврђује да је у поређењу са ССs, ENDS узроковао мањи степен инфилтрације плућа циркулишућим леукоцитима и последично мањи степен инфламације и оштећења.



Слика 12. Мањи степен инфламације и оштећења плућног паренхима уочени су код ХОБП^{ENDS} у односу на ХОБП^{CCs} мишеве. А) Репрезентативне слике узорка плућна обојених Н&Е показују најозбиљније патолошке промене у плућима ХОБП^{CCs} мишева (Ав) у поређењу са КОНТРОЛА (Аа), ХОБП^{ВАЗДУХ} (Аб) и ХОБП^{ENDS} (Аг) [увећања (100×)].



Графикон 3. Значајно веће вредности хистолошког скорa уочене су код ХОБП^{CCs} мишева у односу на ХОБП^{ВАЗДУХ} и ХОБП^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=6 мишева по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

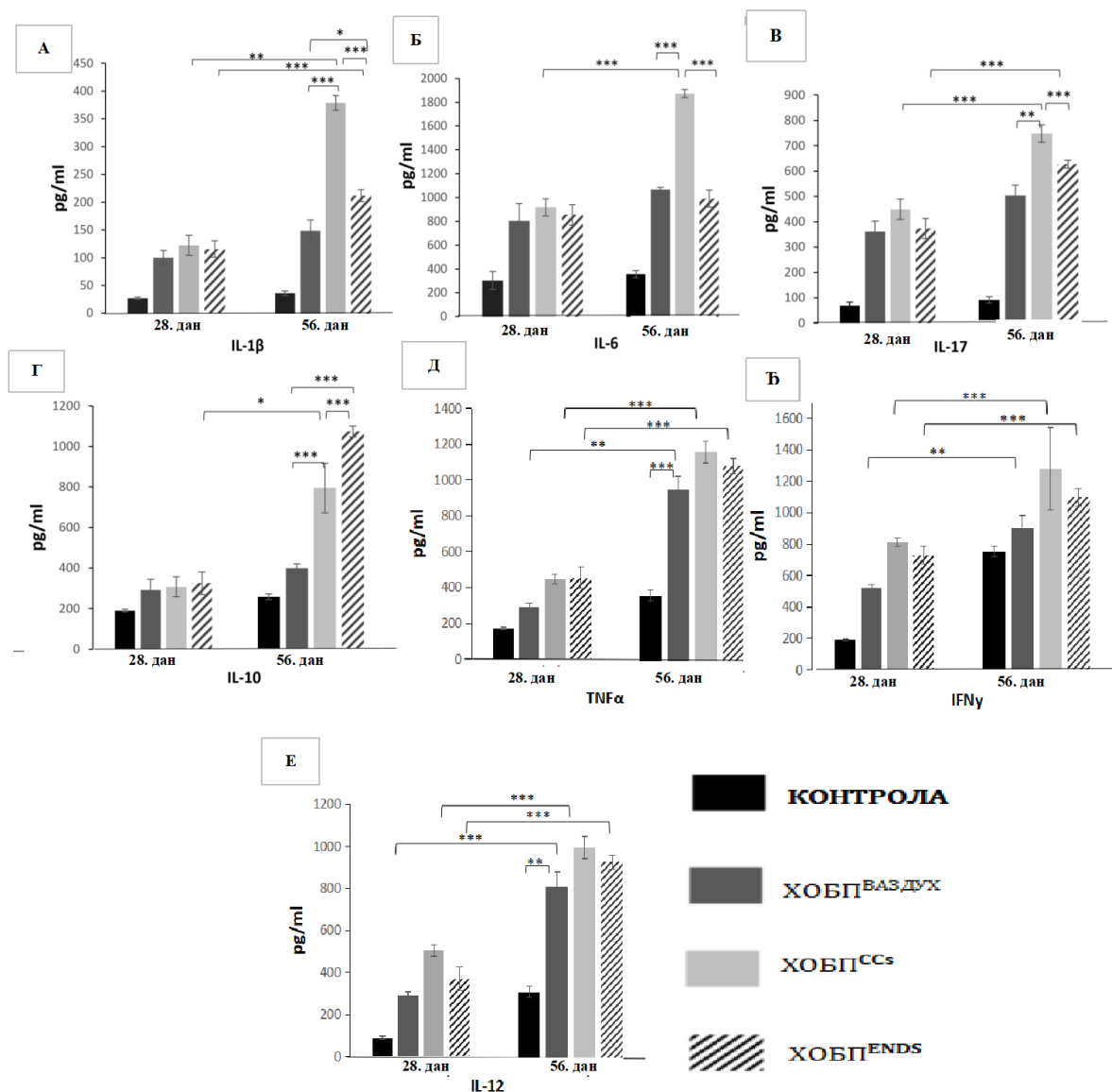


Фигура 21. Анализа проточне цитометрије инфилтрираних имунских ћелија детектовала је највећи број CD45+ леукоцита (А), CD45+ Ly6G/C+ неутрофила (Б), F4/80+ макрофага (В), CD11c+ DC (Г), CD49+NK (Д), CD3+CD49+NKT (Ђ), CD4+ Т лимфоцита (Е), CD8+ Т лимфоцита (Ж) у плућима ХОБП^{CCs} мишева у односу на ХОБП^{ВАЗДУХ} и ХОБП^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=6 мишева по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

У циљу компарације ефеката CCs и ENDS-а на системски инфламацијски одговор, испитиване су концентрације цитокина у крви и уочено је да су 28. дана, услед континуиране инфламације, цитокини IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10, TNF α , IFN γ и IL-12 били присутни у већим концентрацијама код ХОБП мишева у односу на здраве мишеве из групе КОНТРОЛА (Фигура 22).

Након успостављања ХОБП-а и накнадног излагања болесних животиња третманима CCs и ENDS у трајању од 4 недеље, уочени су значајно повећани серумски нивои проинфламацијских и имуносупресивних цитокина. Серумске концентрације цитокина IL-1 β , IL-6 и IL-17 измерене 56. експерименталног дана биле су значајно више у ХОБП^{CCs} него у ХОБП^{ENDS} групи (Фигура 22А-Е, $p < 0,001$).

С обзиром на то да ови цитокини имају кључну улогу у прогресији патолошких промена дисајних путева, слабији капацитет ENDS-а да узрокују повећање њихове концентрације последично ће узроковати и слабији системски инфламацијски одговор у односу на CCs. Са друге стране, у серуму ХОБП^{ENDS} мишева детектовано је повећање концентрације имуносупресивног цитокина IL-10 у односу на ХОБП^{CCs} (Фигура 22Г, $p < 0,001$). Дакле, код ХОБП мишева, ENDS ефикасније промовише имуносупресију док слабијим капацитетом индукује инфламацију у имунским ћелијама инфилтрираним у оштећеним плућима експерименталних животиња.

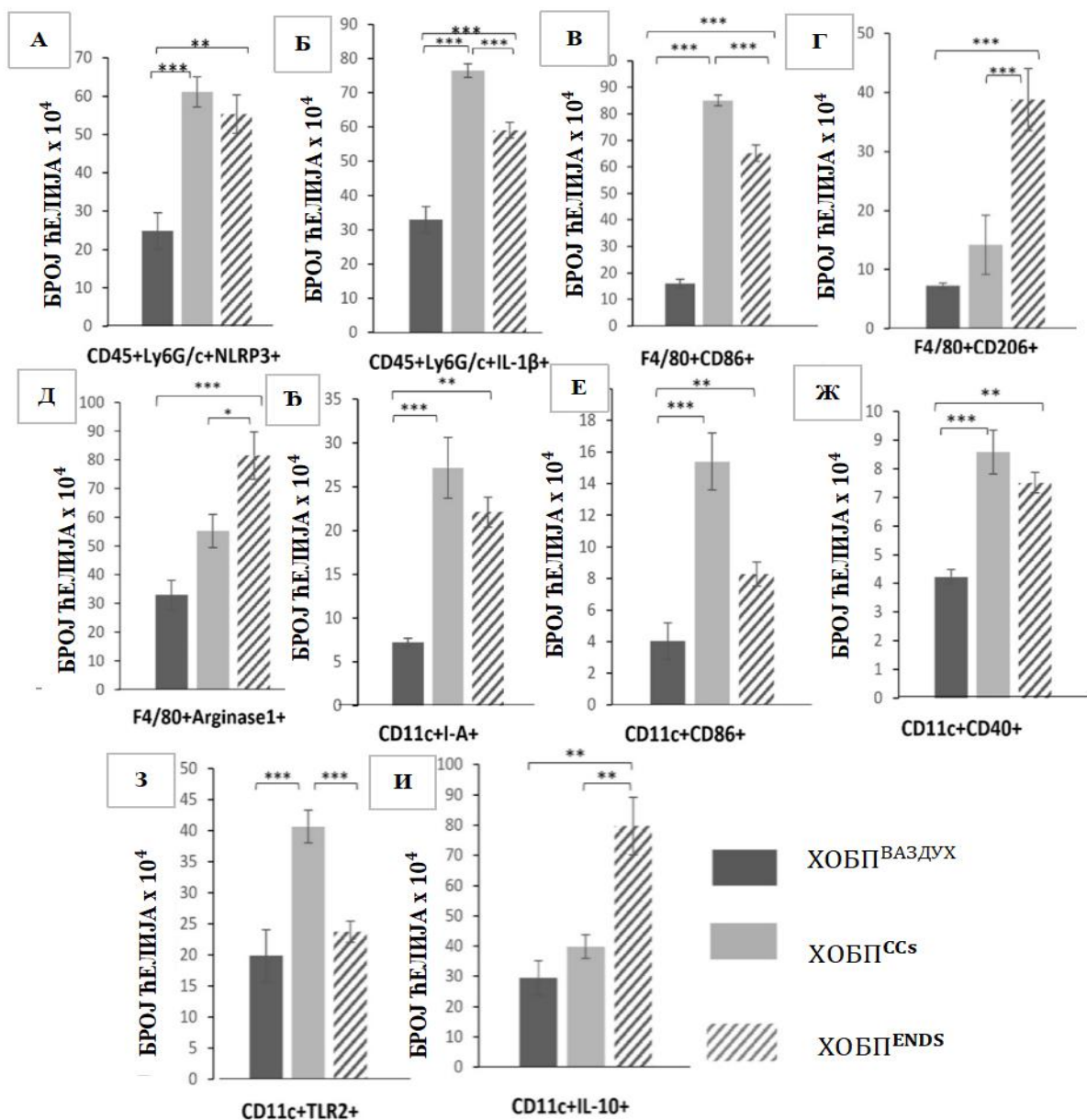


Фигура 22. Укупне измерене концентрације цитокина у серумским узорцима здравих и ХОБП мишева изложених ваздуху, CCs и ENDS-у. Концентрације IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10, TNF α , IFN γ и IL-12 су 28. дана биле веће у узорцима експерименталних мишева у поређењу са КОНТРОЛА групом. 56. дана су концентрације инфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6 и IL-17 биле значајно веће у узорцима ХОБП^{CCs} у односу на ХОБП^{ВАЗДУХ} и ХОБП^{ENDS} (А-В) док је концентрација имunosупресивног IL-10 била значајно повећана у серуму ХОБП^{ENDS} мишева него у осталим групама (Г). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

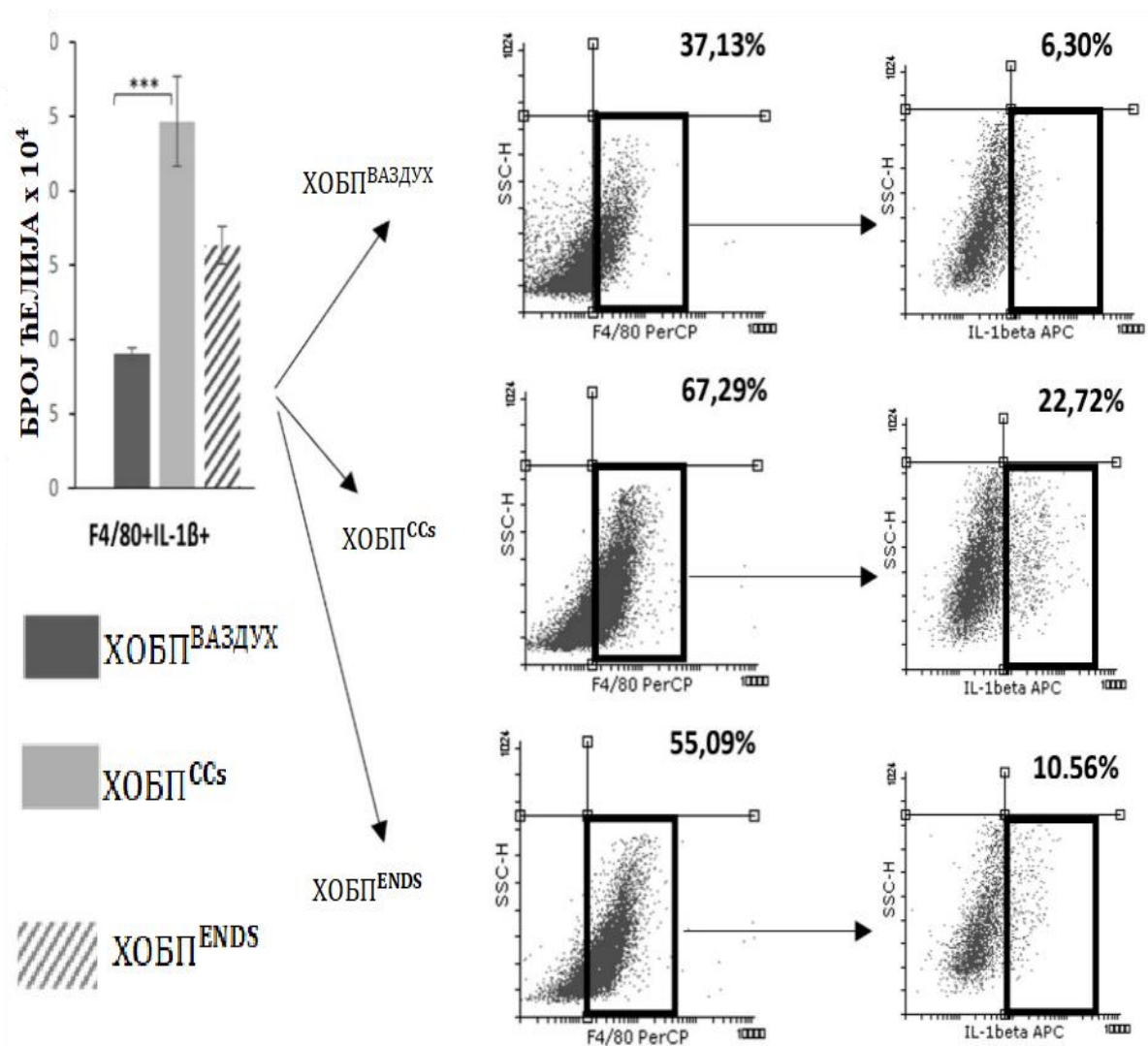
4.3.5. У плућима експерименталних животиња, ENDS је, у односу на CCs, слабијим интензитетом индуковао синтезу инфламацијских цитокина у неутрофилима, макрофагима и DCs

CCs је узроковао интензивнију активацију NLRP3 инфламазома у неутрофилима и макрофагима што је резултира повећаном продукцијом профинфламацијског цитокина IL-1 β . Значајно већи укупан број CD45+Ly6G/C+ неутрофила који експримирају NLRP3 и секретују IL-1 β (Фигура 23А-Б, $p < 0,001$) и F4/80 макрофага који продукују IL-1 β (Фигура 24, $p < 0,001$) детектован је у плућима ХОБП^{CCs} мишева у односу на ХОБП^{ваздух}. Уочено је и повећање броја CD86-експресујућих F4/80+ макрофага (Фигура 23В, $p < 0,001$), што сугерише да хронично излагање CCs доводи до побољшања антиген-презентујућих способности алвеоларних макрофага код ХОБП мишева. Супротно томе, ENDS је показао редуктивно дејство на експресију NLRP3 и продукцију IL-1 β у неутрофилима (Фигура 23А-Б, $p < 0,001$) и промовисао алтернативну активацију алвеоларних макрофага (Фигура 23Г-Д).

Статистички значајно мање вредности укупног броја макрофага који секретују IL-1 β и веће вредности алтернативно активираних макрофага који експримирају CD206 и Аргиназу-1 уочене су у плућима ХОБП^{ENDS} у поређењу са ХОБП^{CCs} (Фигура 23Г-Д, $p < 0,001$). У складу са тим запажањем, DC које су инфилтрирали оштећена плућа ХОБП мишева третираних ENDS-ом окарактерисане су нижим степеном експресије I-A, CD86, CD40 и TLR-2 него DC ХОБП^{CCs} (Фигура 23Ђ–З). Додатно, у плућима ХОБП^{ENDS} мишева детектован је значајно већи број имуносупресивних и толерогених DC које секретују IL-10 у односу на ХОБП^{CCs} и ХОБП^{ваздух} (Фигура 23И, $p < 0,005$), сугеришући да ENDS промовише имуносупресивни фенотип у плућним DC.



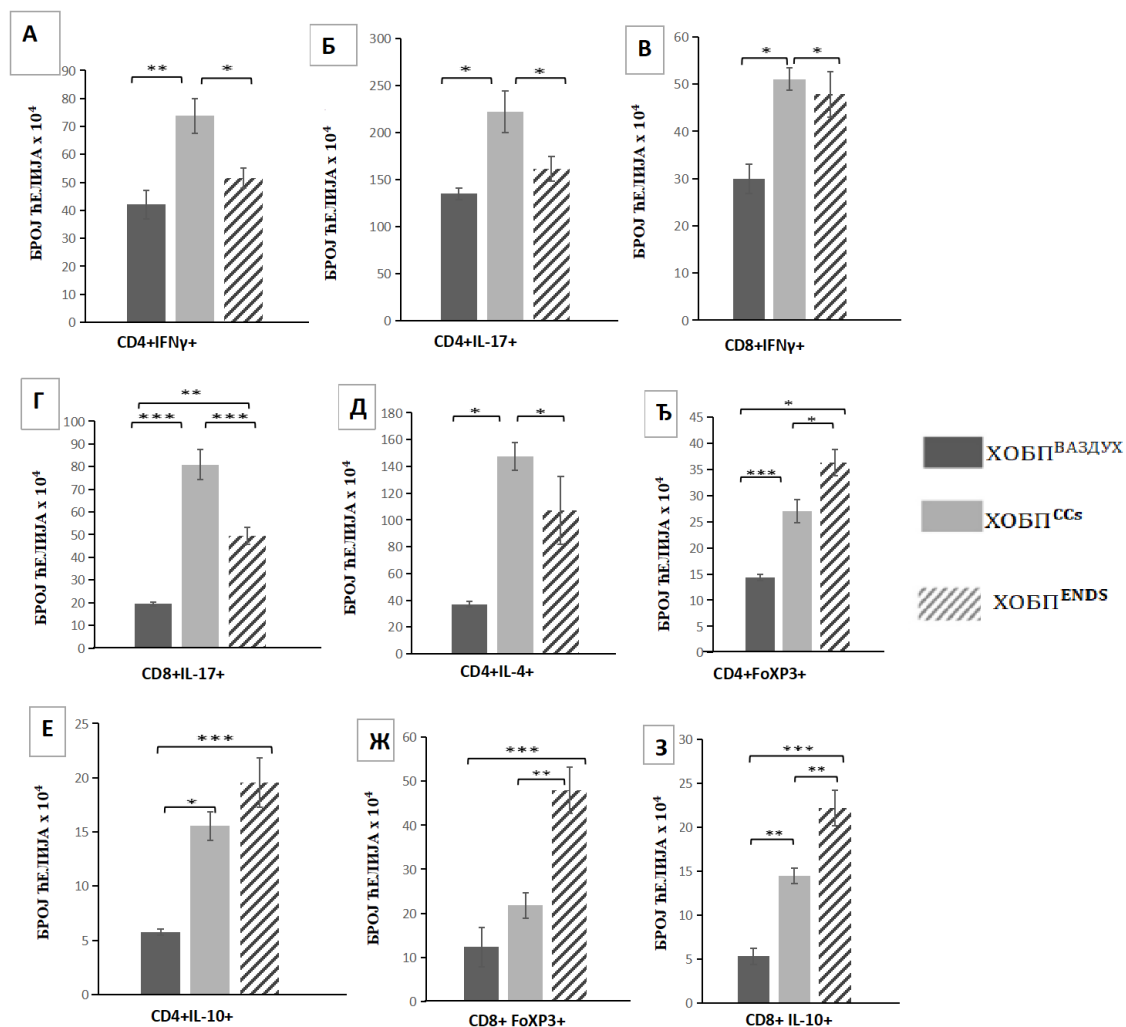
Фигура 23. Продукција инфламацијских цитокина у неутрофилима, макрофагима и DC које су инфилтриране у оштећеним плућима ХОБП мишева била је значајно смањена код ХОБП^{ENDS} у односу на ХОБП^{CCs}. Повећан број CD45+Ly6G/C+ неутрофила који експримирају NLRP3+ (А) уочен је у плућима ХОБП^{CCs} у поређењу са ХОБП^{ВАЗДУХ} и ХОБП^{ENDS}. Већи број F4/80+ макрофага који експримирају CD86(Д), CD206(Ђ) и Аргиназу1(Е) је детектован у плућима ХОБП^{CCs} мишева у односу на друге групе. Смањен број C11c+ DCs које експримирају I-A(Ж), CD86(З), CD40(И), TLR-2(Ј) и повећан број оних које производе IL-10(К) детектован је у плућима ХОБП^{ENDS} мишева у поређењу са резултатима из група ХОБП^{ВАЗДУХ} и ХОБП^{CCs}. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



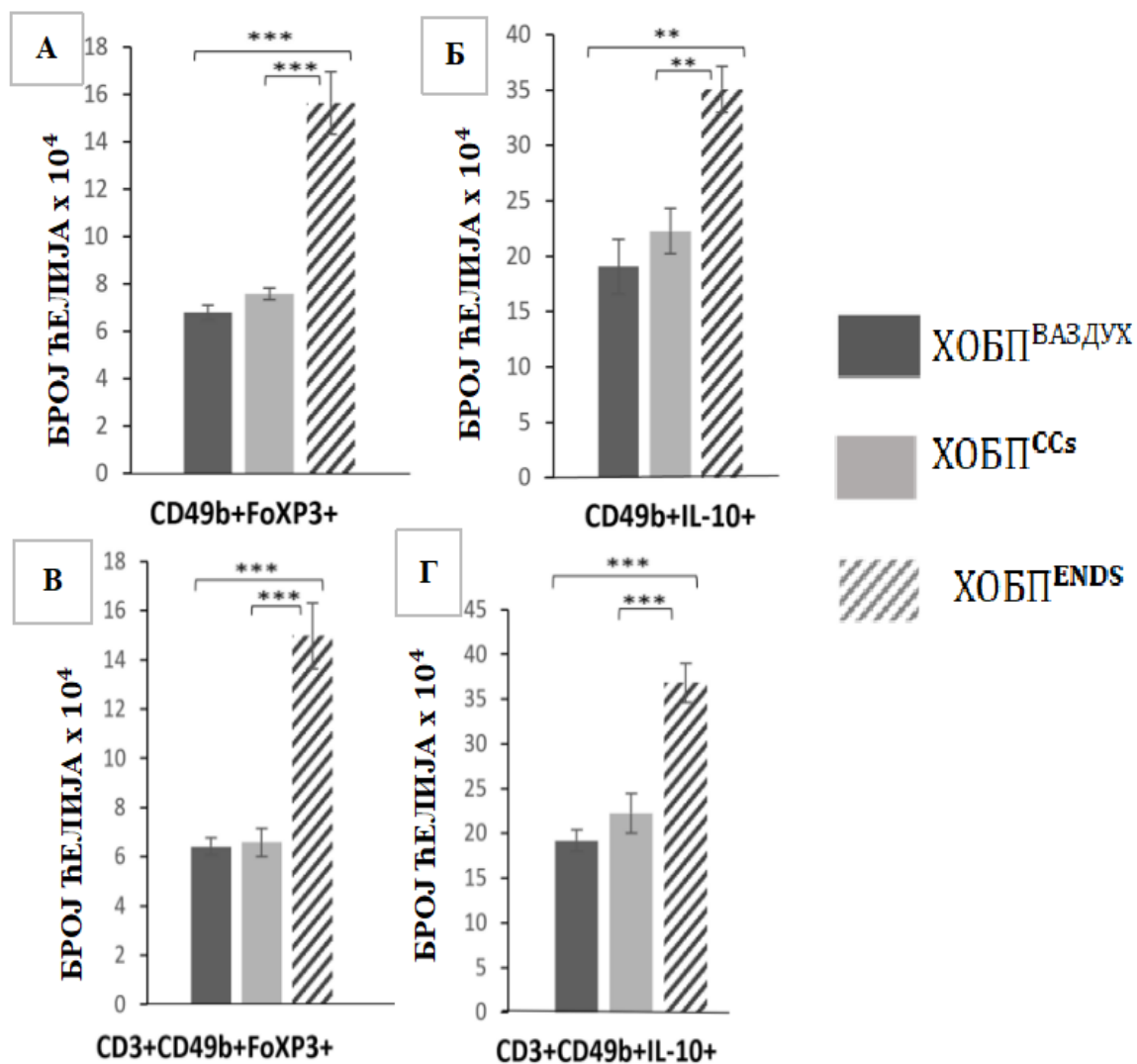
Фигура 24. Репрезентативни тачкасти графикони приказују разлике у броју F4/80+ макрофага који секретују IL-1β (B) у зависности од третмана: HOBP^{BAZDUK}, HOBP^{CCs} и HOBP^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=6 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

4.3.6. Изложеност ХОБП мишева ENDS-у узроковала је експанзију имуносупресивних, регулаторних Т, NK и NKT ћелија у оштећеним плућима за разлику од CCs који је промовисао експанзију проинфламацијских Th1, Th2 и Th17 лимфоцита

DC презентују стране антигене наивним Т ћелијама и, кроз производњу цитокина попут IL-12, IL-23 или IL-10, промовише стварање инфламацијских Th1 и Th17 ћелија или имуносупресивних, Tregs. На овај начин DC модулирају имунски одговор предвођен Т ћелијама у оштећеним плућима (143, 146, 148). CCs побољшавају антиген-презентујућа својства алвеоларних DC преко повећане експресије I-A, CD86 и CD40 (Фигура 24Б–Ж), што последично доводи до повећање активације наивних Т лимфоцита. Сходно томе, хронична изложеност CCs довела је до повећања броја CD3+CD4+Th1 ћелија које продукују IFN- γ и CD3+CD4+Th17 ћелија које производе IL-17 у плућима ХОБП мишева (Фигура 25А–Б, $p<0,05$). Додатно, CCs су узроковале експанзију алвеолотоксичних CD3+CD8+CTL ћелија које секретују IFN- γ и IL-17 у плућима ХОБП мишева (Фигура 25В–Г, $p<0,001$). Поред ефеката на нивоу Th1 и Th17 ћелија, CCs су такође индуковале повећање броја IL-4-секретујућих CD3+CD4+Th2 ћелија које додатно доприносе погоршању упале плућа (Фигура 25Д, $p<0,05$). Са друге стране, ENDS је испољио супротне ефекте: промовисао је стварање имуносупресивног фенотипа у Т ћелијама које су регрутоване у плућа захваћена инфламацијом и на тај начин ослабио прогресију плућне дисфункције. Значајно мањи укупан број CD3+CD4+ и CD8+Т лимфоцита који секретују IFN- γ , IL-4 и IL-17 (Фигура 25А–Г) и знатно већи укупан број CD3+CD4+ и CD8+Т лимфоцита (Фигура 25Б–З), CD49b+CD3-NK и CD49b+CD3+NKT ћелија које експримирају FoxP3 и продукују IL-10 (Фигура 26А–Г) детектован је у плућима ХОБП^{ENDS} у поређењу са ХОБП^{ваздух} и ХОБП^{CCs}.



Фигура 25. Хронично излагање мишева дуванском диму CCs индуковало је експанзију инфламацијских Th1, Th2 и Th17 лимфоцита, док је излагање ENDS-у довело до масовне продукције имуносупресивних, регулаторних T, NK и NKT ћелија у плућима ХОБП мишева. Значајно већи укупан број IFN- γ -продукујућих CD3+CD4+Th1(A), IL-17-продукујућих CD3+CD4+Th17(Б), IFN- γ - и IL-17-продукујућих CD3+CD8+CTL (В-Г), IL-4-продукујућих CD3+CD4+Th2(Д) ћелија уочен је код ХОБП^{CCs} у односу на ХОБП^{ENDS} и ХОБП^{ваздух}. Са друге стране, ENDS је узроковао повећање броја FoxP3-експримирајућих and IL-10-продукујућих CD4+(Ђ-Е), CD8+(Ж-З) ћелија у плућима ХОБП мишева у односу на CCs и чист ваздух. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=6 мишева по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

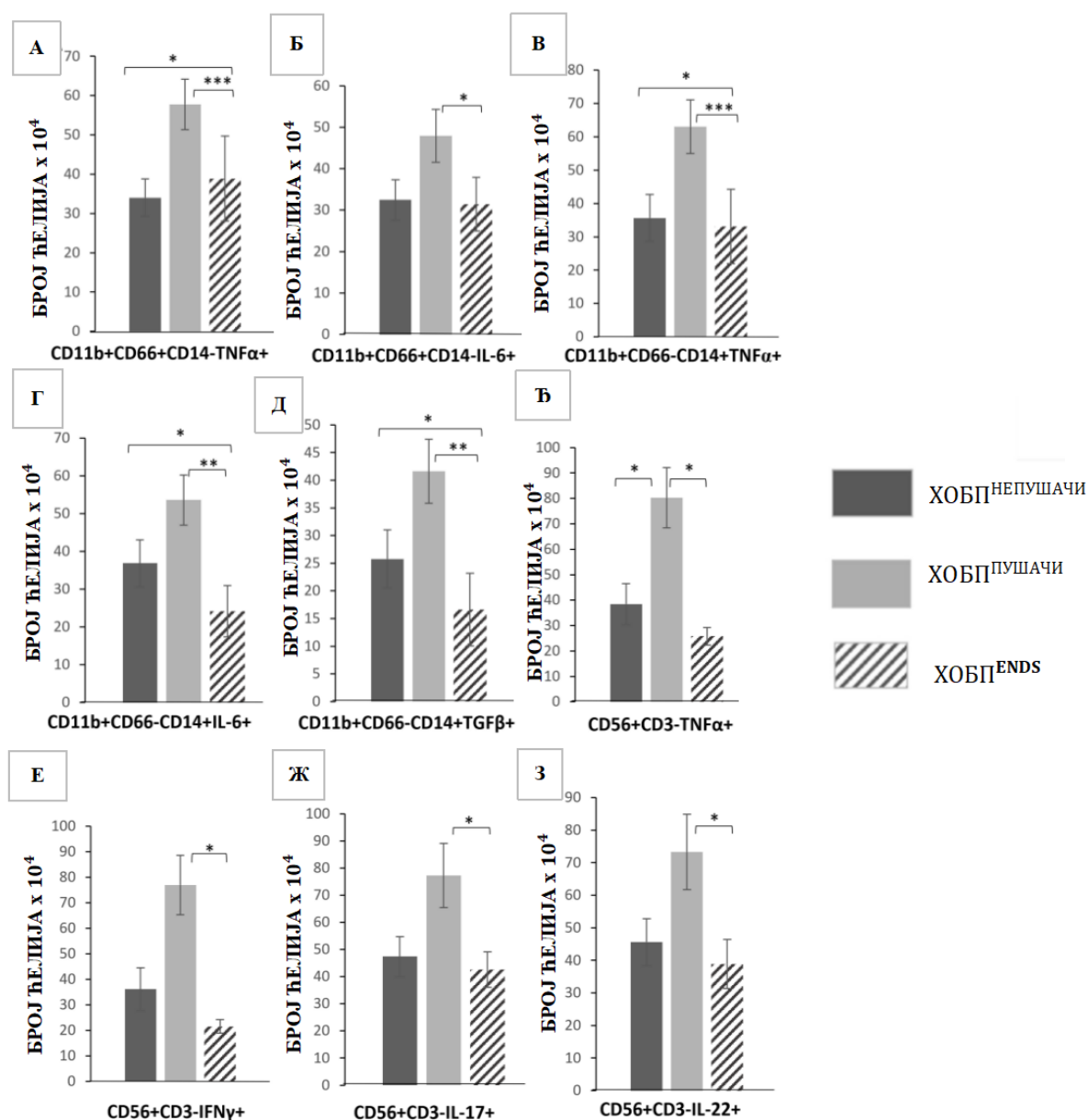


Фигура 26. ENDS је узроковао повећање броја FoxP3-експримирајућих and IL-10-продукујућих CD49b+CD3-NK (А-Б) и CD49b+CD3+ NKT (В-Г) ћелија у плућима ХОБП мишева у односу на CCs и чист ваздух. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=6 мишева по групи; *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.

4.3.7. Коришћење ENDS-а узроковало је значајно мањи пораст броја проинфламацијских имунских ћелија у крви ХОБП пацијената у односу на коришћење ССs

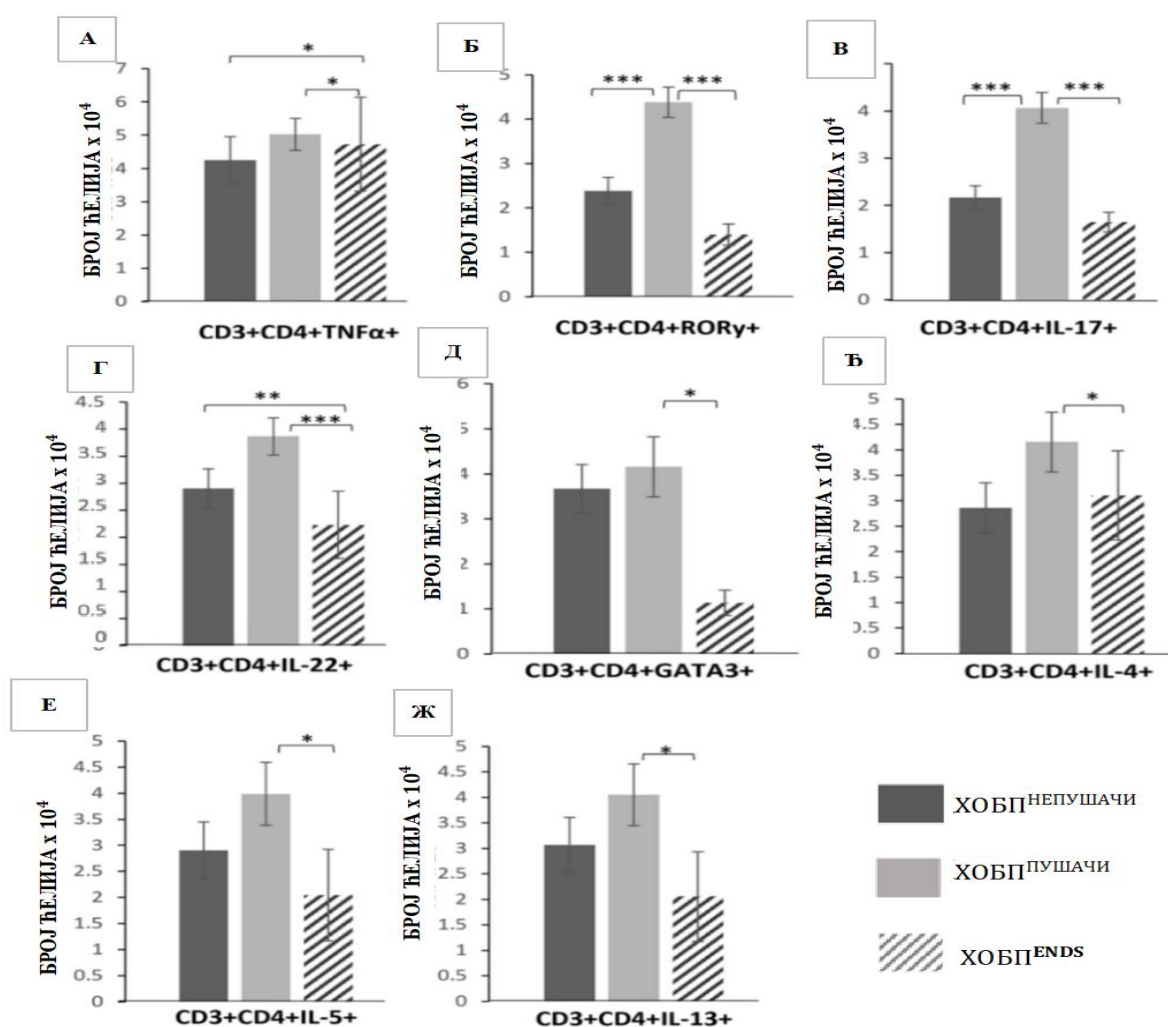
У сличном маневру као код експерименталних ХОБП мишева, хронична употреба ССs узроковала је значајно повећање броја циркулишућих проинфламацијских имунских ћелија у крви пацијената оболелих од ХОБП-а (Фигуре 27-30). У крви ХОБП пацијената који користе ССs детектован је значајно већи укупан број TNF- α - и IL-6-секретујућих CD11b+CD66+CD14- неутрофила (Фигура 27А-Б) и CD11b+CD66-CD14+ моноцита (Фигура 27В-Г) него у крви ХОБП непушача. Међутим, супротно ефектима ССs, континуирана употреба ENDS-а није узроковала повећање броја циркулишућих проинфламацијских имунских ћелија у крви ХОБП пацијената. Додатно, имунске ћелије ХОБП пацијената који су корисници ENDS-а показале су смањен капацитет за секрецију инфламацијских цитокина у односу на имунске ћелије ХОБП пацијената који су непушачи и ССs корисници. Значајно мањи број TNF- α - и IL-6-продукујућих

CD11b+CD66+CD14- неутрофила (Фигура 27А-Б, $p<0,001$), TNF- α -, IL-6- и TGF- β -продукујућих CD11b+CD66-CD14+ моноцита (Фигура 27В-Д, $p<0,005$), TNF- α -, IFN- γ -, IL-17- и IL-22-продукујућих CD56+CD3-NK (Фигура 27Б-З, $p<0,05$) изолован је из крви ENDS корисника оболелих од ХОБП-а него из крви ХОБП пушача.

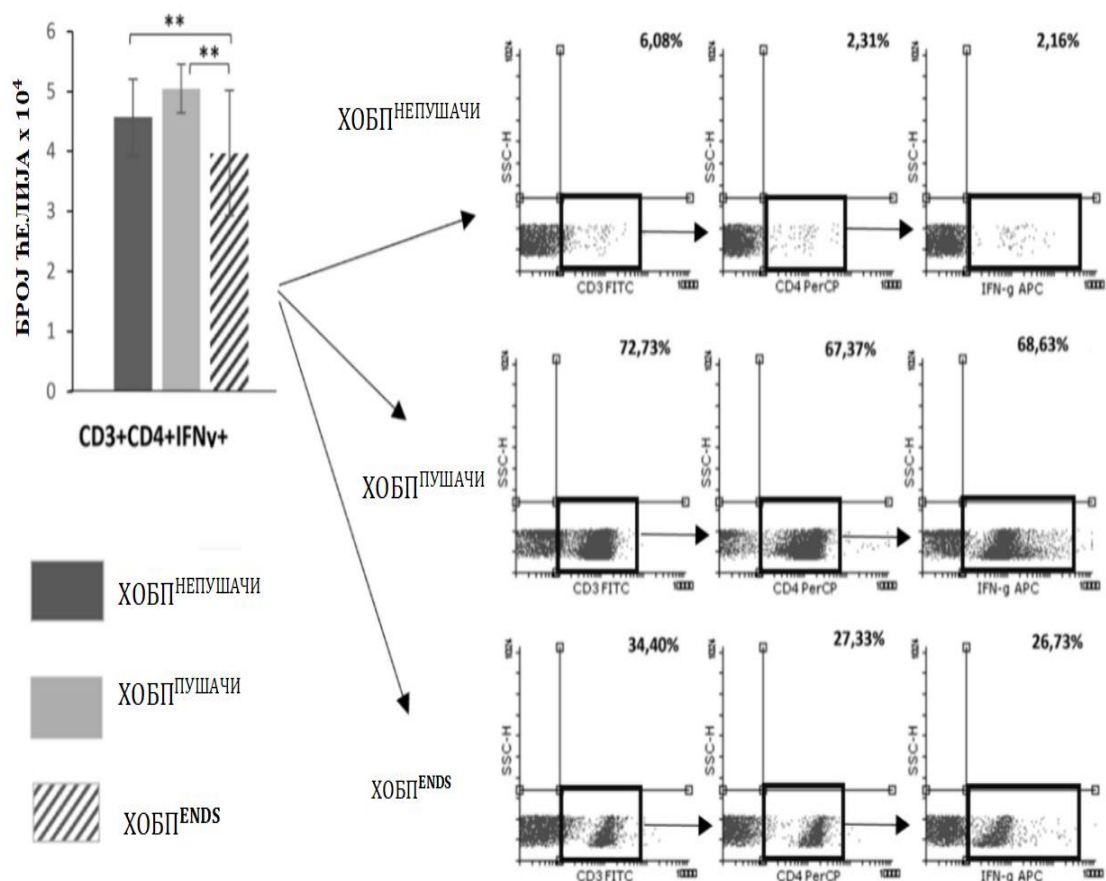


Фигура 27. У крви ХОБП пацијената који су корисници ENDS-а примећен је значајно мањи укупан број инфламацијских неутрофила, моноцита и NK ћелија у поређењу са ХОБП пацијентима пушачима. CCs је интензивније промовисао експанзију проинфламацијских TNF- α - и IL-6-секретујућих CD11b+CD66+CD14-неутрофила (А-Б), TNF- α , IL-6 и TGF- β -секретујућих CD11b+CD66-CD14+ моноцита (В-Д) и TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-22-продукујућих CD56+CD3-NK ћелија (Ђ-З) у крви пацијената са ХОБП у односу на ENDS. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=73 ХОБП пацијената (ХОБП непушачи=26, ХОБП корисници CCs=37, ХОБП корисници ENDS-a=10); *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

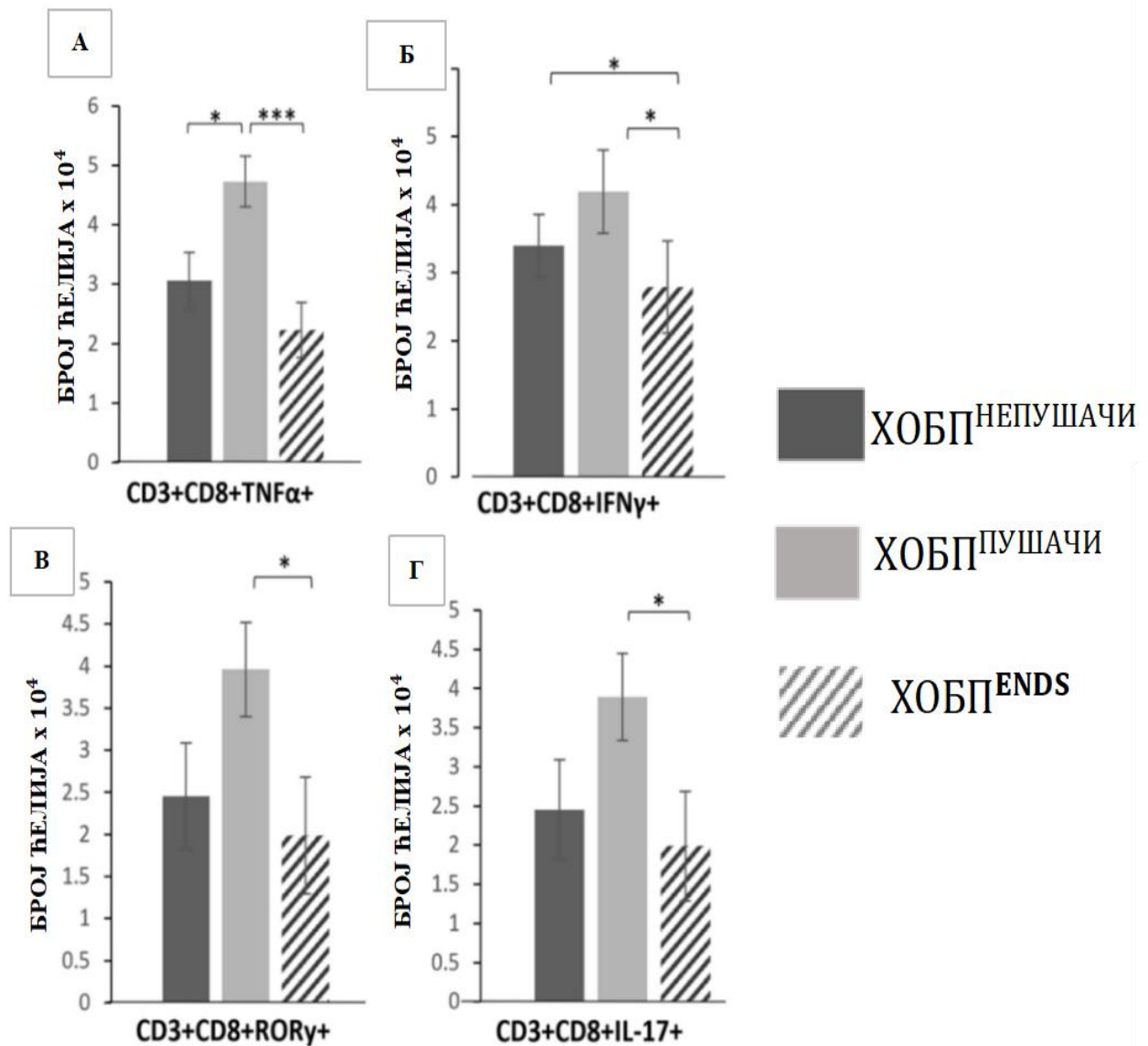
Коришћење CCs у ХОБП-у је узроковало значајно повећање броја CD3+CD4+Th1 ћелија које продукују TNF- α и IFN- γ (Фигура 28А, 29) и CD3+CD4+ Th17 ћелија које експримирају ROR γ и секретију IL-17 (Фигура 28Б-В, $p < 0,001$) у поређењу са одсуством пушачке навике. Са друге стране, употреба ENDS-а код пацијената оболелих од ХОБП-а узроковала је мањи пораст броја CD3+CD4+Th1 ћелија које секретију TNF- α и IFN- γ , CD3+CD4+ Th17 ћелија које експримирају ROR γ Т и секретију IL-17 и IL-22 (Фигура 28Б-Г, $p < 0,05$) и Th2 ћелија које експримирају Gata3 и секретију IL-4, IL-5, и IL-13 (Фигура 28Д-Ж, $p < 0,05$) у односу на CCs. Додатно, ENDS је промовисао мањи раст броја TNF- α и IFN- γ -продукујућих и ROR γ Т-експресујућих, IL-17-секретијућих CD3+CD8+CTL (Фигура 30А-Г, $p < 0,05$) што потврђује хипотезу да поседује слабији капацитет да промовише проинфламацијски фенотип у циркулишућим Т ћелијама у односу на CCs.



Фигура 28. У крви ХОБП пацијената корисника ENDS-а детектован је знатно мањи број инфламацијских Th1, Th2 и Th17 лимфоцита у односу на ХОБП пушаче. ENDS је узроковао експанзију TNF- α - γ -продукујућих CD4+Th1 (А), ROR γ Т-експримирајућих и IL-17-и IL-22-продукујућих CD4+Th17 ћелије (Б-Д), Gata3+експримирајућих, IL-4, IL-5 и IL-13-продукујућих Th2 ћелија (Ђ-И). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n=73$ ХОБП пацијената (ХОБП непушачи=26, ХОБП корисници CCs=37, ХОБП корисници ENDS-а=10); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Фигура 29. ENDS је узроковао експанзију IFN- γ -продукујућих CD4+Th1 ћелија. Репрезентативни тачкасти дијаграми приказују разлике у популацији CD3+CD4+ Т лимфоцита који секретују IFN- γ између ХОБП пацијената који су непушачи, CCs и ENDS корисници. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=73 ХОБП пацијената (ХОБП непушачи=26, ХОБП корисници CCs=37, ХОБП корисници ENDS-a=10); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.



Фигура 30. ENDS је узроковао експанзију IFN-γ-продукујућих CD4+Th1 ћелија. Репрезентативни тачкасти дијаграми приказују разлике у популацији CD3+CD4+ Т лимфоцита који секретују IFN-γ између ХОБП пацијената који су непушачи, ССs и ENDS корисници. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=73 ХОБП пацијената (ХОБП непушачи=26, ХОБП корисници ССs=37, ХОБП корисници ENDS-a=10); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.

4.4. Утицај CCs и ENDS-а на прогресију шећерне болести

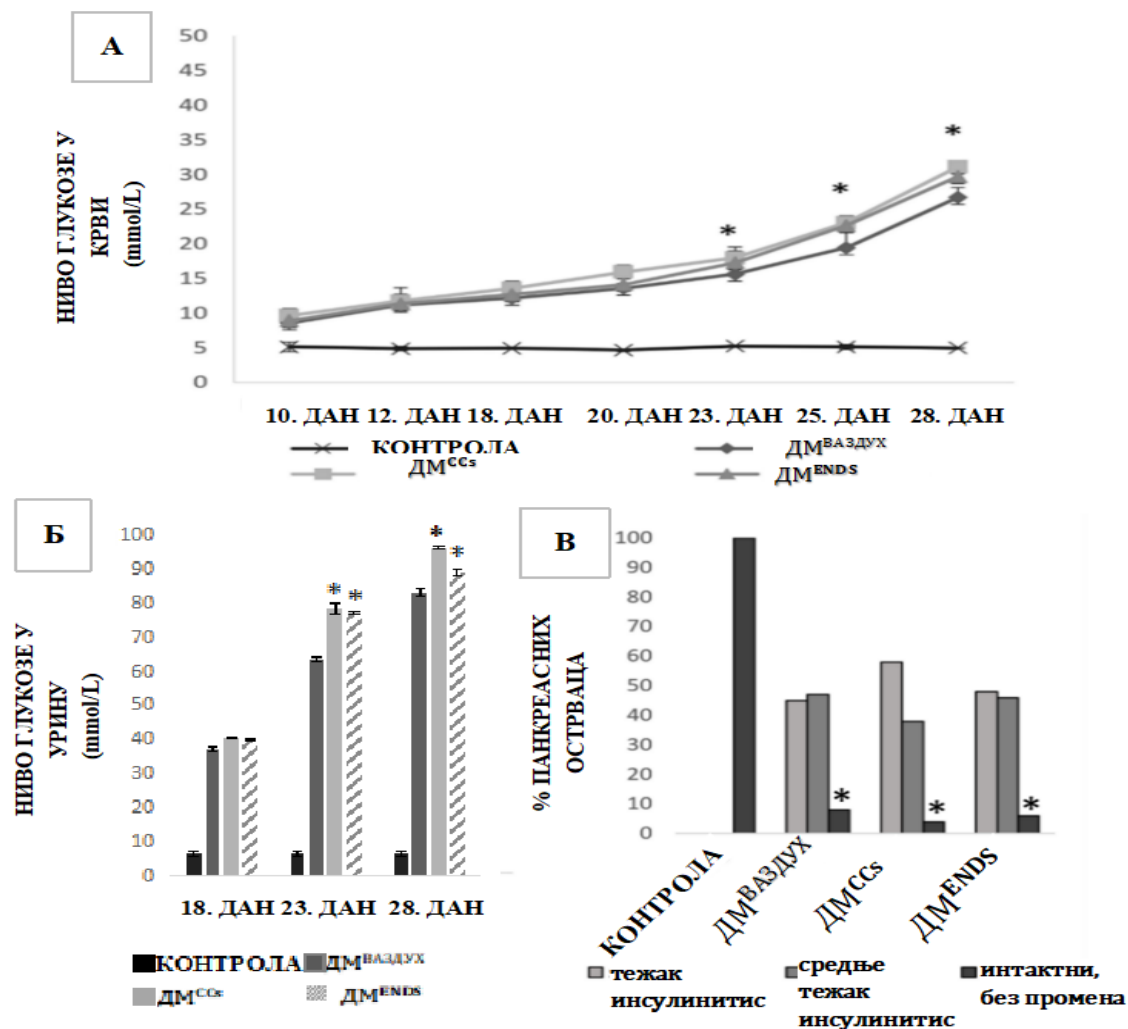
Шећерна болест типа 2 је изазвана помоћу третмана MLD-STZ у интервалу од 5 дана. Након позитивне дијагностике болести, експерименталне животиње су подељене у 3 групе ДМ^{BAЗДУХ}, ДМ^{CCs} и ДМ^{ENDS} на основу третмана којима су били изложени наредне 4 недеље.

Узорци периферне крви ДМ пацијената из групе непушача, пушача и ENDS корисника су коришћени за испитивање утицаја CCs и ENDS-а на прогресију ДМ код људи.

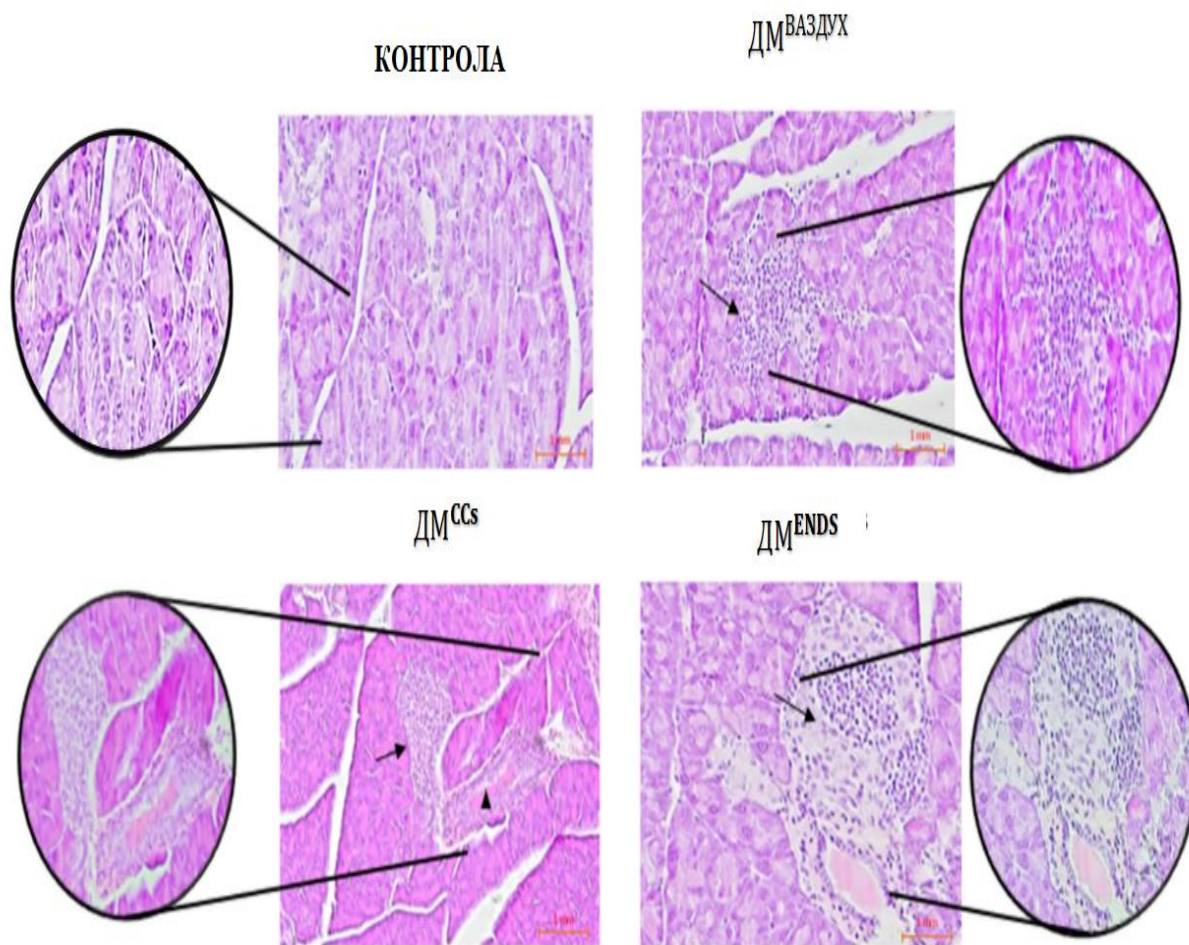
4.4.1. Након индукције дијабетеса код експерименталних мишева, континуирана изложеност аеросолима ENDS-а узроковала је мањи степен оштећења панкреаса и слабију инфламацију у поређењу са дуванским димом

Петодневни третман MLD-STZ узроковао је хипергликемију (нивои глукозе у крви $>10,3$ mmol/L) и гликозурију (нивои глукозе у урину $>7,1$ mmol/L) код мишева из експерименталних група (ДМ^{BAЗДУХ}, ДМ^{CCs} и ДМ^{ENDS}). Мишеви из контролне групе су у интервалу индукције болести третирани PBS-ом и одсуство болести је потврђено нивоом шећера у крви и урину (Фигура 31А–Б). Континуирано излагање CCs довело је до ранијег пораста и прогресије хипергликемије и гликозурије код ДМ мишева (Фигура 31А–Б). Наиме, прогресија хипергликемије уочена је од 12. дана а гликозурије од 18. дана код ДМ^{BAЗДУХ} и ДМ^{ENDS} мишева, док су код ДМ^{CCs} мишева додатно повишене вредности нивоа глукозе у крви уочене 11. дана а у урину 16. дана. Додатно погоршање метаболизма глукозе уочено је од 23. дана у групи ДМ^{CCs} мишева када су вредности гликемије и гликозурије биле статистички значајно више у поређењу са ДМ^{BAЗДУХ} и ДМ^{ENDS} мишевима (Фигура 31А–Б). Сви мишеви из контролне и експерименталних група су преживели до краја експеримента, тако да третмани CCs и ENDS нису узроковали мање преживљавање ДМ мишева у поређењу са чистим ваздухом.

Међутим, хистолошка анализа ткива панкреаса показала је да CCs и ENDS индукују погоршање ДМ-а и да су степен инфламације и оштећење панкреаса били виши код ДМ^{CCs} у односу на ДМ^{ENDS} мишеве (Слика 13). У панкреасним острвцима мишева свих експерименталних група детектована је масивна инфилтрација имунских ћелија, али је најтеже оштећење панкреаса и највећи степен упале уочено код мишева из групе ДМ^{CCs} (Слика 13). Тешки степен инсулитиса је детектован код 58% панкреасних острваца ДМ^{CCs}, код 45% панкреасних острваца ДМ^{BAЗДУХ} и 48% панкреасних острваца ДМ^{ENDS} мишева (Фигура 31В). Блажи степен инсулитиса био је присутнији у панкреасним острвцима ДМ^{BAЗДУХ} (47%) и ДМ^{ENDS} (46%) мишева у односу на ДМ^{CCs} (38%). Заступљеност неоштећених, интактних панкреасних острваца био је највиши у групи ДМ^{BAЗДУХ} (8%) у односу на ДМ^{CCs} (4%) и ДМ^{ENDS} (6%).



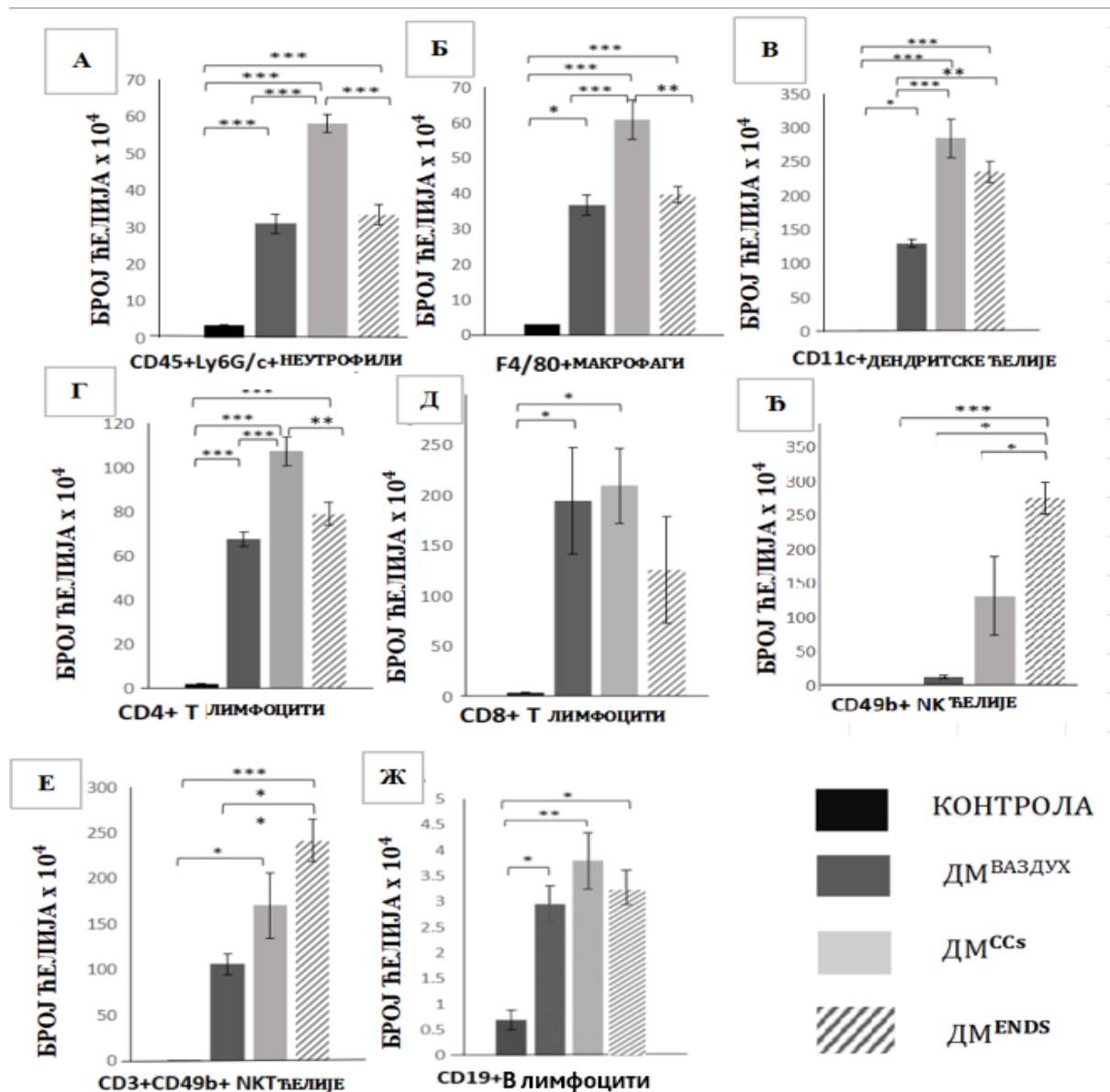
Фигура 31. Мањи степен упале и оштећења панкреаса уочено је након излагања ДМ мишева ENDS-у у односу на CCs-изложеност. Измерени нивои глукозе у крви (А) и урину (Б) били су статистички значајно већи код ДМ^{CCs} у односу на ДМ^{BA3DUX} и ДМ^{ENDS} почевши од 23. дана модела. Хистолошким скорирањем оштећења на нивоу ткива панкреаса, најозбиљније оштећење ткива панкреаса и најинтензивнија инфламација уочено је код ДМ^{CCs} мишева (В). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001.



Слика 13. Репрезентативне фотографије препарата панкреаса под светлосним микроскопом са увећањем од 40 пута потврђују разлике у оштећењу панкреасног ткива између група (Г): инфилтрат имунских ћелија (▲); инсулитис (→). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n = 8$ мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

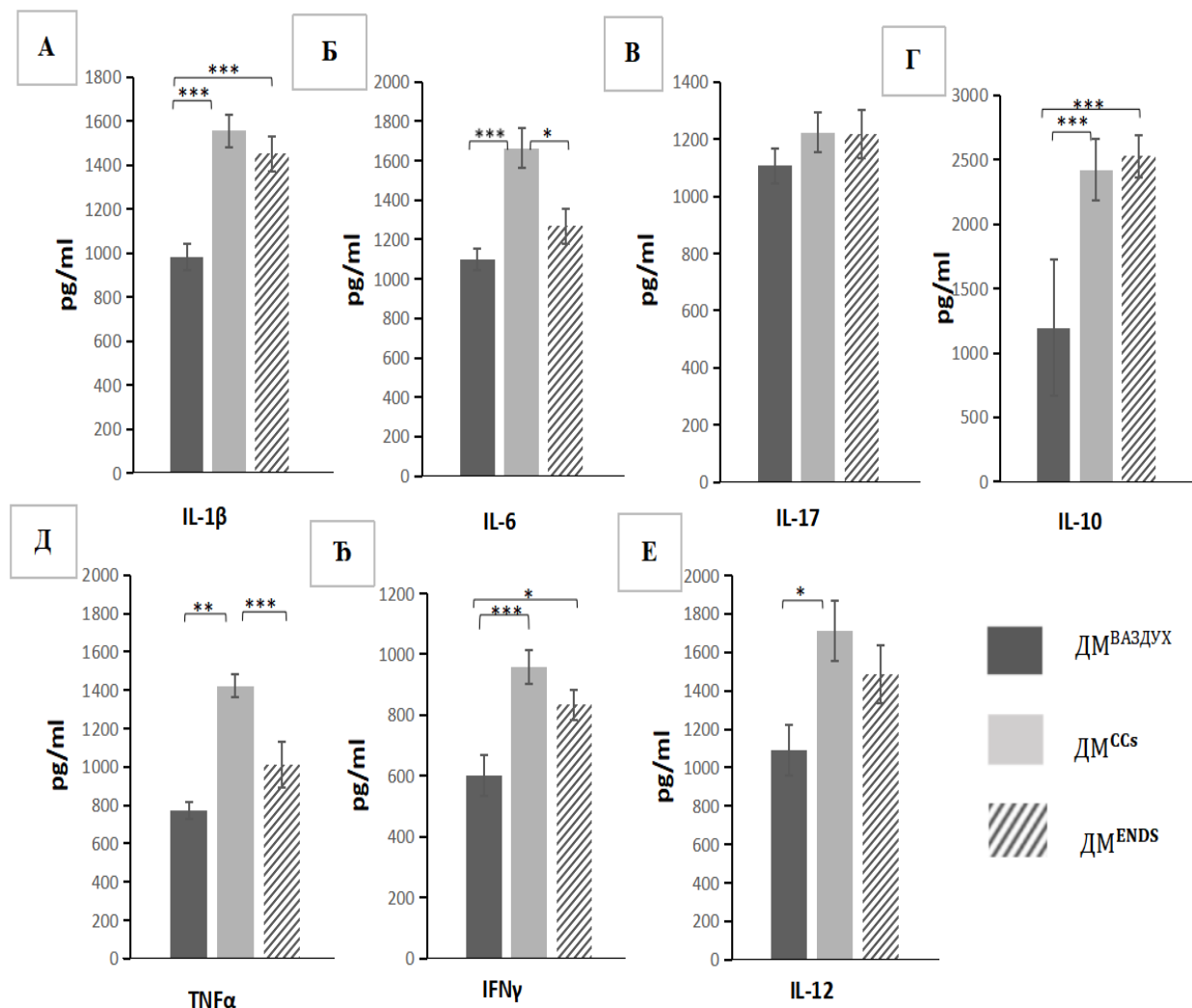
Успостављање ДМ-а петодневним третманом MLD-STZ потврђено је јаким системским инфламацијским одговором и повећаним присуством различитих популација имунских ћелија: неутрофила, макрофага, дендритских ћелија, Т лимфоцита, В лимфоцита, NK и NKT ћелија у анималним слезинама експерименталних група у односу на групу КОНТРОЛА (мишеви третирани PBS-ом) (Фигура 32А-Ж). Излагање ДМ мишева CCs и ENDS-у узроковало је додатну експанзију имунских ћелија у слезини мишева. Изложеност ДМ мишева ENDS-у покренула је системску инфламацију слабијим интензитетом у поређењу са CCs (Фигура 32А-Ж).

Статистички значајно већи укупан број CD45+Ly6G/c+ неутрофила (Фигура 32А, $p < 0,001$), F4/80+ макрофага (Фигура 32Б, $p < 0,01$), CD11c+ DCs (Фигура 32В, $p < 0,01$), CD4+ и CD8 +Т лимфоцита (Фигура 32Г-Д, $p < 0,01$) детектован је у слезинама мишева из групе ДМ^{CCs}, док је повећано присуство популација CD49b+NK (Фигура 32Ђ, $p < 0,05$) и CD49b+CD3+ NKT ћелије (Фигура 32Е, $p < 0,01$) уочено у слезинама ДМ^{ENDS} животиња. Додатно, повећан укупан број CD19+В ћелија детектован је код ДМ^{CCs} у поређењу са ДМ^{ENDS} групом иако није постојала статистички значајна разлика између ових група (Фигура 32Ж, $p > 0,05$).



Фигура 32. Проточна цитометрија детектовала је највећи број CD45+Ly6G/c+ неутрофила (А), F4/80+ макрофага (Б), CD11c+ DC (В), CD4+ (Г) и CD8 +Т лимфоцита (Д) у слезини ДМ^{CCs} мишева. Са друге стране, код ДМ^{ENDS} уочен је највећи број популација CD49b+NK (Ђ) и CD49b+CD3+ NKT ћелије (Е). Додатно, укупан број CD19+ В ћелија (Ж) био је највећи код ДМ^{CCs} мишева али без статистички значајне разлике. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n = 8$ мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

У серуму ДМ^{CCs} мишева детектоване су највише концентрације проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α , IFN γ и IL-12 (Фигура 33А-Е) док су у серуму мишева из групе ДМ^{ENDS} детектоване највише концентрација имunosупресивног цитокина IL-10 (Фигура 33Г).

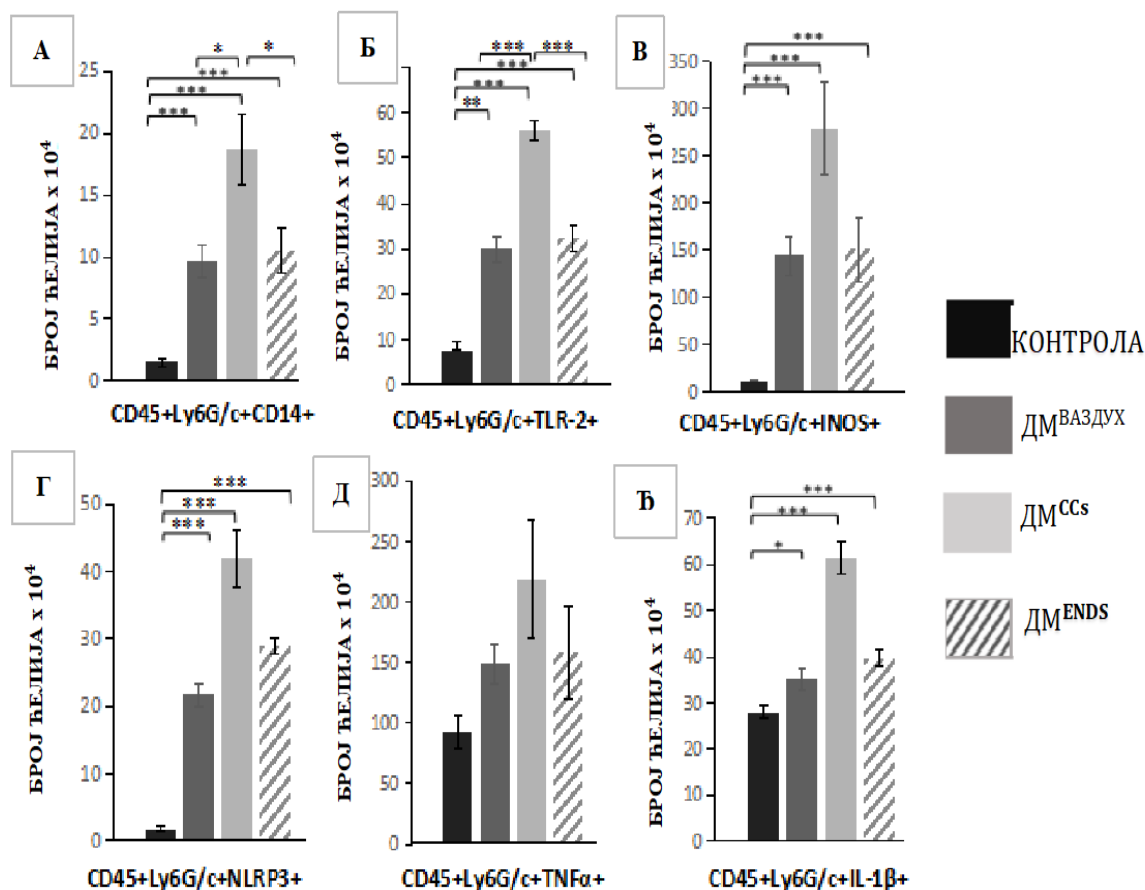


Фигура 33. Повећано присуство цитокина IL-1 β (А), IL-6 (Б), IL-17 (В), TNF α (Д), IFN γ (Ђ) и IL-12 (Е) детектовано је у серуму ДМ^{CCs} мишева. Са друге стране, код ДМ^{ENDS} детектована је највећа концентрација имunosупресивног цитокина IL-10 (Г). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001.

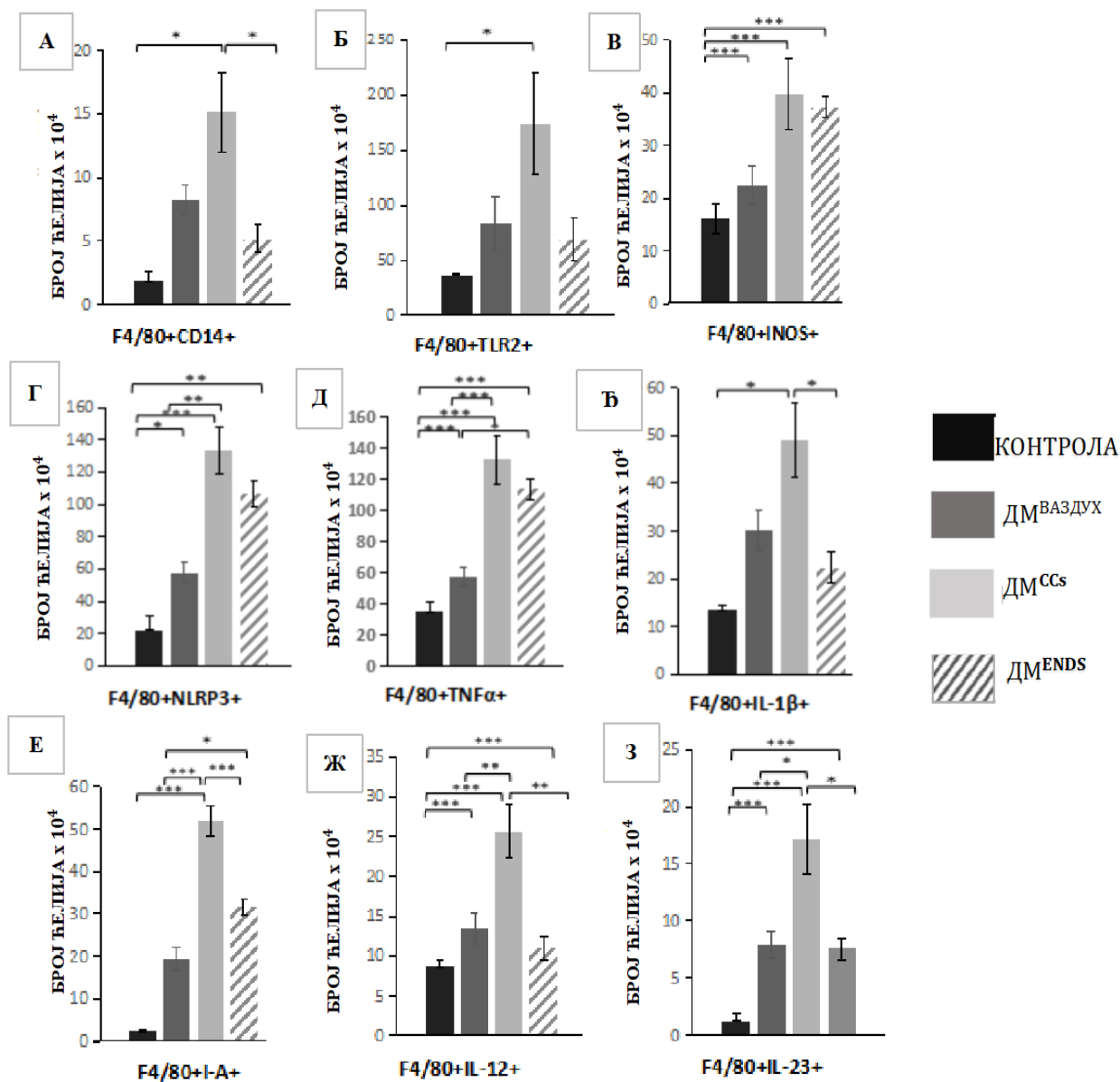
4.4.2. Код ДМ мишева, дуготрајна изложеност аеросолима ENDS-а узроковала је нижи ниво активација NLRP3 инфлазома и последично нижи интензитет секреције проинфламацијских цитокина у неутрофилима и макрофагима у поређењу са CCs

Индукција ДМ је изазвала системски инфламацијски одговор и промовисала фагоцитна својства макрофага и неутрофила, што је потврђено значајно већим присуством CD14- и TLR2-експресујућих CD45+Ly6G/c+ неутрофила (Фигура 34А–Б) и F4/80+ макрофага у слезинама ДМ мишева у поређењу са групом КОНТРОЛА (Фигура 35А–Б). Додатно, успостављање ДМ-а је активирало iNOS и NLRP3 инфлазом и последично повећало неутрофилну (Фигура 35В–Ђ) и макрофагну секрецију проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-1 β (Фигура 36В–Ђ). Уочена је и ДМ-специфична повећана експресија I-A (Фигура 36Е) и производња проинфламацијских Th1 и Th17 цитокина (IL-12, IL-23) у макрофагима (Фигура 36Ж–З, $p < 0,05$).

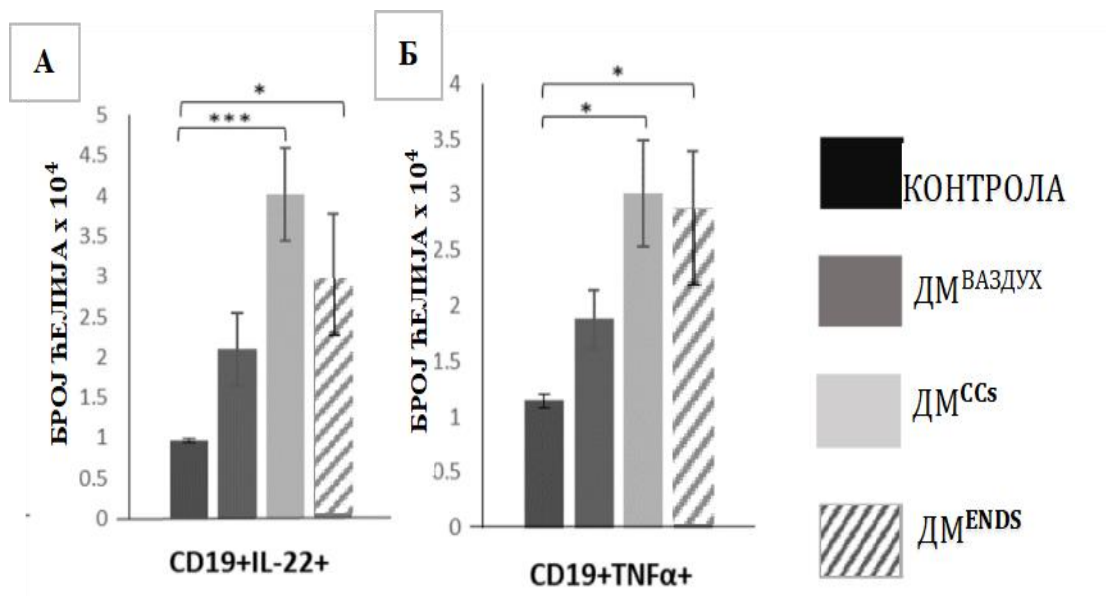
Компарацијом експерименталних група, детектован је значајно веће присуство неутрофила и макрофага који експримирају NLRP3, iNOS, CD14, TLR-2 и производе TNF- α и IL-1 β и значајно већи број макрофага који експримирају I-A и секретују IL-12 и IL-23 у групи ДМ^{CCs} мишева у поређењу са групом ДМ^{BAZДУХ}, указујући на потенцијал CCs да додатно појача секрецију проинфламацијских цитокина у неутрофилима и макрофагима ДМ мишева (Фигуре 35-36). Додатно, у слезини ДМ^{ENDS} био је присутан мањи број макрофага који експримирају NLRP3, iNOS, CD14, TLR-2, I-A и секретују TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IL-23, као и неутрофила који експримирају NLRP3, iNOS, CD14, TLR-2 и производе TNF- α , IL-1 β у односу на мишеве из групе ДМ^{CCs}, потврђујући мањи капацитет ENDS-а да активирају макрофаге и неутрофиле код ДМ мишева (Фигуре 35-36). Повећана производња IL-22 и TNF- α у В лимфоцитима је уочена код ДМ^{ENDS} и ДМ^{CCs} мишева без статистички значајне разлике у односу на ДМ^{BAZДУХ} групу (Фигура 37А–Б, $p > 0,05$).



Фигура 35. У групи ДМ^{CCs} детектована је повећана активација инфламазома NLRP3 и последична цитокинска продукција у неутрофилима у односу на ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZДУХ}. Анализа проточне цитометрије је у слезинама мишева из групе ДМ^{CCs} детектовала већи укупан број CD14 (А), TLR-2-експресујућих (Б), iNOS (В), NLRP3-експресујућих (Г), TNF-α (Д) и IL-1β-продукујућих CD45+Ly6g+неутрофила (Ѕ) у односу на мишове из група ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZДУХ}. Вредности су приказане као средња вредност ± SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



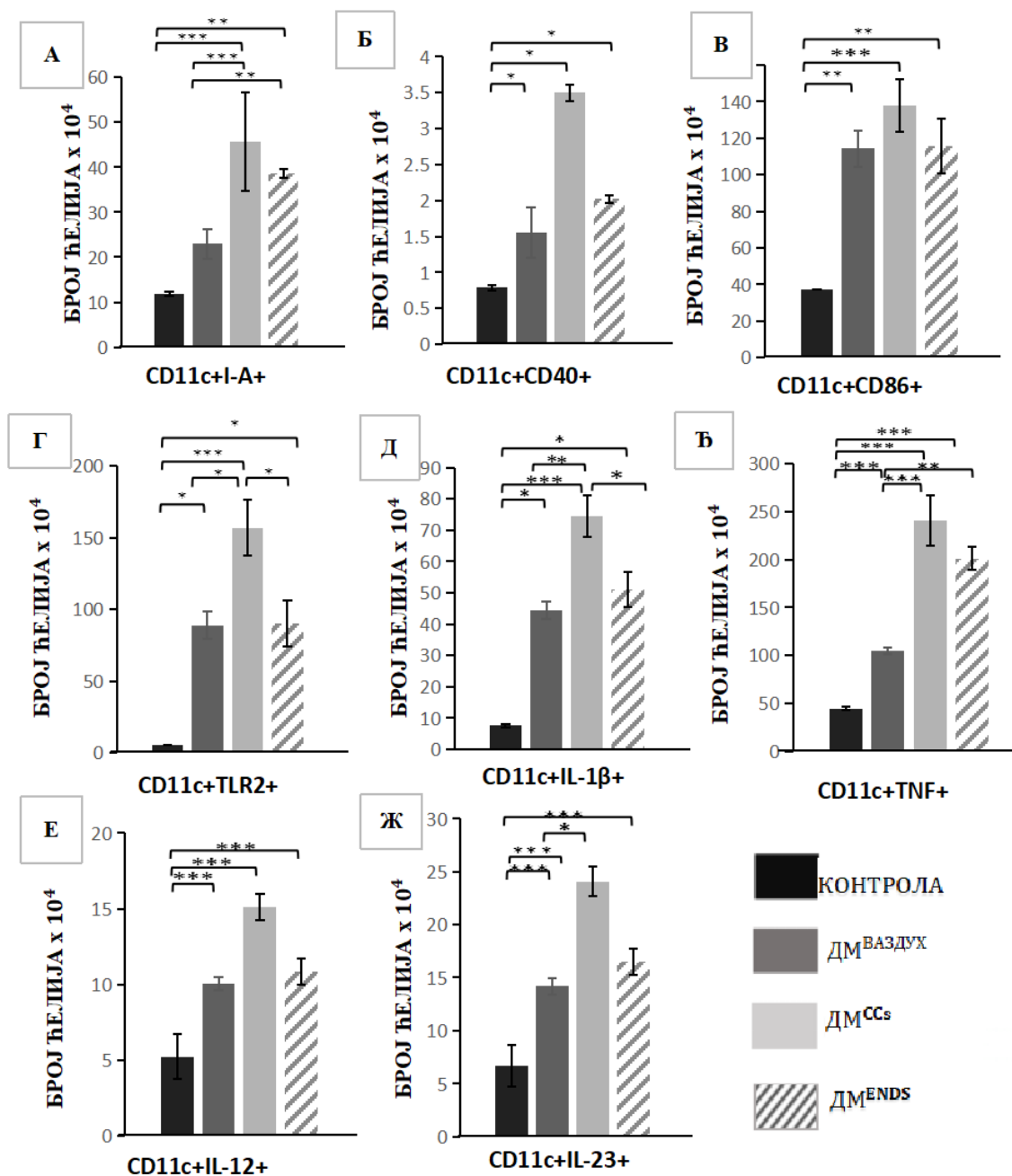
Фигура 36. У групи ДМ^{CCs} детектована је повећана активација инфламазома NLRP3 и последична цитокинска продукција макрофагима у односу на ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZДУХ}. Анализа проточне цитометрије је у слезинама мишева из групе ДМ^{CCs} детектовала већи укупан број CD14 (А), TLR-2-експресујућих (Б), iNOS (В), NLRP3-експресујућих (Г), TNF-α (Д) и IL-1β-продукујућих (Ђ), I-A-експресујућих (Е), IL-12 (Ж), IL-23-продукујућих (3) F4/80+ макрофага (Л-М) у односу на мишеве из група ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZДУХ}. Вредности су приказане као средња вредност ± SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001



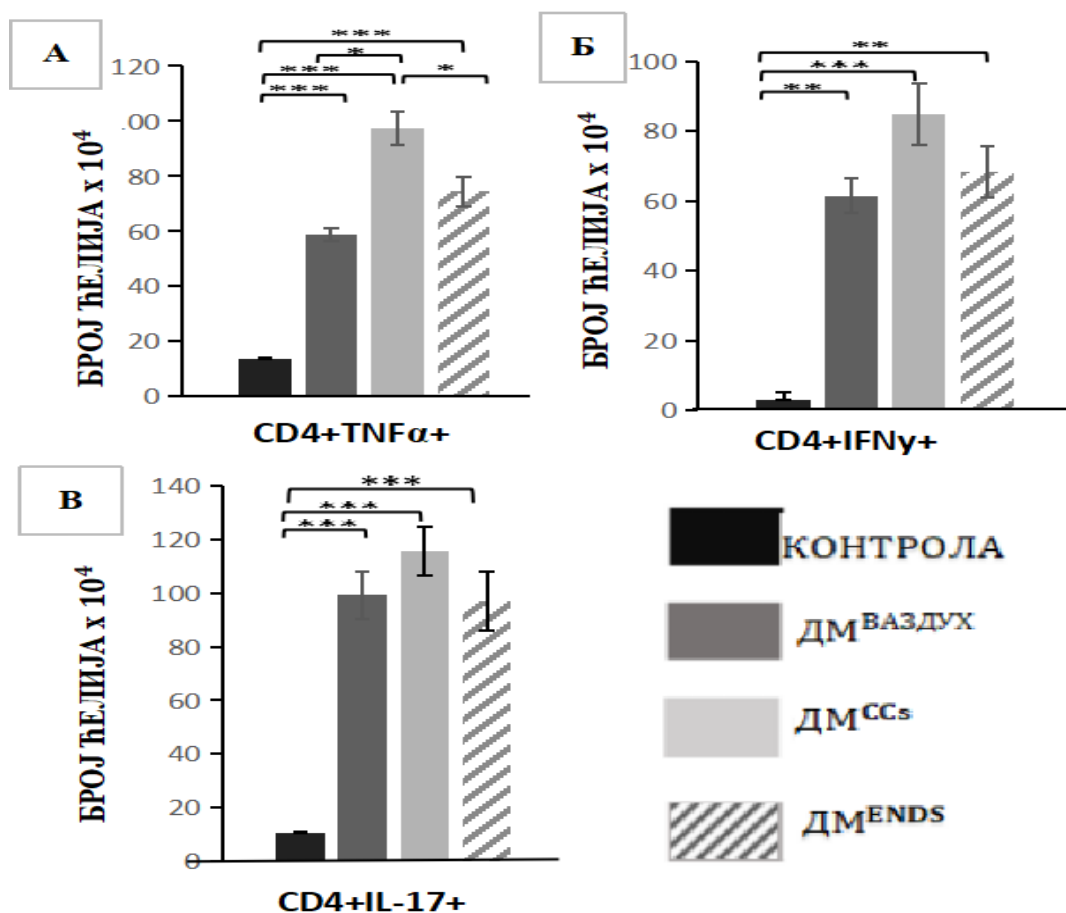
Фигура 37. Анализа проточне цитометрије је у слезинама мишева из групе ДМ^{CCs} детектовала већи укупан број IL-12 И TNF- α -продукујућих CD19+ В лимфоцита у односу на мишеве из група ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZDUK}. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

4.4.3. ENDS слабијим интензитетом промовише антиген-презентујући капацитет DC и активацију Т и NKT ћелије код ДМ мишева у односу на CCs

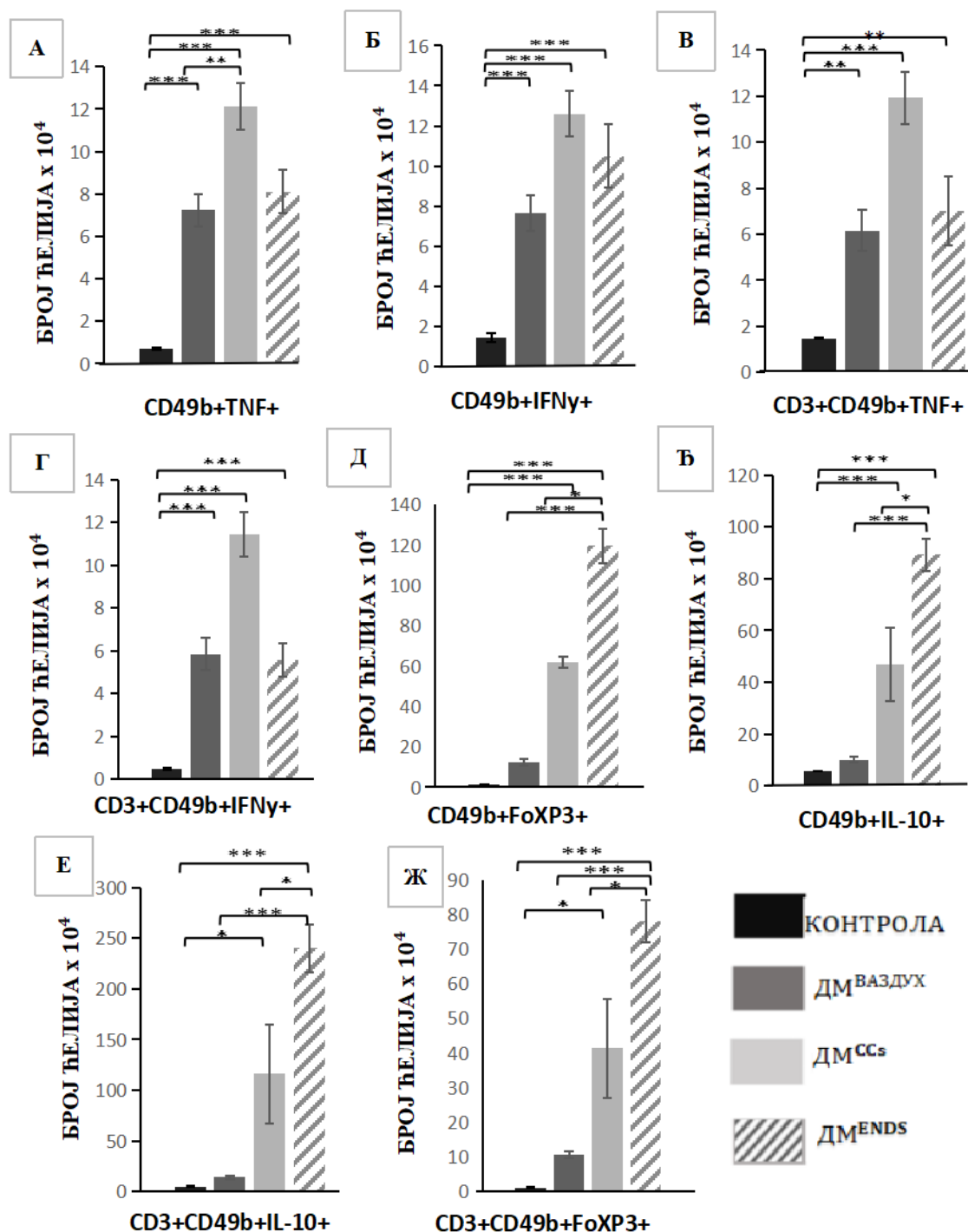
Индукција шећерне болести је узроковала побошљање антиген-презентујућих способности и продукцију про-Th1 и про-Th17 цитокина у DC. Проточном цитометријом је детектован већи укупан број CD11c+ ћелија које секретују IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-23, и експримирају I-A, CD40, CD86, TLR-2 у слезини ДМ мишева у односу на контролну групу здравих мишева, потврђујући текући системски одговор изазван индукцијом болести (Фигура 38А–Ж). Повећана активација DC покренула је повећану активацију Th1 лимфоцита који продукују TNF- α и IFN- γ и Th17 лимфоцита који продукују IL-17 (Фигура 39А–В). Додатно, ДМ индукција је узроковала и повећано присуство инфламацијских CD49b+NK и CD49b+CD3+NKT ћелија које продукују TNF- α и IFN- γ (Фигура 40А–Г). Компарацијом резултата између експерименталних група уочен је снажнији потенцијал CCs да подстакне DC да презентују антигене као и да појача производњу проинфламацијских цитокина, услед чега је већи број TNF- α , IFN- γ -секретујућих CD4+ Т лимфоцита (Фигура 39А–Б), CD49b+NK и CD49b+CD3+ NKT ћелија (Фигура 40А–Г) и IL-17-секретујућих CD4 Т лимфоцита у слезини ДМ^{CCs} мишева у односу на резултате групе ДМ^{ENDS} (Фигура 39В). Дакле, ENDS код ДМ мишева утичу на DC-посредовану активацију Т и NKT ћелија слабијим интензитетом у поређењу са CCs. Са друге стране, ENDS су промовисале интензивнију експанзију транскрипционог фактора FoxP3 и секрецију IL-10 у CD49b+NK и CD49b+CD3+ NKT ћелијама код ДМ мишева у односу на CCs (Фигура 40Д–Ж, p<0,05).



Фигура 38. У поређењу са резултатима из групе ДМ^{CCs} мишева, DC ДМ^{ENDS} мишева поседују смањен капацитет за презентацију антигена и активацију Т и NKT ћелија. Проточном цитометријом је у групи ДМ^{CCs} детектован већи укупан број CD11c+ DC које експримирају I-A (А), CD40 (Б), CD86 (В), TLR-2 (Г) и производе IL-1 β (Д), TNF- α (Б), IL-12 (Е), IL-23 (Ж) у односу на ДМ^{ENDS} и ДМ^{BA3ДУХ}. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



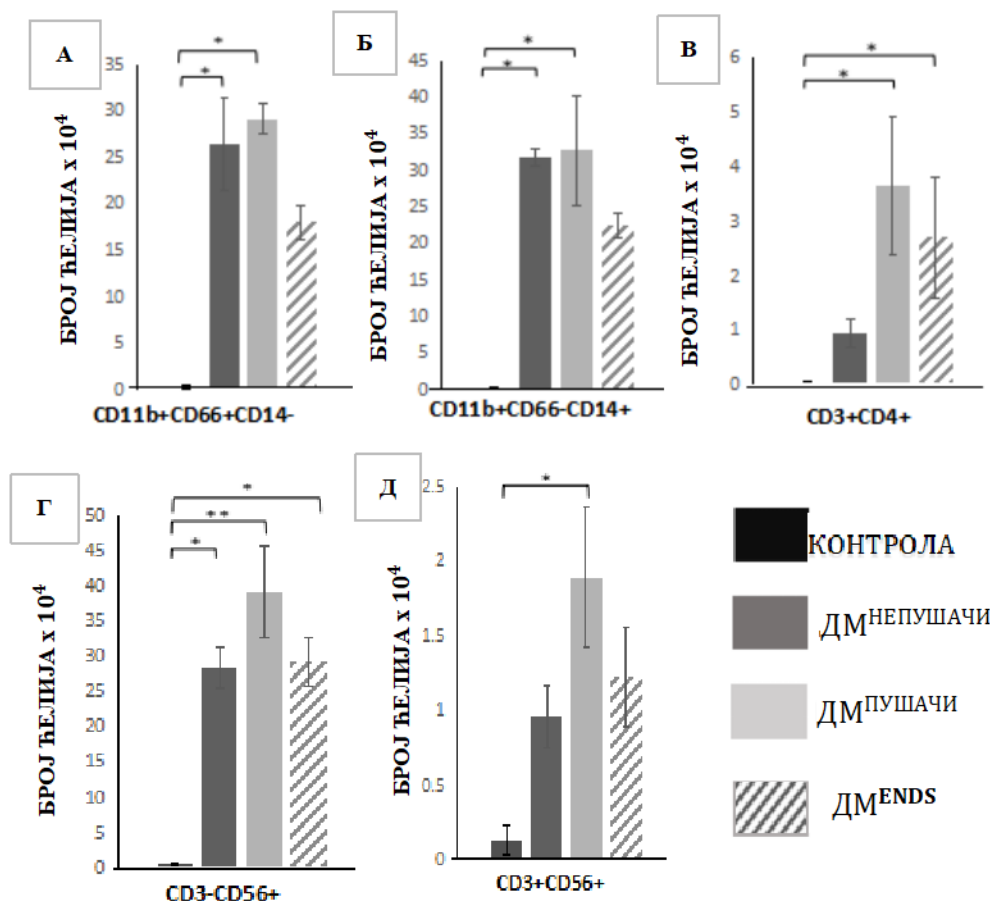
Фигура 39. Проточном цитометријом је у групи ДМ^{CCs} детектован већи укупан број CD4+ Т лимфоцита који секретију про-Th1 цитокине TNF-α (А), IFN-γ (Б) и ро-Th17 цитокин IL-17 (В) у односу на ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZDUK}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



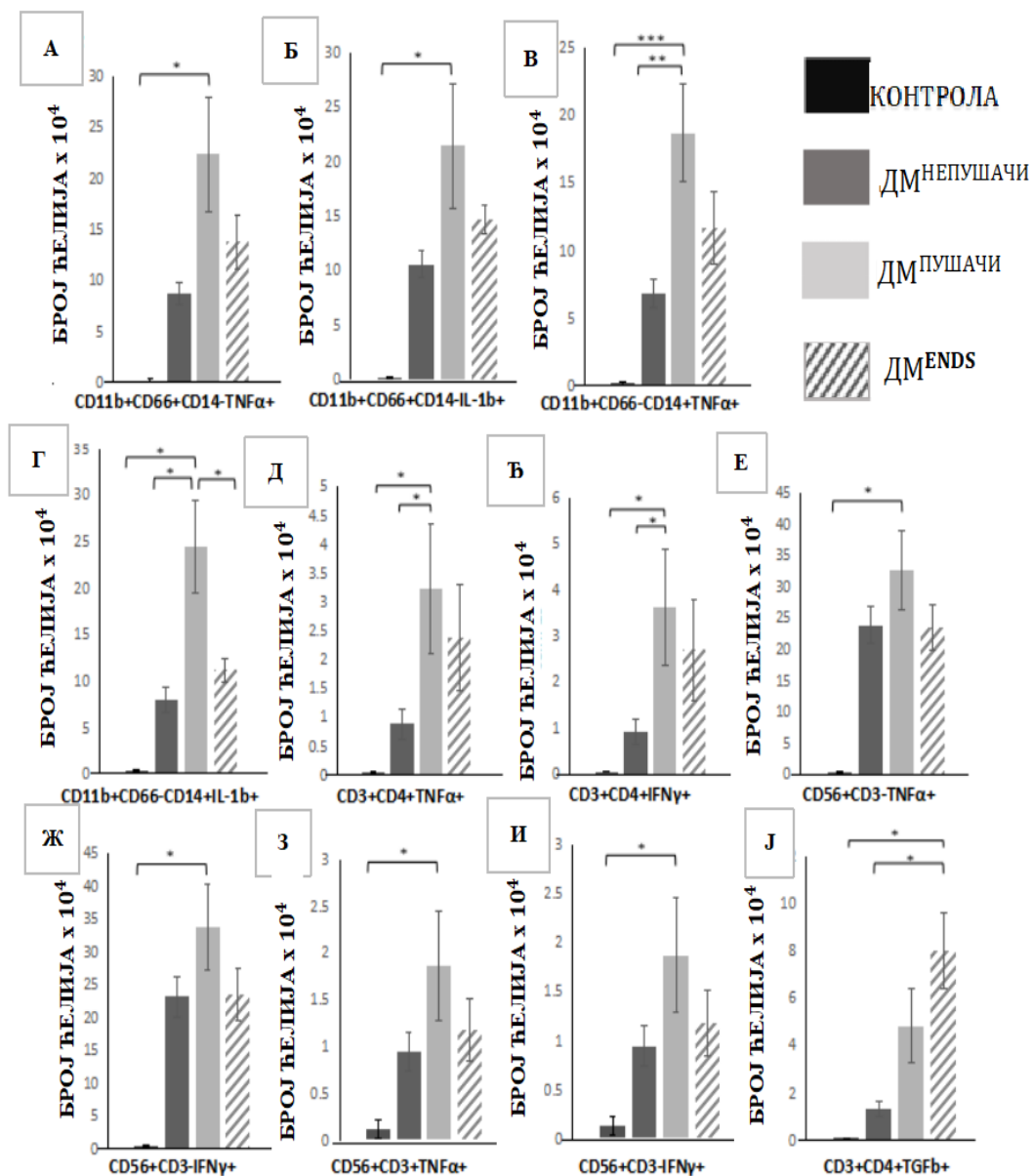
Фигура 40. Проточном цитометријом је у групи ДМ^{CCs} детектован већи укупан број CD49b+NK и CD49b + CD3 + NKT ћелија које секретује TNF-α и IFN-γ (А–Г) у односу на ДМ^{ENDS} и ДМ^{BAZДУХ}. Са друге стране, у групи ДМ^{ENDS} мишева је детектована експанзија FoxP3 и IL-10 у CD49b+NK (Д–Ђ) и CD49b + CD3 + NKT ћелијама (Е–Ж) која није запажена у другим групама. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

4.4.4. У крви пацијената оболелих од шећерне болести који су корисници ENDS-а детектован је мањи број инфламацијских имунских ћелија у односу на ДМ пацијенте који користе цигарете (CCs)

У сличном маневру као и код експерименталних животиња, у крви пацијената оболелих од шећерне болести уочен је повећан број CD11b+CD66+CD14- неутрофила, CD11b+CD66-CD14+ моноцита, CD3+CD4+Т лимфоцита, CD56+CD3-NK и CD56+CD3+NKT ћелија у односу на здраве испитанике, потврђујући интензиван системски одговор узрокован болешћу (Фигура 41А-Д). Дуготрајна употреба CCs промовисала је проинфламацијски фенотип у моноклеарним ћелијама ДМ пацијената преко повећања укупног броја неутрофила и моноцита који секретују TNF- α и IL-1 β (Фигура 42А-Г, $p<0,05$), CD3+CD4+Т лимфоцита, CD56+CD3-NK и CD56+CD3+NKT ћелија који продукују TNF- α и IFN- γ који продукују TNF- α и IFN- γ (Фигура 42Д-И). ДМ пацијенти који су непушачи или ENDS корисници имали су значајно мање укупне бројеве наведених популација имунских ћелија. Међутим, иако је дуготрајна употреба ENDS-а испољила слабији стимулативни ефекат на активацију проинфламацијског фенотипа, ефекат на подстицање имуносупресије је био ефикаснији у односу на CCs. Имуносупресивни ефекат ENDS-а код ДМ пацијената се огледа у већем укупном броју CD3+CD4+Т лимфоцита који секретују TGF- β у поређењу са резултатима код ДМ пацијената из групе CCs (Фигура 42Ј, $p<0,05$).



Фигура 41. Дуготрајна конзумација CCs фаворизује проинфламацијски фенотип у имунским ћелијама пацијената оболелих од шећерне болести. Проточном цитометријом је детектован повећан број CD11b+CD66+CD14-неутрофила (А), CD11b+CD66-CD14+моноцита (Б), CD3+CD4+Т лимфоцита (В), CD56+CD3-NK (Г) и CD56+CD3+NKT ћелија (Д) у крвинм узорцима ДМ пацијената из групе пушача у односу на ДМ кориснике ENDS-а и ДМ непушаче. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 21 (ДМ непушачи=7, ДМ корисници CCs=7, ДМ корисници ENDS-а=7, здрави волонтери=7); *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



Фигура 42. Инфламацијски фенотип је узрокован повећаним бројем неутрофила и моноцита који секретију TNF- α и IL-1 β (А-Г), CD3+CD4+Т лимфоцита, CD56+CD3-NK и CD56+CD3+NKT ћелија које секретију TNF- α и IFN- γ (Д-И) у групи ДМ пушача. Са друге стране, употреба ENDS-а промовисала је имunosупресивни фенотип преко повећаног броја CD3+CD4+Т ћелија које секретију TGF- β (Ј). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 21 (ДМ непушачи=7, ДМ корисници CCs=7, ДМ корисници ENDS-а=7, здрави волонтери=7); *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

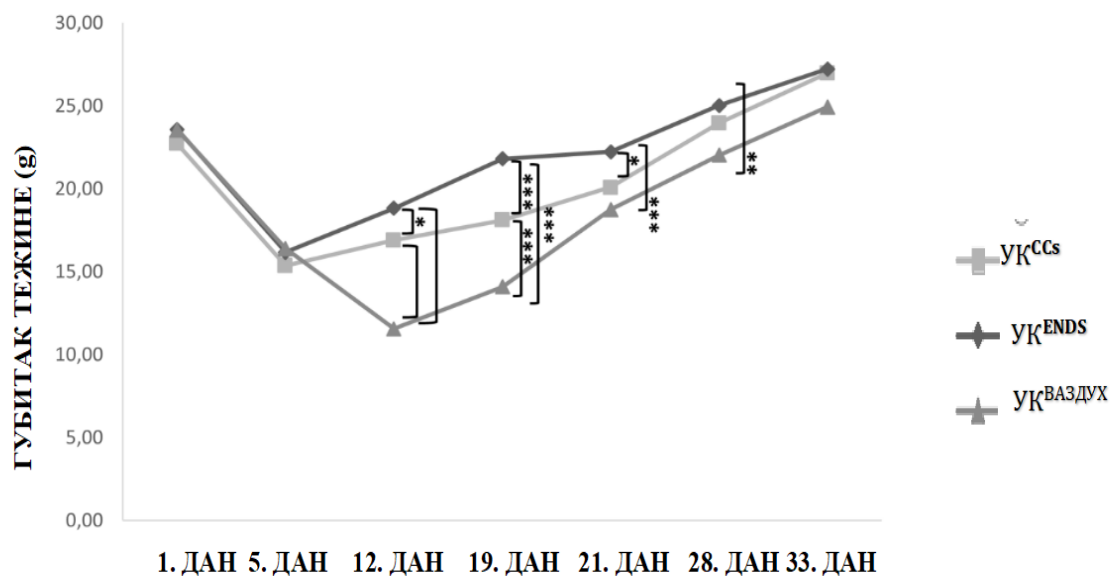
4.5. Утицај CCs и ENDS-а на прогресију улцерозног колитиса

Улцерозни колитис је изазван помоћу воденог раствора DSS-а у интервалу од 5 дана. Након позитивне дијагностике болести, експерименталне животиње су подељене у 3 групе $УК^{BAZDUX}$, $УК^{CCs}$ и $УК^{ENDS}$ на основу третмана којима су били изложени наредне 4 недеље.

Узорци периферне крви УК пацијената из групе непушача, пушача и ENDS корисника су коришћени за испитивање утицаја CCs и ENDS-а на прогресију УК код људи.

4.5.1. Континуирана изложеност дуванском диму CCs и аеросолима ENDS-а промовисала је зарастање оштећење слузокоже колона што је узроковала бољи спонтани опоравак и преживљавање мишева третираних DSS-ом

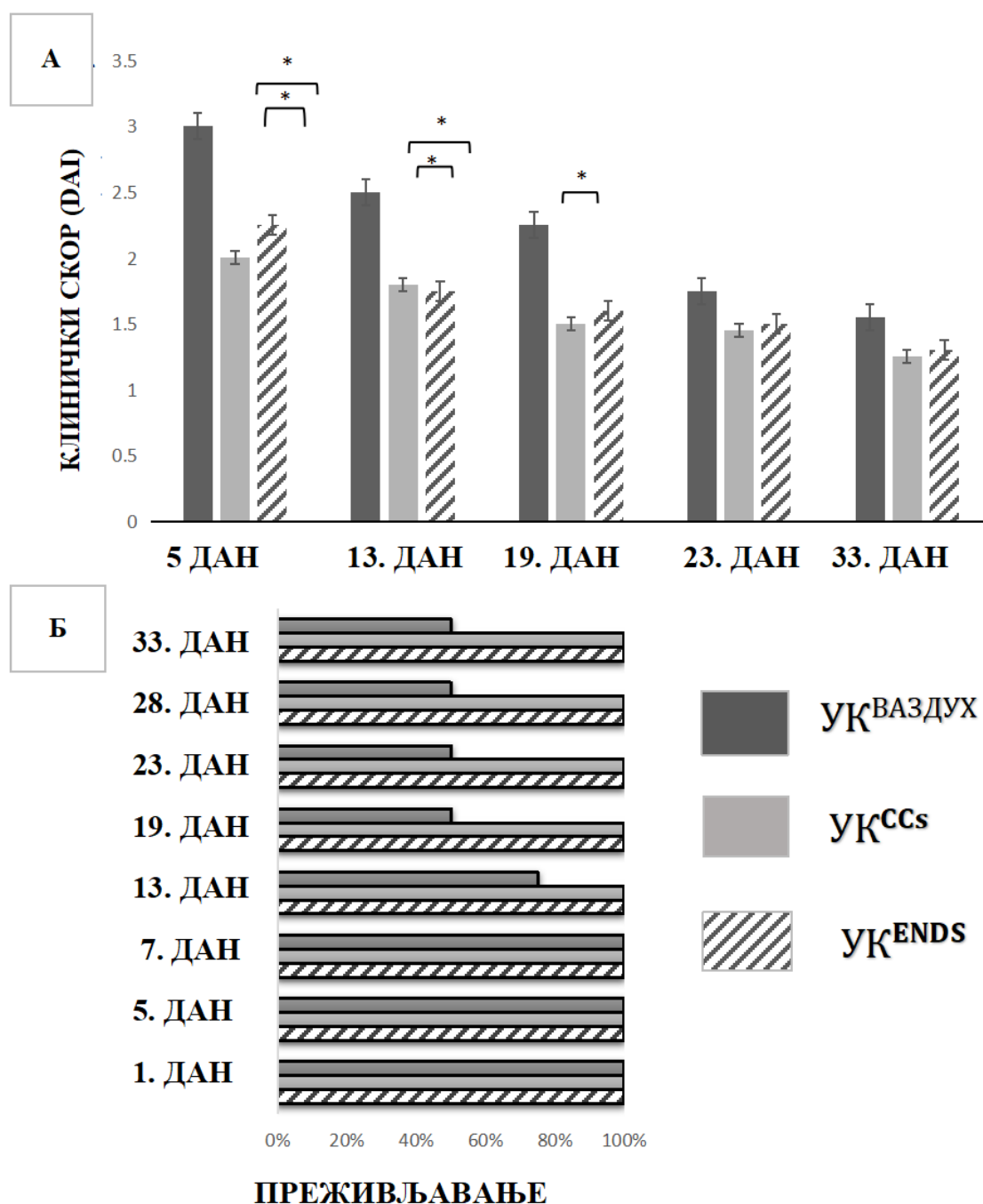
Експерименталним животињама је изазван УК помоћу DSS-третмана. Након успостављања болести, животиње које су биле изложене чистом ваздуху ($УК^{BAZDUX}$) током 2 недеље опоравка (дани 5-19) претрпеле су значајно озбиљнији губитак тежине у поређењу са мишевима изложеним CCs ($УК^{CCs}$) и ENDS-у ($УК^{ENDS}$) (Графикон 4, $p < 0,05$). Мишеви из група $УК^{CCs}$ и $УК^{ENDS}$ су убрзо након прекидања уноса DSS-а почели да опорављају своју телесну тежину и до 23. дана су потпуно повратили првобитну. Са друге стране, УК животиње које су у фази опоравка биле изложене само ваздуху су наставиле да губе телесну тежину до 13. дана и потпуни повратак првобитне тежине није достигнут до краја експеримента (28. дан).



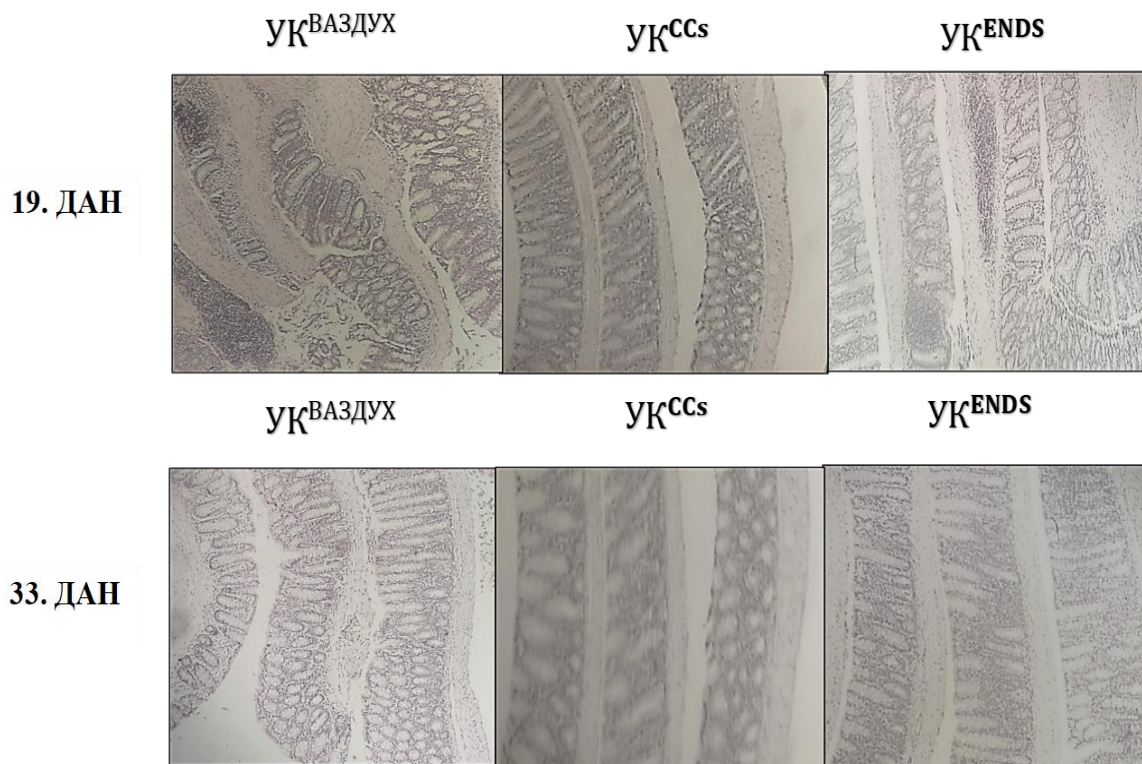
Графикон 4. CCs и ENDS су побољшали зарастање оштећене слузокоже колона, спонтани опоравак и преживљавање мишева третираних DSS-ом. Графикони праћења губитка тежине показују значајно позитивно дејство CCs и ENDS-а у току фазе опоравка (5-19. дан). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n=8$ мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Додатно, клинички резултати болести у току фазе опоравка мишева из групе УК^{BA3DYX} били су значајно виши у поређењу са УК мишевима третираним CCs и ENDS-ом (Фигура 43А, $p < 0,05$). У току две недеље од престанка излагања мишева DSS-у (до 19. дана), воденаста столица и ректално крварење били су присутни у групи УК^{BA3DYX} док су у групама УК^{CCs} и УК^{ENDS} ови клинички знаци били одсутни. Континуирана изложеност CCs и ENDS-у узроковала је ниже вредности клиничког скорa исказаног кроз вредности DAI током фазе опоравка УК (Фигура 43А, $p < 0,05$), указујући на њихово протективно дејство на оштећену слузокожу дебелог црева. Коначно, на крају експеримента (33. дан) није постојала статистички значајна разлика у губитку телесне тежине и DAI вредностима између контролне (УК^{BA3DYX}) и експерименталних група (УК^{CCs} и УК^{ENDS}), указујући на спонтано зарастање оштећених сегмената колона узрокованих DSS-ом што је и потврђено хистолошком анализом (Слика 14). Благи степен упале, реепителизација уочених улцеративних промена и ретки инфилтрати имунских ћелија уочени су у узорцима колона УК^{CCs} мишева 19. дана експерименталног модела потврђујући сукцесиви процес зарастања ткивних оштећења. На нивоу ткива мишева из групе УК^{ENDS} 19. дана модела уочено је задебљање зидова ћелија колона, хипетрофија крипти и регенерација пехарастих ћелија. Супротно наведеним резултатима из експерименталних група, у узорцима ткива колона мишева из контролне групе (УК^{BA3DYX}) 19. дана модела су уочене перзистентне манифестације оштећења колона и инфламације: улцерације, апсцеси крипти, губитак пехарастих ћелија, бројни инфилтрати имунских ћелија. Четири недеље од завршетка DSS третмана, 33. дан, у ткивним узорцима колона нису детектовани знаци инфламације и оштећења сугеришући да је дошло до спонтаног опоравка колона претходно оштећеног DSS-ом.

Међутим, спонтани опоравак је промовисан третманима CCs и ENDS-ом доводећи до побољшаног преживљавања мишева из експерименталних група (Фигура 43Б, $p < 0,05$). У контролној групи, УК^{ВАЗДУХ}, до 19. дана је угинуло 30% експерименталних животиња, док су сви мишеви из експерименталних група преживели до краја експеримента.

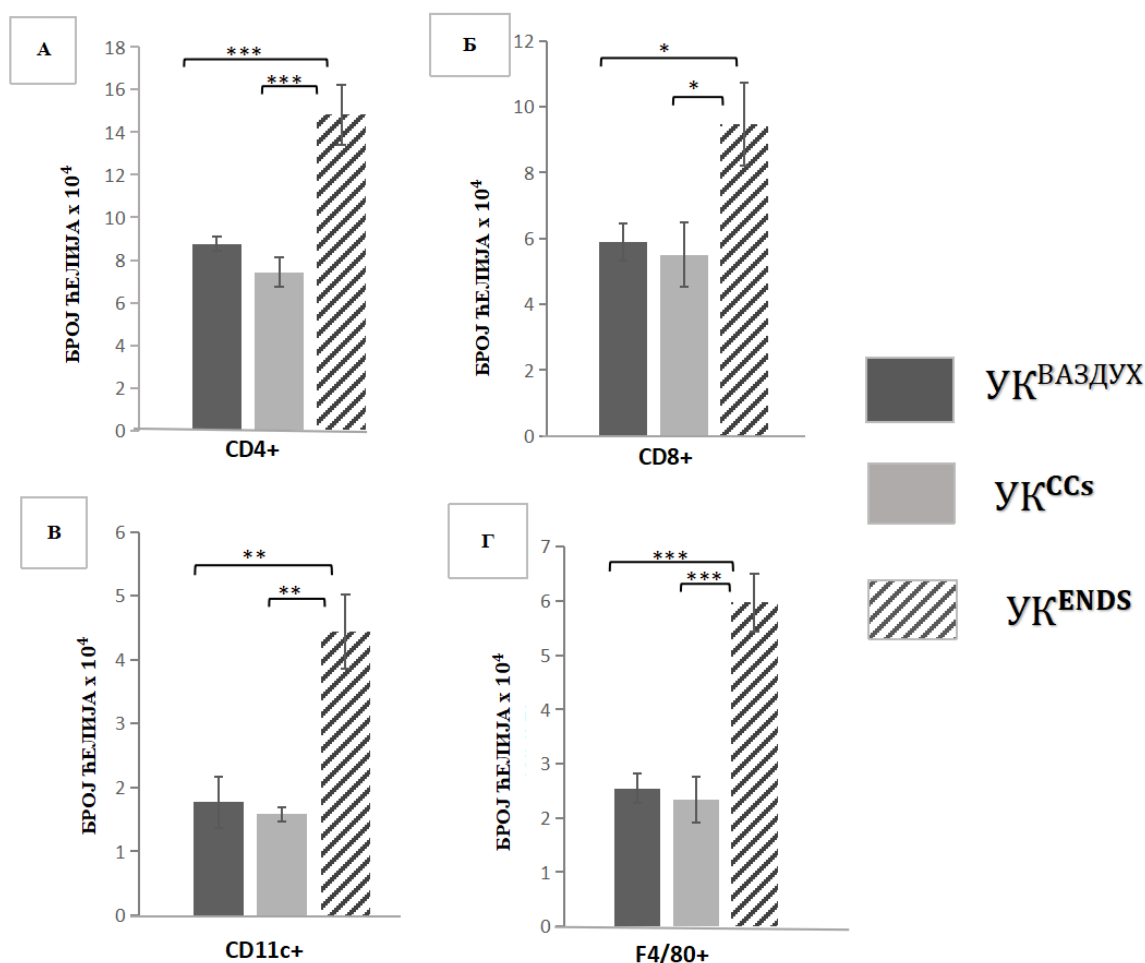


Фигура 43. Графикони праћења DAI клиничког скорa показују значајно позитивно дејство CCs и ENDS-а у току фазе опоравка (5-19. дан). Графикон преживљавања (Г) показује смртност 30% мишева у УК^{ВАЗДУХ} групи до 19. дана и потпуно преживљавање свих мишева из експерименталних група до краја експеримента. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n=8$ мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



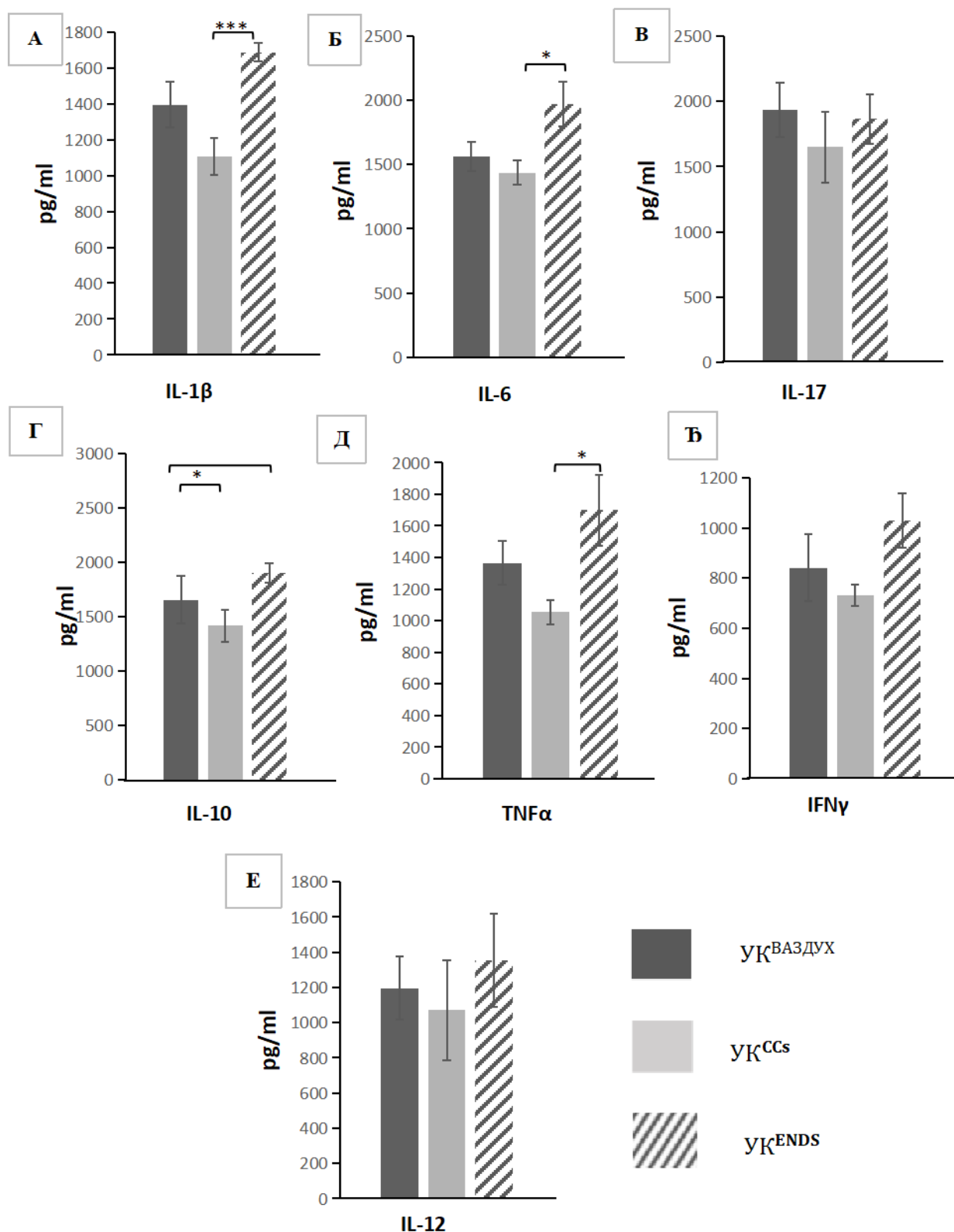
Слика 14. Репрезентативне фотографије Н&Е хистолошке анализе 19. дана анималног модела потврђују слабију инфламацију и почетно зарастање оштећене слузокоже колона у ткивима мишева из група $УК^{ENDS}$ и $УК^{CCs}$, док у ткивима $УК^{BAZДУХ}$ мишева показују апсцеса крипти и инфилтрате имунских ћелија. Н&Е фотографије добијене 33. дана модела показују одуство знака инфламације и оштећења у контролној и експерименталним групама потврђујући спонтани опоравак експерименталних животиња.

Анализом ћелијског састава колона УК^{ENDS} мишева уочено је повећано присуство CD4⁺ (Фигура 44А, $p < 0.001$), CD8⁺ Т лимфоцита (Фигура 44Б, $p < 0.05$), CD11c⁺ DC (Фигура 44В, $p < 0.01$) и F4/80⁺ макрофага (Фигура 44Г, $p < 0.01$) у односу на УК^{BAЗДУХ} и УК^{CCs}.



Фигура 44. Анализа проточне цитометрије имунских ћелија инфилтрираних у ткиво колона показује веће присуство CD4⁺ (А), CD8⁺Т лимфоцита (Б), CD11c⁺ DC (В) и F4/80⁺ макрофага (Г) код УК^{ENDS} у односу на УК^{BAЗДУХ} и УК^{CCs}. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=8 мишева по групи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

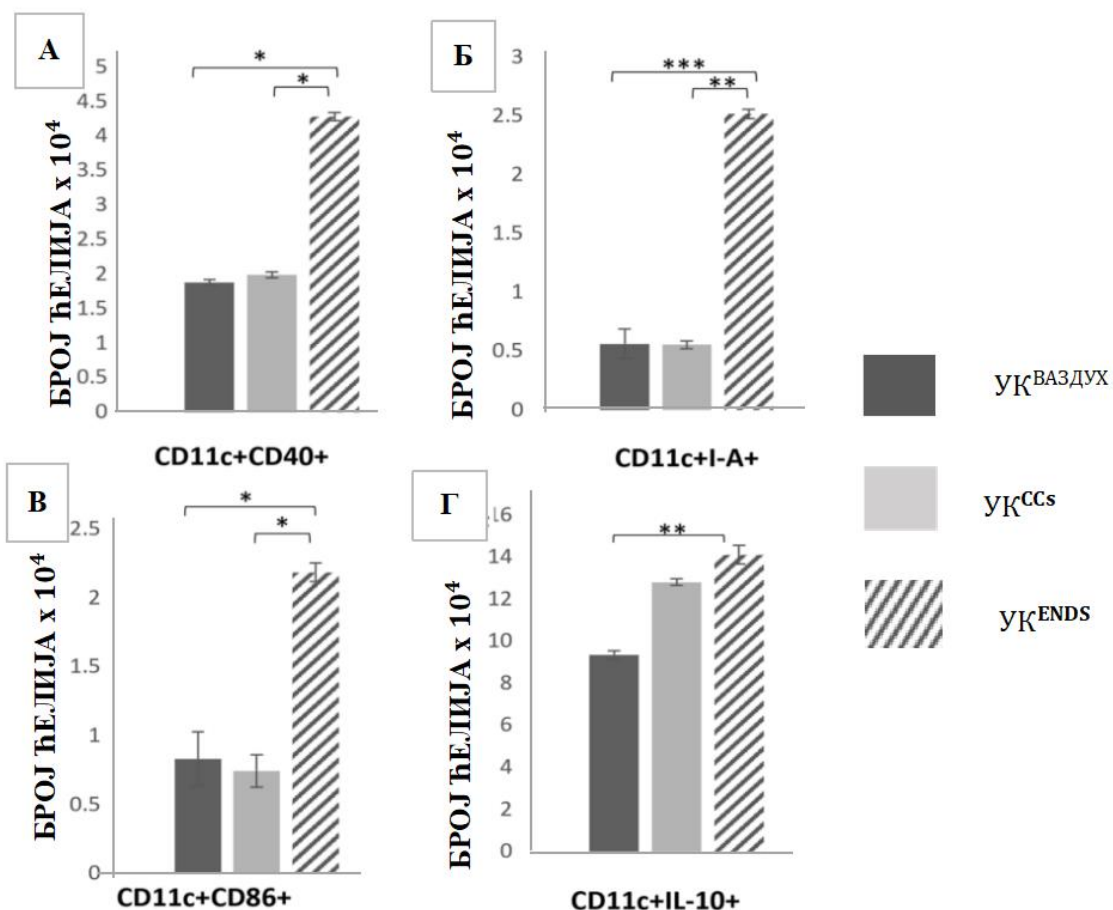
Изостанак инфилтрације инфламираног ткива колона ефекторским, проинфламацијским имунским ћелијама потврђено је и изузетно ниским концентрацијама цитокина IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α , IFN γ и IL-12 у серуму мишева из групе УК^{CCs} (Фигура 45). Додатно, детектоване су и ниске концентрације имуносупресивног цитокина IL-10, што сугерише да дувански дим CCs испољава штетан цитотоксични ефекат на имунске ћелије у улцерозном колитису. Са друге стране, повећана концентрација цитокина IL-17 детектована у серуму УК^{ENDS} мишева може промовисати експанзију Treg, толерогених DC и алтернативно-активираних макрофага и објаснити спонтани опоравак детектован хистолошком анализом (Фигура 45В).



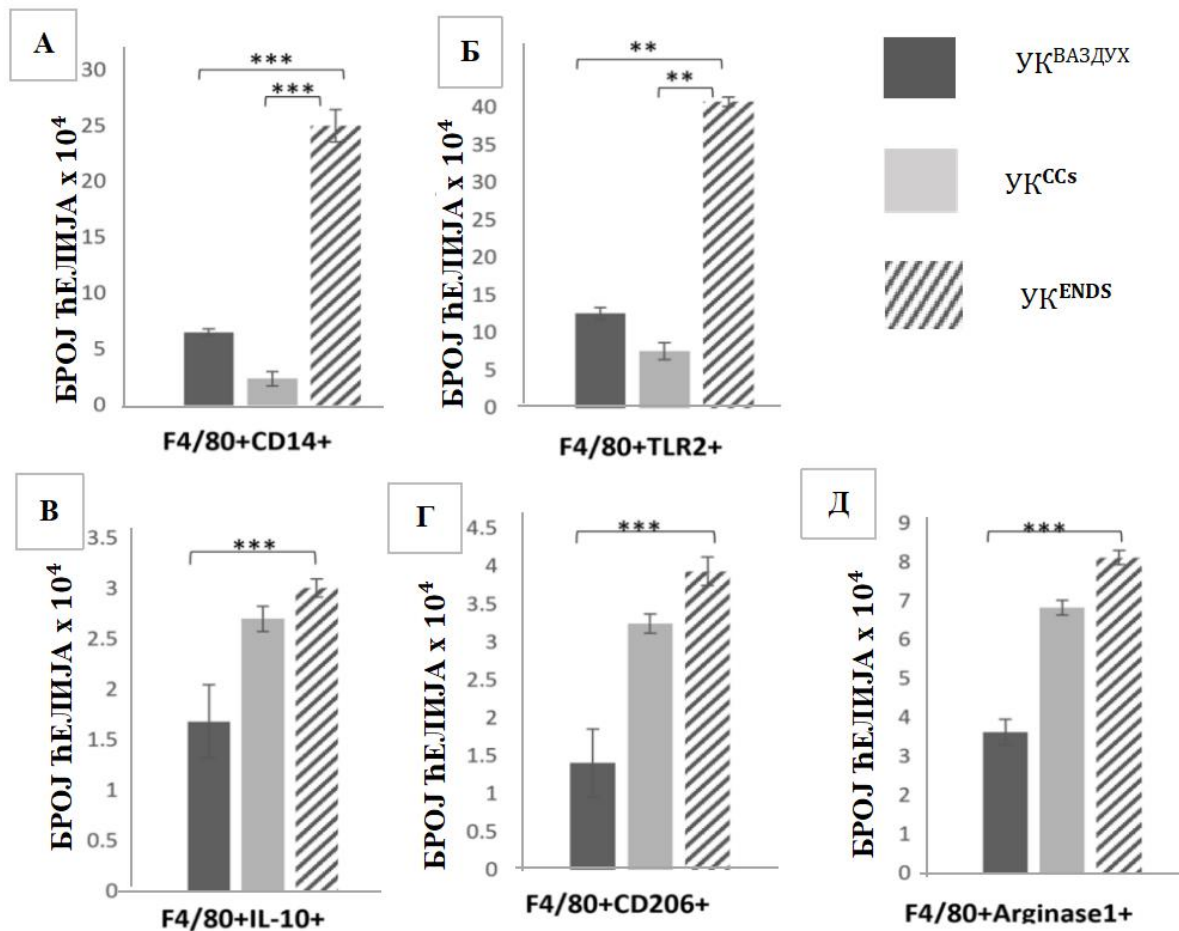
Фигура 45. Повећано присуство цитокина IL-1 β (А), IL-6 (Б), IL-17 (Г), TNF α (Д), IFN γ (Ђ) и IL-12 (Е) детектовано је у серуму УК^{ENDS} мишева. Са друге стране, код УК^{CCs} детектоване су најниже концентрације свих испитиваних цитокина (А-Е) у односу на УК^{BAZДУХ} и УК^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n = 8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001.

4.5.2. Континуирана изложеност аеросолима ENDS-а повећала је присуство имуносупресивних Т лимфоцита у ткиву колона док је изложеност CCs смањила инфилтрацију колона проинфламацијским Т ћелијама код мишева са улцерозним колитисом изазваним DSS-ом

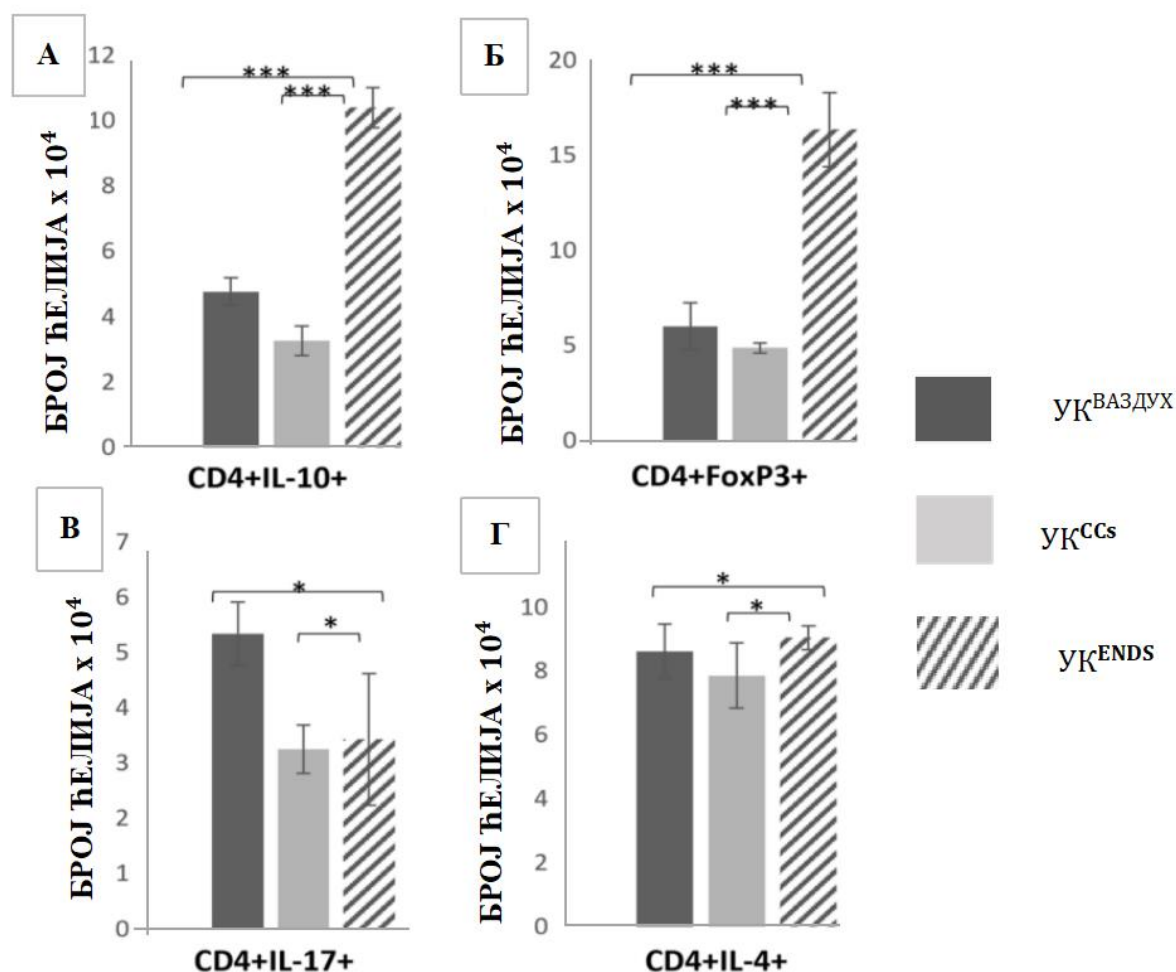
Излагање УК мишева ENDS-у побољшало је антиген-презентујући капацитет имунских ћелија повећањем присуства DC и макрофага. Из дебелог црева УК^{ENDS} мишева изолован је већи укупан број CD11c+DC које експримирају CD40 (Фигура 46А, $p<0.05$), I-A (Фигура 46Б, $p<0.001$) и CD86 (Фигура 46В, $p<0.05$) као и већи број F4/80+ макрофага који експримирају CD14 (Фигура 47, $p<0.001$) и TLR2 (Фигура 47Б, $p<0.01$) у односу на резултате мишева из групе УК^{BAZДУХ}. Додатно, укупан број DC (Фигура 46А-Г) и макрофага (Фигура 47А-Д) је било веће у групи УК^{ENDS} у односу на УК^{CCs} групу. У групи УК^{ENDS} забележено је и повећано присуство имуносупресивних CD11c+ DC које секретују IL-10 (Фигура 46Г, $p<0.01$) и алтернативно активираних F4/80+ макрофага који продукују IL-10 (Фигура 47В, $p<0.001$) и експримирају CD206 и Аргиназу-1 (Фигура 47Г-Д, $p<0.001$) у поређењу са контролном групом УК^{BAZДУХ}. Такође, у колону УК^{ENDS} мишева уочена је и повећана инфилтрација антиинфламацијских CD4+ (Фигура 48А-Г, $p<0.05$) и CD8+T (Фигура 49А-Г, $p<0.05$) регулаторних лимфоцита који секретују IL-10 и експримирају FoxP3 и таквом цитокинском продукцијом побољшавају зарастање оштећене слузокоже и промовишу опоравак оболелих животиња. Мањи укупан број инфламацијских Т лимфоцита инфилтрираних у ткиво дебелог црева код УК^{CCs} мишева узроковао је боље преживљавање и клинички опоравак у односу на УК^{BAZДУХ}. Проинфламацијски CD4+ и CD8+ Т лимфоцити који производе IL-17 и IL-4 били су мање присутни у колону УК^{CCs} мишева у поређењу са мишевима из групе УК^{BAZДУХ} и УК^{ENDS}.



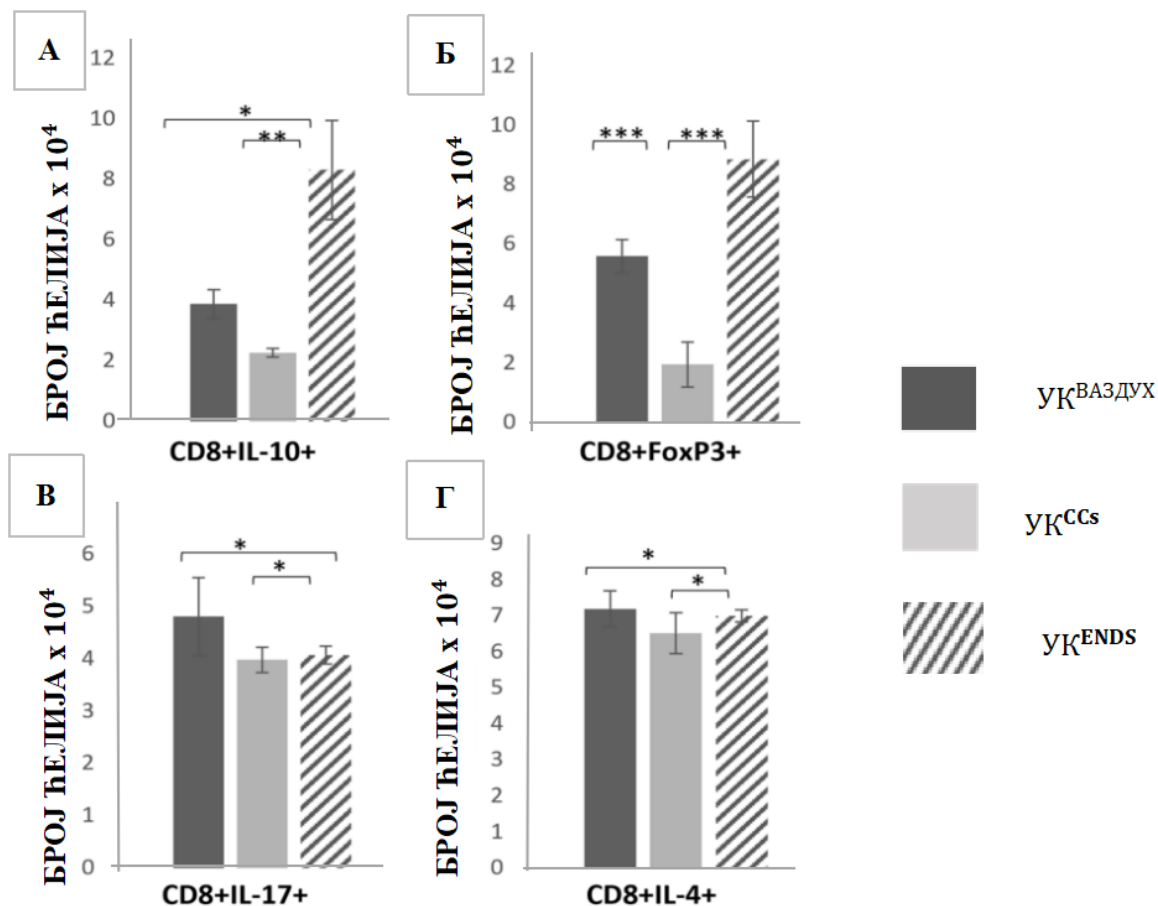
Фигура 46. Анализа проточне цитометрије показала је већи укупан број CD11c+ DC ћелија које експремирају CD40 (А), I-A (Б), CD86(В) и секретију имуносупресивни и профибротски цитокин IL-10 (Г). Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=8 мишева по групи; *p< 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



Фигура 47. Већи укупан број F4/80+ макрофага који експримирају CD14 (А) и TLR2 (Б), производе IL-10 (В) и експримирају CD206 (Г) и Аргиназу1 (Д) уочен је у колону мишева из групе УК^{ENDS} у односу на експерименталне животиње из група УК^{BAZДУХ} и УК^{CCs}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=8 мишева по групи; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



Фигура 48. Изложеност ENDS-у је узроковала експанзију имуносупресивних Т лимфоцита, док је третман CCs довео до смањења укупног броја проинфламацијских Т ћелија инфилтрираних у колон УК мишева. Већи укупан број CD4+ Т лимфоцита које производе IL-10 (А) и експримирају FoxP3 (Б) детектован је у колону мишева UK^{ENDS} групе у поређењу са UK^{BAZДУХ} и UK^{CCs}. Смањено присуство инфламацијских IL-17- (В) и IL-4-секретујућих (Г) CD4+ и уочено је у колону UK^{CCs} мишева у односу на UK^{BAZДУХ} и UK^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=8 мишева по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.



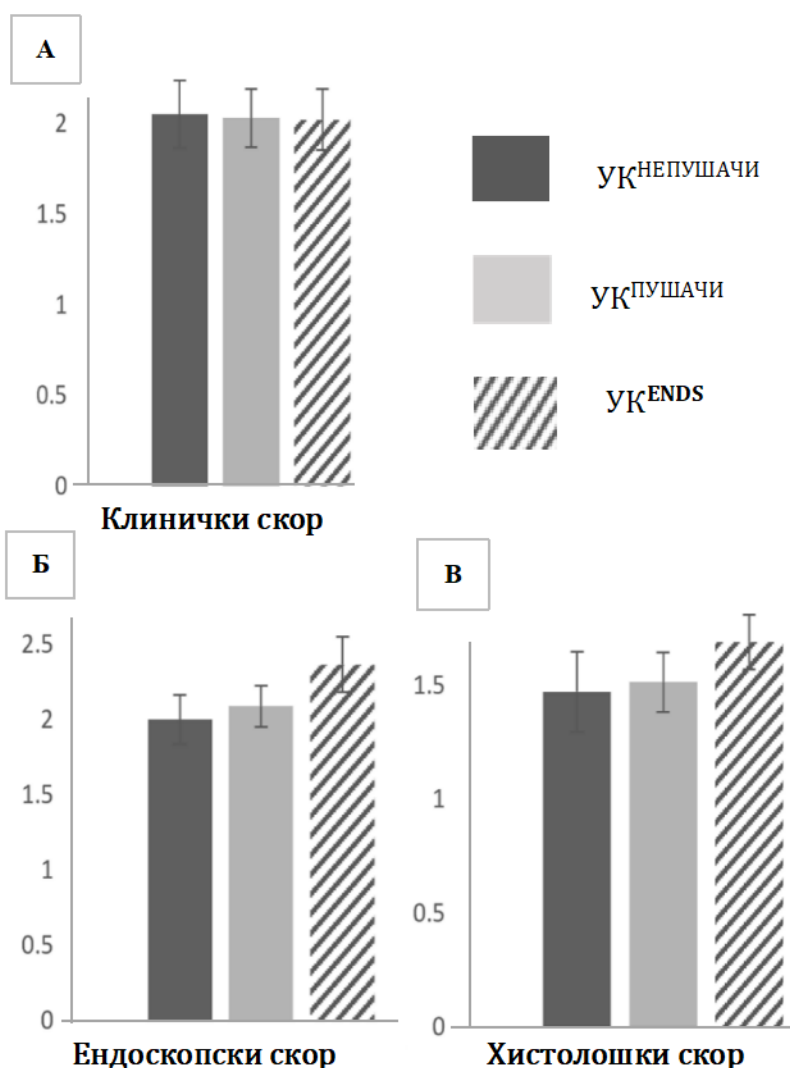
Фигура 49. Повећано присуство CTL CD8 +T лимфоцита које секретију IL-10 (А) и експримирају FoxP3 (Б) уочено је у колону мишева итложених аеросолу (група UK^{ENDS}) у поређењу са групама UK^{BAZDYX} и UK^{CCs}. Додатно, детектовано је и мањено присуство CD8+T лимфоцита који секретију проинфламацијске цитокине IL-17 (В) и IL-4 (Г) је у колону UK^{CCs} мишева у односу на мишеве из група UK^{BAZDYX} и UK^{ENDS}. Вредности су представљене као средња вредност ± SEM; n=8 мишева по групи; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.5.3. Дуготрајна конзумација CCs и ENDS-а није узроковала статистички значајне негативне ефекте на прогресију инфламације колона и зарастање слузокоже код пацијената оболелих од УК-а

Скале за праћење прогресије болести код пацијената оболелих од улцерозног колитиса, попут клиничког скорa (Фигура 50А), ендоскопског скорa (Фигура 50Б) и хистолошког скорa (Фигура 50В), нису показале статистички значајне разлике између пушача, ENDS корисника и непушача.

Дакле, континуирана употреба CCs и ENDS-а није испољила негативно дејство на инфламацију и зарастање слузокоже дебелог црева код УК пацијената (Слика 15). Међутим, детектована је значајна разлика у укупном броју леукоцита у крви између УК пацијената који користе CCs или ENDS у поређењу са УК пацијентима који су непушачи.

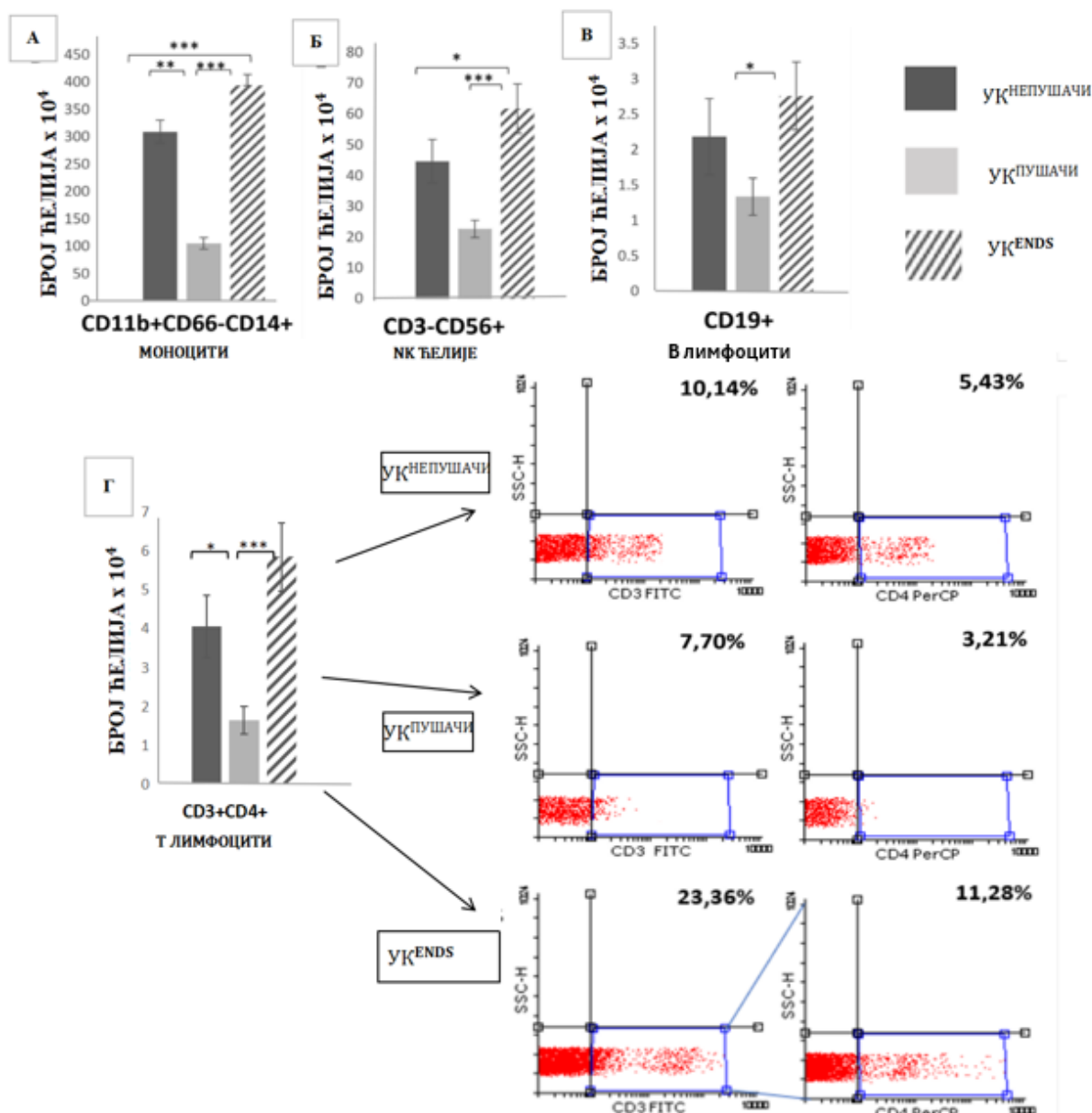
У крвним узорцима УК пацијената који конзумирају ENDS уочен је већи укупан број CD11b + CD66-CD14+ моноцита (Фигура 51А, $p < 0,001$), CD3-CD56+NK ћелија (Фигура 51Б, $p < 0,001$), CD19+ В лимфоцита (Фигура 51В, $p < 0,05$) и CD3+CD4+Т лимфоцита (Фигура 51Г, $p < 0,001$) у односу на УК пацијенте који не конзумирају дуванске производе. Са друге стране, укупан број моноцита (Фигура 51А, $p < 0,001$) и Т лимфоцита (Фигура 51Г, $p < 0,001$) у крви непушача је био већи у односу на пушаче оболеле од УК-а.



Фигура 50. Дуготрајна изложеност CCs и ENDS-у није испољила негативне ефекте на погресију болести и зарастање оштећене слузокоже колона код УК пацијената. Није уочена статистички значајна разлика између клиничког (А), ендоскопског (Б) и хистолошког (В) скорa код УК пацијената различитог пушачког статуса. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; $n = 77$ (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



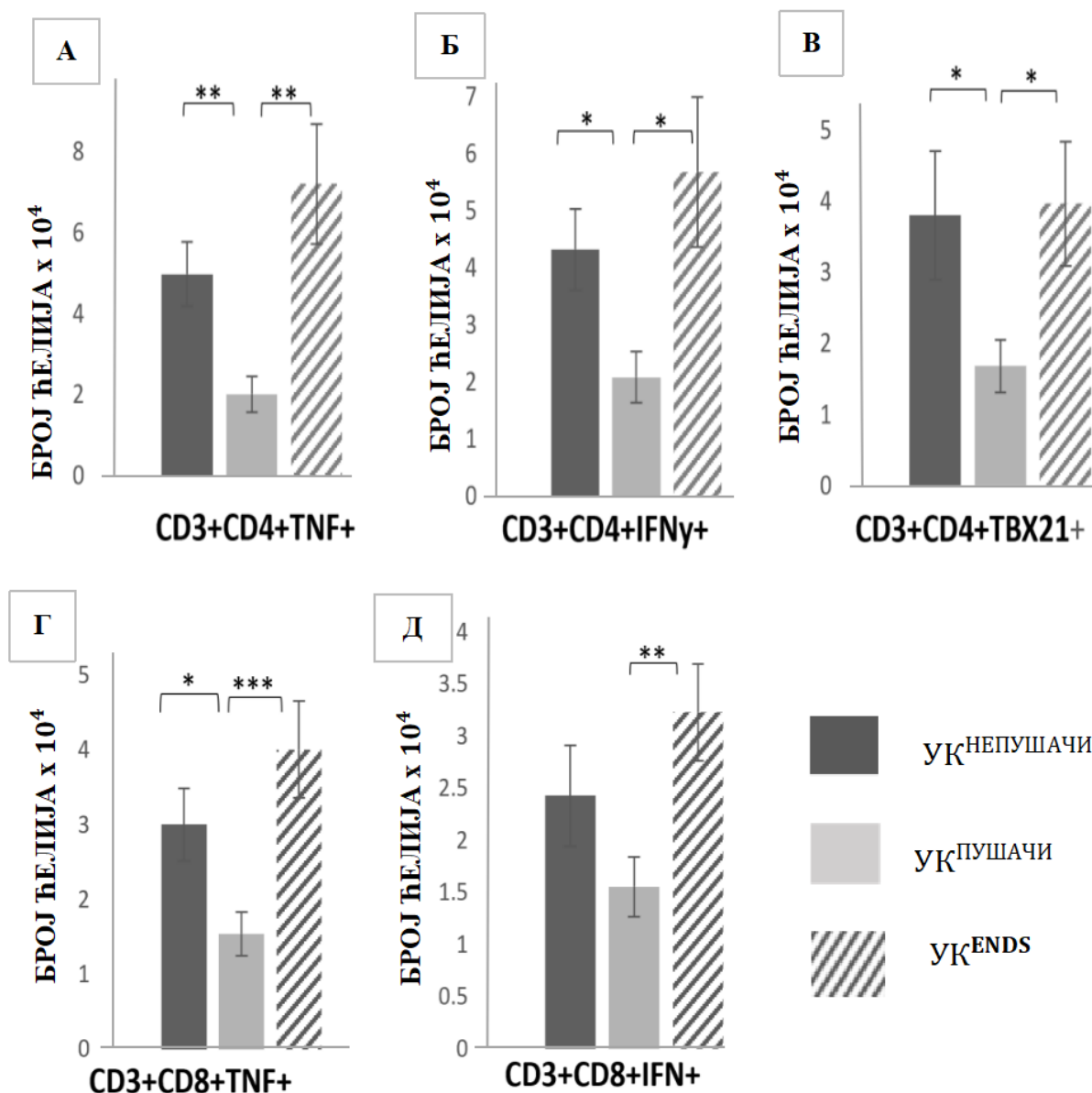
Слика 15. Дуготрајна изложеност CCs и ENDS-у није испољила негативне ефекте на прогресију болести и зарастање оштећене слузокоже колоне код УК пацијената. Репрезентативне ендоскопске фотографије пацијената из група непушача, CCs И ENDS.



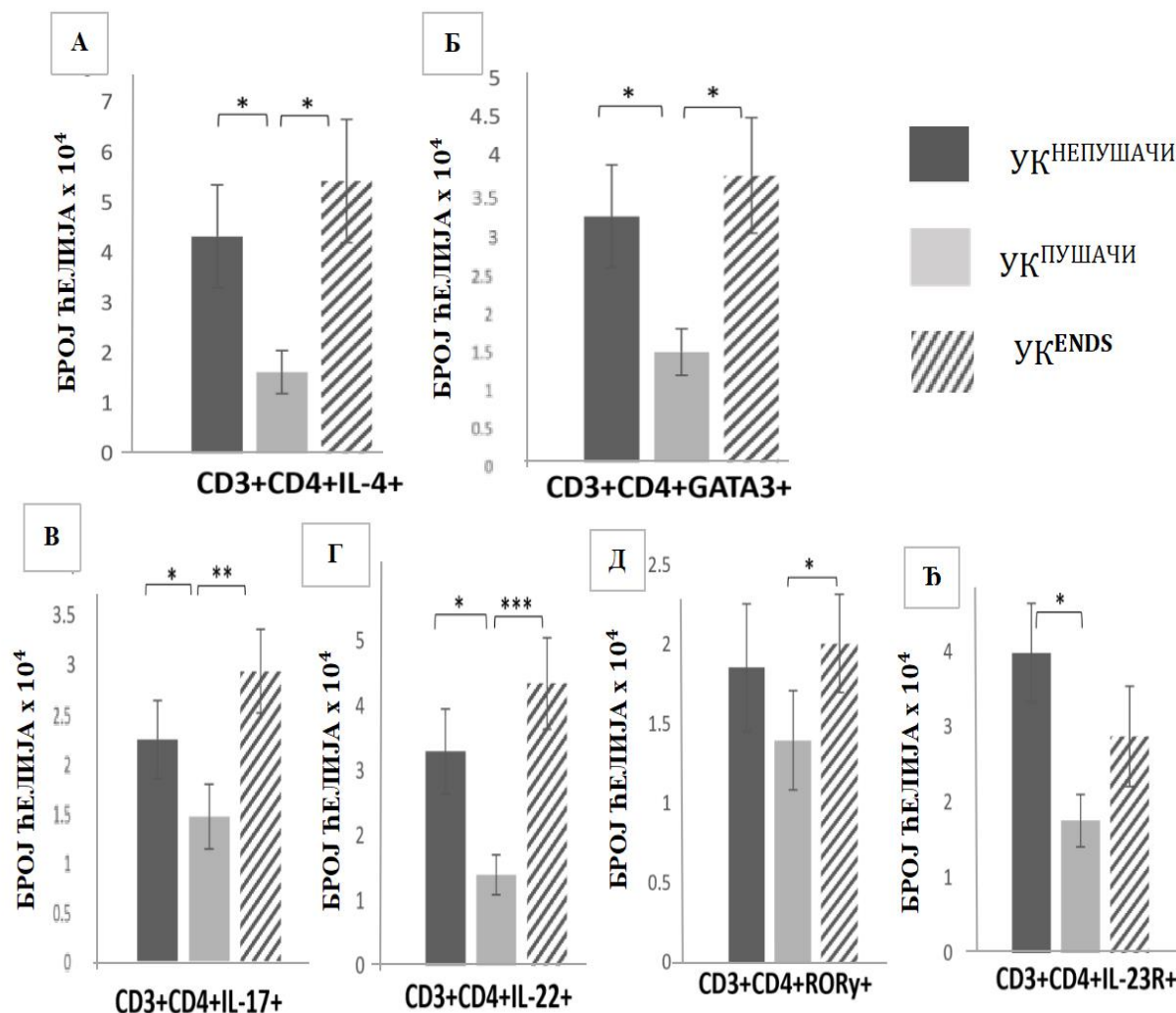
Фигура 51. Анализа проточне цитометрије показала је значајно већи укупан број CD11b+CD66-CD14+ моноцита (А), CD3-CD56+NK ћелија (Б), CD19+ В лимфоцита (В) и CD3+ CD4+Т лимфоцита (Г) у крви УК пацијената који користе CCs у поређењу са УК непушачима и ENDS корисницима. Репрезентативни дијаграми CD3+CD4+Т ћелија из крви УК пацијената из групе непушачи, пушача (CCs) и ENDS-корисника, Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 77 (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.

4.5.4. У крви УК пацијената који користе ENDS уочен је повећан укупан број имуносупресивних Т лимфоцита док је у крви УК пацијената који конзумирају CCs детектован смањен укупан број проинфламацијских Th1, Th2 и Th17 ћелија

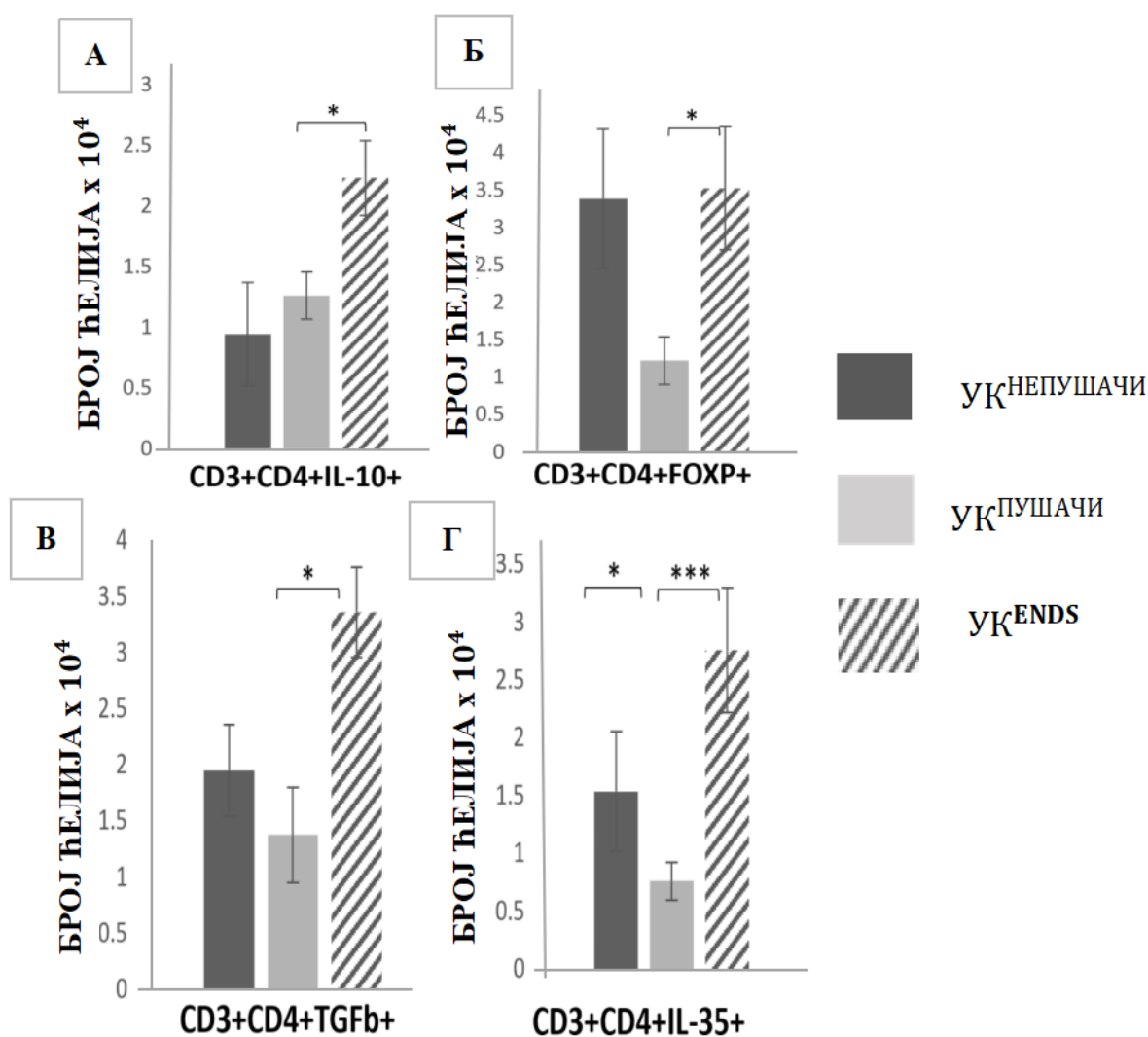
Значајно мањи укупни број CD3+CD4+Th1 лимфоцита које производе TNF- α и IFN- γ (Фигура 52А-Б) и експримирају Tbx21 (Фигура 52В), CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита који секретују TNF- α -и IFN- γ (Фигура 52Г-Д), CD3+CD4+Th2 које производе IL-4 и експримирају Gata3 (Фигура 53А-Б) и Th17 ћелије које производе IL-17, IL-22 и експримирају ROR γ T и IL-23R (Фигура 53В-Ђ) детектован је у периферној крви УК пацијената који користе CCs у односу на УК непушаче. Поред смањеног присуства проинфламацијских ћелија код УК пацијената који користе ENDS, детектован је и повећан број CD3+CD4+Treg ћелија које производе IL-10, експримирају FoxP3, и секретују TGF- β и IL-35 (Фигура 54А-Г). Цитокин IL-35 игра кључну антиинфламацијску улогу у успорењу УК прогресије и испољава заштитну улогу у зарастању слузокоже оштећених делова колона, тако да значајно повећан број IL-35-продукујућих Т ћелија говори о потенцијалу ENDS-а да подстиче стварање антиинфламацијске микросредине узрокујући имуносупресију у патогенези УК која побољшава зарастање улцерација и убрзава опоравак. Додатно, анализом NK ћелија изолованих из крви УК пацијената, уочено је смањено присуство проинфламацијских CD3-CD56+ NK ћелија које секретују TNF- α и IFN- γ (Фигура 55А-Б) код ENDS корисника у поређењу са пацијентима из групе пушача (CCs).



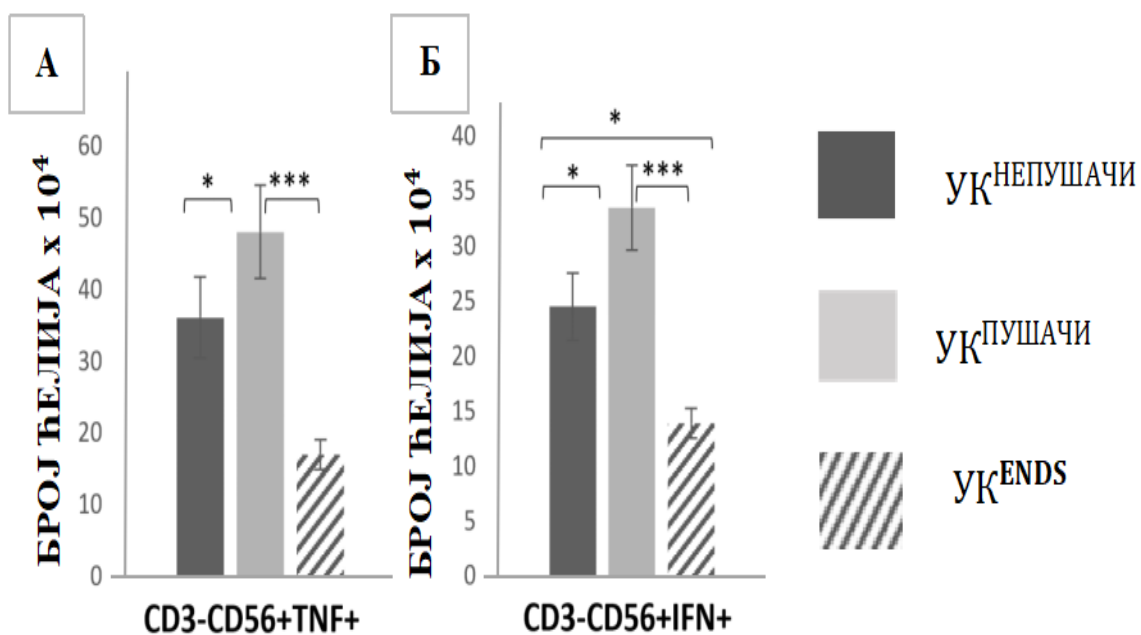
Фигура 52. Конзумација ENDS-а је индуковала експанзију имуносупресивних Т лимфоцита у крви УК пацијената, док је примена CCs инхибирала активацију и пролиферацију проинфламацијских Т ћелија у крви УК пацијената. Анализа проточне цитометрије показала је смањење броја CD3+CD4+Th1 ћелија које производе TNF- α (А) и IFN- γ (Б) и експримирају Tbx21 (В) и CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита који секретују TNF- α (Г) и IFN- γ (Д) у крви УК пушача у поређењу са УК^{непушачима} и УК^{ENDS корисницима}. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 77 (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.



Фигура 53. Повећан број Th2 ћелија које секретију IL-4 (А) и експримирају Gata3 (Б) и Th17 ћелија које производе IL-17 (В) и IL-22 (Г) и експримирају ROR γ T (Д) и IL-23R (Ђ) детектован је у крвним узорцима УК пушача у односу на резултате пацијената из група УК непушача и УК^{ENDS}корисника. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 77 (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.



Фигура 54. Повећано присуство имуносупресивних CD3+CD4+Т ћелија које производе IL-10 (А), експримирају FoxP3 (Б), секретију TGF- β (В) и IL-35 (Г) детектовано је у крви УК пацијената из групе ENDS-а у односу на резултате УК пацијената из група непушача и пушаче. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n= 77 (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.



Фигура 55. Смањено присуство CD3-CD56+NK ћелија које продукују TNF- α (А) и IFN- γ (Б) детектовано је у крви УК пацијената из групе ENDS-а у односу на УК непушаче и УК пушаче. Вредности су представљене као средња вредност $\pm$ SEM; n=77 (УК непушачи=20, УК корисници CCs=34, УК корисници ENDS-a=22); *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.

5. ДИСКУСИЈА

Континуирана употреба CCs изазива промене у фенотипу и функцији имуних ћелија, отварајући пут за развој и прогресију хроничних инфламаторних плућних болести (132). Дувански дим садржи неколико хиљада токсичних супстанци које могу да промовишу секрецију проинфламацијских цитокина у имунским ћелијама, што последично узрокује деструкцију ткива и органа (227). Негативни ефекти конзумације CCs потичу од токсина, попут катрана, угљен-моноксид (CO), 1,3-бутадиена, бутадиен, етилен оксида и акрилонитрила садржаних у дуванском диму генерисаног сагоревањем дувана. Процес загревања на којем се заснива употреба ENDS-а, а који се одвија на знатно нижим температурама него сагоревање дувана, резултира стварањем аеросола другачијег хемијског састава. У аеросолу ENDS-а нема катрана а ниво CO износи свега 1% у односу на заступљеност у дуванском диму (228-229). Изостанак ових једињења у аеросолу би могао објаснити мање штетне ефекте узроковане ENDS-ом у односу на ефекте дуванског дима CCs који их садржи у значајно већим концентрацијама (228).

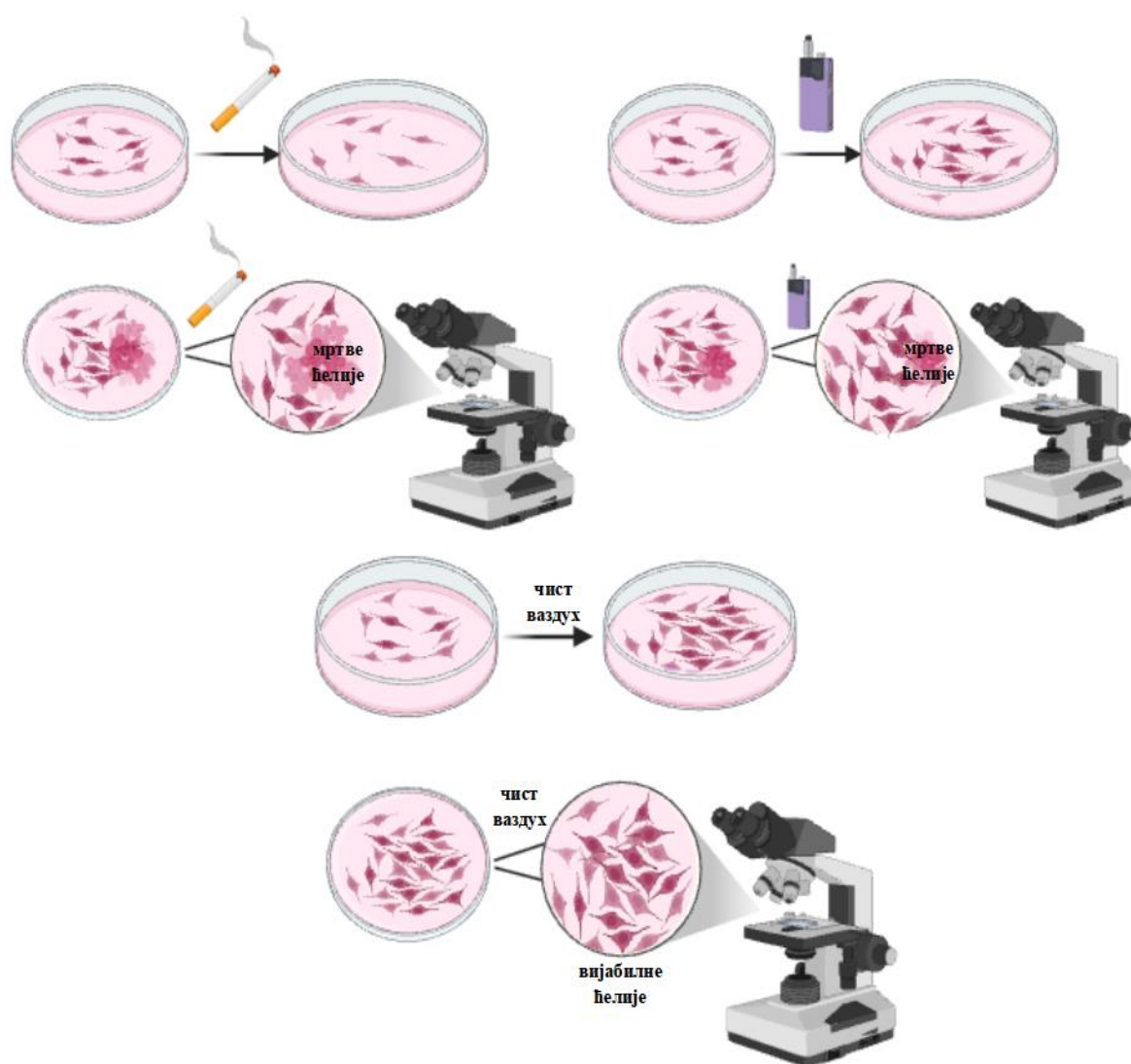
5.1. Ефекти CCs и ENDS-а на мезенхималне матичне ћелије периодонталног лигамента

Употреба CCs има значајан ефекат на здравље пародонта. PDL-MSCs су кључни елемент у процесу регенерације оштећеног пародонцијума захваљујући јединственом капацитету за самообнављање и диференцијацију. Када дође до повреде или оштећења пародонта, PDL-MSCs мигрирају ка месту повреде и диференцирају се у одговарајуће ћелије попут остеобласта, цементабласта, одонтобласта и хондроцита, а потом секретују различите цитокине и факторе раста који покрећу процес регенерације и репарације оштећеног ткива (117, 230). PDL-MSCs, захваљујући свом имуномодулаторном капацитету, могу да секретују цитокине попут TGF- β и IL-10 који покрећу имуносупресију и тако ублажавају негативне ефекте инфламације узроковане повредом. Имуносупресија омогућава стварање повољног окружења за репарацију пародонта и побољшава здравље оралне дупље (231).

Наше истраживање је прво показало ефекте CCs и ENDS-а на нивоу пародонталног ткива. Резултати су показали да CCs значајно угрожавају регенеративни потенцијал PDL-MSCs тако што негативно утичу на вијабилност, пролиферацију и имуномодулаторна својства. Узрок ових ефеката највероватније лежи у саставу дуванског дима CCs. Токсичне супстанце попут 1,3-бутадиена, етилен оксида и акрилонитрила ометају синтезу ДНК молекула тако што промовишу инциденцу великих делеција у гену хипоксантин-гванин-фосфорибозилтрансферазе (енгл. *Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase*, HPRT) што последично угрожава ћелијски циклус ћелија (232). Додатно, изложеност CCs узрокује промену фенотипа PDL-MSCs и преко повећане секреције TNF- α и IFN- γ промовишу Th1 и Th17 проинфламацијски имунски одговор који доводи до прогресије оштећења пародонталног ткива. Вијабилност и пролиферација PDL-MSCs били су смањени и након излагања аеросолу ENDS-а, мада у мањем степену у поређењу са CCs.

Такође, ENDS је узроковао усмеравање фенотипа ка имуносупресији која омогућава сузбијање негативних ефеката инфламације посредоване Th1 и Th17 ћелијама у усној дупљи и спречава прогресију пародонтитиса (233).

Дакле, PDL-MSCs изложене дуванском диму CCs и аеросолу ENDS-а поседовале су мањи капацитет вијабилности и пролиферације у поређењу са контролним, нетретираним, ваздуху изложеним ћелијама (Слика 16.). Међутим, штетни ефекти на нивоу вијабилности и пролиферације PDL-MSCs узроковани излагањем ћелија аеросолу ENDS-а су били слабијег интензитета у односу на ефекте дуванског дима CCs. С обзиром на то да је заступљеност штетних једињења 1,3-бутадиена, етилен оксида и акрилонитрила у аеросолу ENDS-а биле ниже за 99,3-99,9% у поређењу са дуванским димом CCs (228), ова разлика у концентрацијама може бити узрочник различитих ефеката ових дуванских производа на вијабилност и пролиферацију PDL-MSCs.



Слика 16. Компарација ефеката чистог ваздуха, CCs и ENDS-а на вијабилност и пролиферацију матичних ћелија. Креирано помоћу BioRender.com.

Наши резултати су детектовали и различите ефекте CCs и ENDS-а на секреторни потенцијал PDL-MSCs и последично на њихов имуномодулаторни капацитет. Наиме, у пародонту захваћеном упалом или инфекцијом, PDL-MSCs преко свог секрета могу да појачају или смање инфламацију посредовану имунским ћелијама (234). Током иницијалног стадијума имунског одговора у борби против патогена у оралној дупљи, PDL-MSCs развијају проинфламацијски фенотип и преко продукције великих количина TNF- α и IFN- γ промовишу антиген-презентујући капацитет неутрофила и макрофага, потом експанзију Th1 и Th17 ћелија у лимфним чворовима и покрећу интензиван антимикуробни одговор посредован CD4⁺ и CD8⁺T ћелијама који омогућава успешну елиминацију патогена (111,235). Са друге стране, у стадијуму резолуције након ефикасног уклањања инфективних агенаса, PDL-MSCs развијају имуносупресивни фенотип и преко секреције IL-10 и TGF- β покрећу експанзију толерогених DC, регулаторних CD4⁺FoxP3⁺T ћелија и M2 поларизованих, алтернативно активираних, макрофага. Експанзија ових имунских ћелија омогућава супресију развијене инфламације, поновно успостављање ткивне хомеостазе и покретање репарације и регенерације (111,235).

Дувански дим, услед присуства катрана и CO, узрокује ослобађање ROS и активацију MAPK сигналног пута у имунским ћелијама, резултујући снажним оксидативним стресом који је праћен обимном секрецијом проинфламацијских цитокина. У складу са тим, CCs-индуковано стварање проинфламацијског фенотипа PDL-MSCs највероватније потиче од MAPK-активације узроковане катраном и CO. Додатно, секреција TNF- α и IFN- γ покреће експресију молекула MHC класе II на PDL-MSCs чиме се јача њихов капацитет за активацију Th1 и Th17 ћелија одговорних за прогресију пародонтитиса (235,236). Потом, Th1 ћелије активирају макрофаге и појачавају инфламацију што погоршава ресорпцију костију и додатно доприноси оштећењу ткива (236). Инфламација је додатно подстакнута Th17 лимфоцитима који секрецијом IL-17, покрећу неутрофилну регрутацију, накнадну секрецију различитих инфламацијских медијатора који појачавају активност остеокласта и убрзавају деструкцију алвеоларне кости (236). Дакле, CCs-покренут проинфламацијски фенотип PDL-MSCs преко Th1 и Th17-посредованог имунског одговора узрокује погоршање оштећеног пародонталног ткива. Међутим, изложеност ENDS-у промовише имуносупресивни фенотип PDL-MSCs. Имуносупресија, посредована CD4⁺ и CD8⁺ T ћелијама које секретују IL-10 и TGF- β , инхибира NF- κ B сигнални пута у T лимфоцитима, додатно инхибира секрецију проинфламацијских цитокина и последично супримира интензитет текуће инфламације (111).

Неопходно је нагласити да су наши резултати добијени у *in vitro* истраживању и да је потребно спровести анималне или хумане студије које би испитале и упоредили ефекте дуванског дима CCs и аеросола ENDS-а на функцију и фенотип PDL-MSCs *in vivo*.

5.2. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију

Системски инфламацијски одговор је кључни фактор погоршања и прогресије бројних хроничних инфламацијских болести попут ХОБП, ДМ и УК (124,221,222,226).

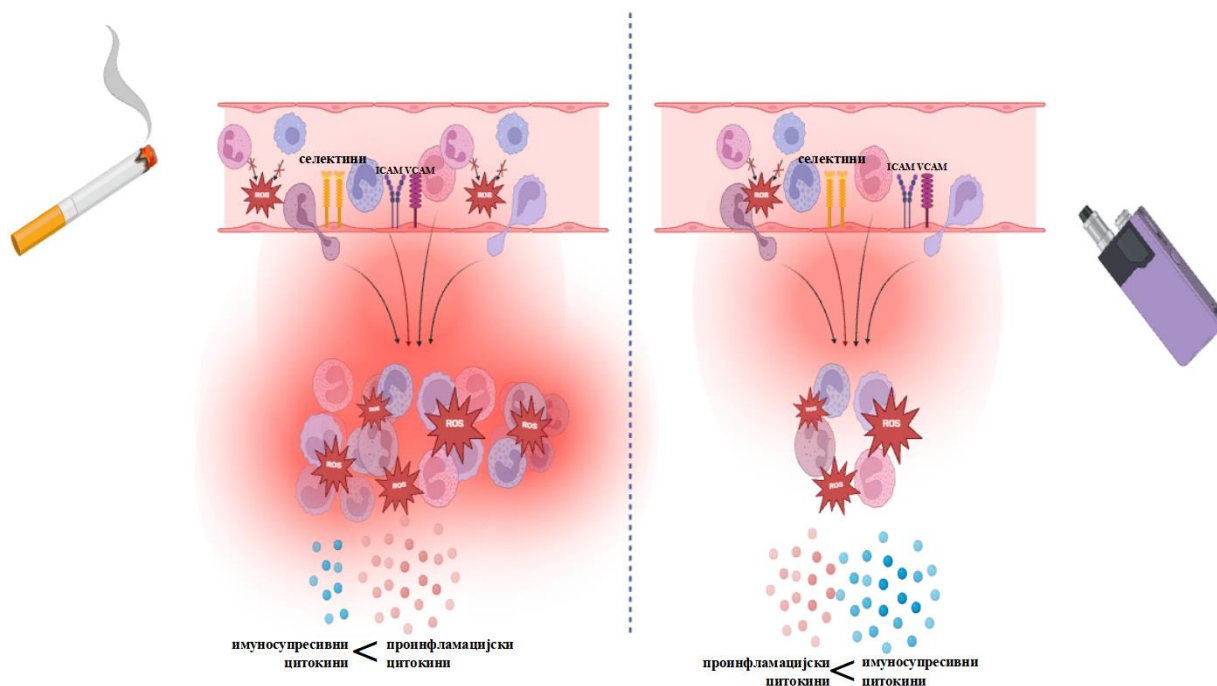
Код ХОБП пацијената, интензивна системска инфламација може допринети сужењу дисајних путева узрокујући тешке акутне егзацербације које могу бити смртоносне (237).

Код ДМ пацијената, хронична системска инфламација може појачати инсулинску резистенцију и допринети већем ризику од макроваскуларних (мождани и срчани удар) и микроваскуларних (ретинопатија, нефропатија) компликација (222). Прогресивна системска инфламација код пацијената оболелих од УК-а може оштетити интегритет зида црева, омогућити продор штетних супстанци у крвоток и повећати ризик од перфорације (226).

Резултати нашег истраживања су показали да дуготрајна конзумација CCs или ENDS-а узрокује модулацију цитокинске секреције у циркулишућим имунским ћелијама чиме се мења системски инфламацијски одговор код ХОБП, ДМ И УК пацијената који може значајно допринети прогресији ових болести.

Различити ефекти изазвани дуванским димом CCs и аеросолом ENDS-а највероватније потичу од другачијег начина обраде дувана. Док конзумација CCs подразумева високе температуре неопходне за сагоревање дувана и стварање дуванског дима, употреба ENDS-а захтева загревање на знатно нижим температурама (172). Различити начини обраде дувана доводе до различитог састава дуванског дима и аеросола. За разлику од дуванског дима CCs, аеросол ENDS-а не садржи катран, а концентрација CO је свега 1% (32). Значајно веће количине катрана и CO присутне у дуванском диму CCs, а не у ENDS-аеросолу, доводе до различитих промена фенотипа и функције имунских ћелија, односно проурокују различите ефекте на активацију имунских ћелија, на хемотаксу и миграцију у оштећена ткива и на ефекторске функције активираних леукоцита (172). Идентификација срединских фактора који могу модулирати, појачати или ублажити, системски инфламацијски одговор код пацијената са хроничним инфламацијским болестима попут ХОБП, ДМ и УК, може бити круцијална у лечењу, превенцији погоршања и побољшању исхода ових болести.

Први смо доказали да континуирано излагање ENDS-у, модулира фенотип имунских ћелија одговорних за системски инфламацијски одговор. Међутим, важно је нагласити да су резултати нашег истраживања детектовали и постојање разлика у ефектима ENDS-а и CCs (Слика 17.).



Слика 17. Дувански дим CCs интензивније промовише системски инфламацијски одговор у односу на аеросол ENDS-а. Креирано помоћу BioRender.com.

5.3. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у ХОБП

Дувански дим CCs изазивајући оксидативни стрес у алвеоларним епителним ћелијама узрокују ослобађање алармина и DAMP-а (238). С друге стране, аеросол ENDS-а садржи знатно мање концентрације CO и катрана тако да у блажем степену изазива ослобађање ROS и оштећење алвеоларних епителних ћелија посредовано DAMP-активацијом у односу на CCs. Плућне DC хватају инфламацијске медијаторе попут DAMP и алармина помоћу TLR2 и покрећу масован инфламацијски одговор у плућима посредован TLR2/NF-κB/MAPK сигналном каскадом и интензивном активацијом Th1 и Th17 лимфоцита (239). Код ХОБП пацијената кључни фактор за погоршање интензитета инфламације је оштећење алвеоларних епиталних ћелија које активирају плућне DC и, након везивања за TLR-2, појачавају њихове антиген-презентујуће способности преко повећане експресије МНС протеина и костимулаторних молекула (148,240).

Активиране DC помоћу повећане експресије I-A, CD86 и CD40 презентују антигене наивним CD4⁺ и CD8⁺Т лимфоцитима и преко секреције цитокина IL-12 и IL-23 подстичу њихову активацију, пролиферацију и поларизацију у смеру стварања Th1 и Th17 ћелија (241,242). Додатно, DC се преко својих костимулаторних молекула CD86 и CD40 везују за одговарајуће лиганде CD28 и CD40L на Т ћелијама и тако покрећу клонску експанзију активираних Т лимфоцита (137).

Дакле, прогресија оштећења дисајних путева детектована код експерименталних ХОБП^{CCs} мишева узрокована је потврђеним повећаним бројем активираних DC ћелија које експримирају I-A/CD86/CD40 и секретују IL-12/IL-23- и последично узрокују повећано присуство Th1, Th2 и Th17 ћелија у оштећеним плућима у односу на резултате из групе ХОБП^{ENDS}. Супротно томе, у ХОБП^{ENDS} групи је детектован слабији антиген-презентујући капацитет плућних DC који је резултирао слабијом активацијом Т лимфоцита и последично нижим нивоом цитокина IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-23 у односу на ХОБП^{CCs}. У хуманом моделу је у сличном маневру код ХОБП пацијената који су корисници ENDS-а уочено смањено присуство IFN- γ -продукујућих Th1, IL-4-продукујућих Th2 и IL-17-продукујућих Th17 ћелија у односу на цитокински профил ХОБП пацијената из групе пушача.

Континуирана изложеност дуванском диму у бронхијалним епителним ћелијама покреће MyD88-зависну интрацелуларну каскаду која промовише масовну активацију транскрипционих фактора као што су NF- κ B, активаторски протеин-1 (енгл. *Activator protein-1*, AP1) и регулаторног фактора интерферона (енгл. *Interferon regulatory factors*, IRF) који детерминишу експресију гена одговорних са секрецију хемокина, адхезионих молекула и проинфламацијских цитокина попут TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-1 β који промовишу регрутацију леукоцита у оштећена плућа (222). Бронхијалне епителне ћелије, као одговор на дувански дим, секретују IL-6 који мења фенотип ендотелних ћелија плућа тако што повећава експресију селектина Е и П и адхезионих молекула попут VCAM-1 и ICAM-1 који омогућавају ендотелну адхезију леукоцита и последично индукују инфилтрацију неутрофила и моноцита у плућно ткиво (130,243). Међутим, када су бронхијалне епителне ћелије изложене аеросолу ENDS-а, долази до слабије секреције IL-6 и последично до слабије регрутације фагоцита у односу на ефекте CCs (244).

Хронична изложеност дуванском диму узрокује повећану експресију CD14 и TLR2 на површини алвеоларних макрофага и неутрофила која активира NLRP3 инфламазом и промовише секрецију цитокина IL-1 β и TNF- α . Ови проинфламацијски цитокини потом повећавају експресију селектина на плућном ендотелу и појачавају леукоцитну инфилтрацију ка жаришту инфламације (130).

Дакле, ENDS процесом загревања дувана узрокује инфилтрацију плућа мањим бројем леукоцита у односу на сагоревање дувана у процесу пушења. Наши резултати су детектовали већи укупан број циркулујућих неутрофила, лимфоцита и моноцита код ХОБП пацијената из групе пушача у односу на ХОБП пацијене који су корисници ENDS-а. Повећан број имунских ћелија које секретују TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-1 β и IL-6 и повећан ниво ових цитокина детектован у крви ХОБП пацијената из групе пушача у односу на групу ENDS корисника узрокован је највероватније већим концентрацијама CO и катрана. Са друге стране, у анималном моделу је код ХОБП^{CCs} уочена виша концентрација IL-6 која је праћена инфилтрацијом и повећаним бројем регрутованих F4/80+моноцита/макрофага и CD45+Ly6G/C неутрофила у плућном ткиву експерименталних животиња у односу на групу ХОБП^{ENDS}. Додатно, дуготрајна изложеност дуванском диму CCs промовише активацију инфламазома NLRP3 и секрецију проинфламацијских цитокина у фагоцитима инфилтрираним у плућима мишева (143,151).

Међутим, ENDS поседује слабији потенцијал да изазове активацију NK, NKT, Th1 и Th17 ћелија посредством антиген-презентујућих DC и активацију инфламазома у плућним макрофагима и неутрофилима што заједно доприноси мањем степену оштећења ткива у плућима захваћеним инфламацијом. Такође, ENDS је слабијим интензитетом активирао NLRP3 инфламазома у неутрофилима и макрофагима што је последично довело до нижег нивоа IL-1 β и TNF- α и слабије регрутације леукоцита у плућа експерименталних животиња из групе ХОБП^{ENDS} у поређењу са резултатима из групе ХОБП^{CCs} (245,246). У складу са тим, мањи укупан број фагоцита (неутрофила и макрофага) који продукују IL-1 β и TNF- α уочен је у крви ХОБП пацијената који користе ENDS у односу на пацијенте из групе пушача.

У почетној фази деструкције алвеоларних епителних ћелија узроковане дуванским димом важну улогу имају проинфламацијске NK и NKT ћелије које продукцијом алвеотоксичног TNF- α промовишу дисфункцију плућа (247). У плућима мишева из групе ХОБП^{ENDS} уочен је мањи број NK и NKT ћелија које секретују TNF- α у односу на ХОБП^{CCs} мишеве, указујући на слабији капацитет ENDS-а да узрокује озбиљно оштећење плућа посредовано имунским ћелијама. Међутим, иако је CCs узроковало масивнију деструкцију и респираторну дисфункцију, конзумација ENDS-а је показала слабије разорне ефекте на нивоу алвеоларних епителних ћелија услед инфилтрације имунских ћелија и умерену дисфункцију у анималном моделу.

Након дуготрајног излагања дуванском диму, плућне DC поред тога што посредством секреције IL-12, IL-1 β и IL-23 активирају наивне Т лимфоците, преко повећане продукције TNF- α и IL-1 β појачавају инфилтрацију ефекторских Т ћелија (248). Потом повећана секреција кључних цитокина системске инфламације TNF- α , IL-1 β и IL-6 доводи до интензивне експресије адхезионих молекула на ендотелним ћелијама и покреће масивну регрутацију имунских ћелија у оштећена плућа (249). Додатно, цитокини попут TNF- α и IL-1 β активирају NF- κ B сигнални пут у регрутованим Th17 лимфоцитима и појачавају секрецију IL-17 чиме се последично промовише синтеза ROS, матриксних металопроотеиназа (енгл. *Matrix metalloproteinases*, MMP) и еластаза у неутрофилима. На овај начин континуирана употреба CCs узрокује деструкцију и ремоделирање плућног епитела ХОБП пацијената (250). Плућне DC секрецијом IL-1 β и IL-23 активирају транскрипционе факторе STAT-3 и ROR γ T у наивним Т лимфоцитима и покрећу поларизацију у смеру Th17, а секрецијом IL-12 активирају транскрипционе факторе T-bet и STAT-1 и индукују генерисање Th1 ћелија које преко IFN- γ изазивају озбиљно оштећење плућног ткива. Са друге стране, наши резултати су детектовали слабији капацитет ENDS-а, у односу на CCs, да узрокује активацију наивних, инфилтрацију ефекторских Т ћелија и продукцију Th1 (IL-12, TNF- α) и Th17 (IL-1 β , IL-23) цитокина које потом узрокују регрутацију макрофага и неутрофила у оштећено плућно ткиво. Алвеоларни макрофаги након активације, обрађују и презентују антигене ефекторским Т ћелијама посредством молекула I-A. Додатно, алвеоларни макрофаги посредством CD40, CD86 и IL-12, омогућавају експанзију Th1 лимфоцита. Затим Th1 ћелије продукцијом IFN- γ подстичу алвеоларне макрофаге да секретују NO и бројне проинфламацијске цитокине који погоршавају инфламацију плућа (130). Додатно, континуирана изложеност CCs узрокује експанзију Th17 лимфоцита у плућима и крви ХОБП пацијената (251). Th17 секрецијом IL-17 промовишу активност iNOS и NLRP3 инфламазома резултујући већим концентрацијама алвеолотоксичног NO који узрокује озбиљнију респираторну дисфункцију (252).

Резултати наше анималне студије су показали да је интензивна респираторна дисфункција и оштећење плућа мишева који су континуирано изложени дуванском диму CCs узрокована регрутацијом проинфламацијских Th1 лимфоцитима који продукују IFN- γ и подстичу алвеоларне F4/80+ макрофаге да ослобађају IL-1 β , TNF- α , IL-12 и IL-23 и додатно деструишу плућно ткиво. С друге стране, код мишева из групе ХОБП^{ENDS} детектовано је смањено присуство проинфламацијских Th1 ћелија и макрофага, што је у складу са нижим капацитетом ENDS-а да промовише активацију алвеоларних макрофага посредством Th1 лимфоцита. Укупан број Th17 лимфоцита, концентрација цитокина IL-17 и активност iNOS су били значајно мањи код ХОБП^{ENDS} мишева него код мишева из групе ХОБП^{CCs}, што последично доприноси мање тешкој дисфункцији и деструкцији плућа.

Дувански дим такође повећава секрецију IL-13 који промовише лучење слузи из пехарстих ћелија чиме појачава опструкцију дисајних путева и повећава ризик од инфекција (253). Такође, IL-13 у повећаним концентрацијама промовише депоновање колагена, хипертрофију глатких мишића и фибротичне процесе чиме узрокује повећану инциденцу егзацербација болести код ХОБП пацијената који користе CCs. Са друге стране, употреба ENDS-а је узроковала слабију секрецију про-Th1 и про-Th17 цитокина и имunosупресивног TGF- β код ХОБП пацијената у односу на CCs. Дакле, континуирана употреба ENDS-а може испољити мање штетне ефекте на ХОБП пацијенте у поређењу са ефектима CCs, упркос значајном повећању инфилтрације имунских ћелија у оштећена плућа.

Наши резултати су показали да ENDS узрокује мањи степен инфламације и оштећења плућа у односу на CCs који потиче од мањег присуства DC које експримирају TLR-2, I-A, CD86, и CD40 и тиме слабијом активацијом сигналне каскаде која доводи до активирања Т ћелија, кључних ћелија у патогенези погоршања инфламације плућа (254,255). Наиме, Th1 ћелије посредством IFN- γ промовишу проинфламацијски фенотип алвеоларних макрофага, Th2 ћелије преко IL-4 промовишу мастоцитну секрецију проинфламацијских медијатора и Th17 ћелије преко IL-17 промовишу активирање инфламазома NLRP3 у фагоцитима инфилтрираним у оштећеним плућима (254).

Важан корак у развоју озбиљне респираторне деструкције је апоптоза алвеоларних епителних ћелија. Цитотоксичне ћелије попут CD8+CTL и CD56+NK ослобађају везикуле перфорина и гранзима који делују разарајуће на ткиво плућа и подстичу инфламацију (256). Сходно томе, у плућима ХОБП^{ENDS} мишева је детектовано мање присуство CD8+CTL ћелија које продукују IFN- γ и IL-17 у односу на резултате мишева из групе ХОБП^{CCs}, а у крви ХОБП пацијената који су ENDS корисници уочене су ниже вредности CD8+CTL и CD56+NK ћелија које секретују TNF- α , IFN- γ и IL-17 у поређењу са ХОБП пушачима.

Цитокин IL-17 који секретују Т и NK ћелије активира p38 MAPK киназу у инфилтрираним моноцитима који подстиче секрецију TGF- β који има кључну улогу у развоју фиброзе преко епител-мезенхим транзиције, диференцијације фибробласта у миофибробласте и таложења колагена у плучима захваћеним упалом (257,258).

Дуготрајна употреба ENDS-а је узроковала експанзију регулаторних FOXP3-експримирајућих и IL-10-продукујућих Т лимфоцита, NK и NKT ћелија у плућима ХОБП^{ENDS} мишева у односу на ХОБП^{CCs}. Цитокин IL-10 промовише поларизацију M2 макрофага преко алтернативне активације и супримира капацитет плућних DC да презентују антигене Т лимфоцитима (259).

Додатно, IL-10 делује имуносупресивно, односно смањује секрецију проинфламацијских цитокина у Th1, Th2 и Th17 ћелијама, доприносећи смањењу Т ћелијама посредоване инфламације (260). Међутим, имуносупресија покренута аеросолом ENDS-а може нарушити надзор имунског система над инфицираним и малигно-трансформисаним ћелијама у плућима. С обзиром на то да су инфекције и малигнитети учесталији код пушача, код којих постоји опструкција дисајних путева изазвана дуванским димом, у односу на пацијенте са оптималном респираторном функцијом (261), неопходно је детаљно испитати утицај вишегодишње конзумације ENDS-а на имуносупресију антимикробног и антитуморског имунског одговора у плућима.

Дакле, дувански дим CCs промовише стварање проинфламацијског фенотипа у лимфоцитима, неутрофилима и моноцитима ХОБП пацијената. Супротно ефектима CCs, аеросоли ENDS-а подстичу имуносупресивни фенотип имунских ћелија.

5.4. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у ДМ

Дувански дим CCs, преко токсина попут катрана и CO, оштећује ДНК бета ћелија панкреаса и узрокујући оксидативни стрес покреће инфламацију (224). Катран и CO индукују неутрофиле и макрофаге да секретују ROS, NO и проинфламацијске цитокине попут TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IL-23 који покрећу каспаза-зависну апоптозу бета ћелија панкреаса (139). Апоптоза промовише активност транскрипционог фактора NF- κ B и последично секрецију цитокина IL-1 β који везивањем за рецептор IL-1 повећава присуство адхезионих интегрина и Е и Р селектина на ендотелу чиме се омогућава инфлукс леукоцита и интензивирање инфламације у панкреасу (158,224). Наши резултати су детектовали повећано присуство имунских ћелија у слезини ДМ^{CCs} мишева него код мишева из групе ДМ^{ENDS}, и у крви ДМ пацијената из групе пушача у односу на ДМ пацијенте који су корисници ENDS-а.

Инфилтрација неутрофила и макрофага у панкреасна острвца праћена секрецијом проинфламацијских цитокина и производњом ROS и NO узрокује ослобађање алармина и DAMP који потом активирају панкреасне DC (154). Услед континуиране изложености дуванском диму, односно катрану и CO, панкреасне DC путем активације MAPK сигналног пута стимулишу експресију костимулаторних молекула и секрецију про-Th1 цитокина попут IL-12 и IL-18 и про-Th17 цитокина IL-1 β , IL-6 и IL-23 (139). Путем секреције ових медијатора инфламације, панкреасне DC узрокују активацију Th1, Th17, NK1/NK17 и NKT1/NKT17 ћелија које значајно доприносе дисфункцији и деструкцији панкреаса и развоју макроваскуларних и микроваскуларних компликација (139,154). Активирани Т, NK и NKT ћелије продукују поринфламацијске цитокине TNF- α , IFN- γ и IL-17 (154). Код мишева из групе ДМ^{CCs} уочен је снажнији антиген-презентујући капацитет DC и последично интензивнија активација Т и В лимфоцита, NK и NKT ћелија и секреција проинфламацијских цитокина у односу на ДМ^{ENDS} мишеве. У хуманом моделу је, по сличном принципу, детектован CCs-индукујућа масовна активација DC, Т, NK и NKT ћелија код ДМ пацијената која је у значајно нижој мери детектована код ДМ пацијената који су корисници ENDS-а. Повећано присуство Th1 и NKT1 проинфламацијских ћелија и цитокина узрокује прогресију оштећења панкреаса преко TNF- α и IFN- γ -посредоване активације транскрипционог фактора STAT-1 који стимулише синтезу каспазе-3, кључну проетазу у програмираној смрти бета ћелија панкреаса.

Са друге стране, Th17 и NKT17 проинфламацијске ћелије преко секреције IL-17, активирају инфламазом NLRP3 у нетрофилима и преко активације iNOS узрокују деструкцију панкреасних острваца већ оштећених дијабетесом. Приликом конформационих промена инфлазома NLRP3, долази до спајања са адапторским протеином ASC (енгл. *Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD*), при чему долази до формирања комплекса NLRP3-ASC који активира каспазу-1 (262). Каспаза-1 активира IL-1 β који омета инсулинску сигнатилазицу и индукује прогресију инсулинске резистенције тиме што изазива пироптозу: ћелијску смрт праћену интензивном упалом (262). Додатно, IL-1 β заједно са TNF- α који секретују Т и В ћелије смањује продукцију инсулина подстакнуту глукозом (154). Супротно ефектима TNF- α , цитокин IL-22 испољава позитивне ефекте на инфламацију и инсулинску резистенцију у дијабетесу (263). У слезинама ДМ^{CCs} детектовано је повећање броја В лимфоцита који секретују IL-22 највероватније као компензациони механизам покренут у циљу ублажења TNF- α -изазване инфламације у панкреасним остврцима мишева. Међутим, у слезинама мишева који су били изложени ENDS-у примећен је мањи степен регрутације имунских ћелија у односу на ДМ^{CCs} мишеве, услед потенцијала ENDS-а да омета миграцију леукоцита преко смањене експресије селектина и интегрина на ендотелу у односу на CCs. Додатно, у крви ДМ пацијената који су корисници ENDS-а, као и у слезинама ДМ^{ENDS} мишева, детектовано је и смањено присуство проинфламацијских неутрофила и макрофага који секретују IL-1 β јер дуготрајна изложеност ENDS-у смањује експресију гена важних за инфлуке леукоцита (EGR1, CCL2 и CXCL2) и секрецију IL-1 β (139). Такође, код ДМ^{ENDS} мишева и код ДМ пацијената корисника ENDS-а, уочено је смањено присуство Т, НК и NKT ћелија које продукују IFN- γ и TNF- α у поређењу са резултатима мишева из групе ДМ^{CCs}. У слезини ДМ^{ENDS} мишева детектован је и мањи број DC које секретују IL-1 β и експримирају I-A и DC, неутрофила и макрофага који ослобађају IL-12 и IL-23. Са друге стране, дуготрајна изложеност ENDS-у је промовисала експанзију регулаторних Т лимфоцита и НК и NKT ћелија које супримирају проинфламацијски фенотип (264). Имуносупресивне Т, НК и NKT ћелија експримирају FoxP3 и секретују IL-10 или TGF- β , који покрећу алтернативни начин активирања макрофага преко сузбијања активности iNOS и повећања експресије Arginase-1. M2 макрофаги потом покрећу поправку оштећених делова панкреасног ткива (265). Додатно, повећана секреција IL-10 инхибира експресију I-A, CD40 и CD86 на DC, чиме значајно ремети њихову антиген-презентујућу способност која зависи управо од МНС протеина класе II и костимулаторних молекула (266). Синергистичким дејством IL-10 и TGF- β долази до супресије активности NF- κ B сигналног пута и последично до сузбијања Т, НК и NKT секреције TNF- α , IFN- γ и IL-17, чиме се значајно инхибира интензитет инфламације и оштећења панкреаса (265,266). Дакле, повећано присуство Т ћелија које продукују TGF- β и НК и NKT ћелија које експримирају FoxP3 и секретују IL-10 условљено смањеним присуством профинламацијских DC, фагоцита и лимфоцита, детектовано код ДМ^{ENDS} мишева одговорно је за мањи степен инфламације и оштећења панкреаса. Међутим, јако је важно узети у обзир да ENDS-покренута имуносупресија посредством Т/НК/NKT имунских ћелија поред тога што супримира инфламацију, може пореметити имунски надзор против малигно трансформисаних ћелија (267).

Дакле, слично као код ХОБП пацијената, дуготрајна употреба CCs и ENDS-а је на различите начине модификовала фенотип и функцију имунских ћелија код пацијената оболелих од шећерне болести. Наши резултати указују на слабију способност ENDS-а да изазове инфламацију зависну од имунских ћелија у шећерној болести у поређењу са CCs.

Мањи укупан број Th1 леукоцита који продукују TNF- α , IL-12 и IFN- γ , као и Th17 ћелија које секретују IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-22 и IL-23 детектован је код ДМ пацијената који су ENDS корисници у односу на ДМ пацијенте из групе пушача. За разлику од ENDS-а који супримира транскрипциони фактор NF- κ B, дуготрајна употреба CCs промовише NF- κ B-зависну каскаду у DC, фагоцитима и лимфоцитима чиме стимулише секрецију Th1 и Th17 проинфламацијских цитокина и проузрокује прогресију системског инфламацијског одговора код ДМ пацијената (222,268). Додатно, детектована је позитивна корелација између клиничких параметара прогресије дијабетеса као што су вредности гликемије и HbA1c, и измерених нивоа Th1 и Th17 цитокина у серуму ДМ пацијената из групе CCs. Конзумација ENDS-а је такође проузроковала штетан и јак системски инфламацијски одговор код ДМ пацијената, тако да је присуство проинфламацијских ћелија и цитокина било веће него код ДМ пацијената из групе непушача. Аналогно ефектима уоченим код ХОБП пацијената, ENDS је и код ДМ пацијената промовисао синтезу TGF- β , цитокина са профибротским дејством који може проузроковати прекомерну фиброзу ткива (257).

5.5. Ефекти CCs и ENDS-а на системску инфламацију у УК

Континуирана изложеност дуванском диму CCs или аеросолу ENDS-а узрокују промене у вијабилности, функцији и фенотипу имунских ћелија које имају кључну улогу у патогенези УК.

Катран и СО, најпознатији штетни састојци дуванског дима CCs, имају потенцијал да модификују функцију и фенотип имунских ћелија попут неутрофила, моноцита, Т и В лимфоцита и NK ћелија регрутованих у инфламирано ткиво колона и последично да промене даљи клинички ток болести УК (168). Катран-специфични оксиданси и слободни радикали узрокују оксидативни стрес и последично апоптозу имунских ћелија изложених дуванском диму CCs. Додатно, дувански дим садржи и тешке метале попут арсена и кадмијума који, преко нарушавања функције канала за калцијум у леукоцитима, онемогућавају њихову миграцију у инфламирана ткива (168). Са друге стране, СО, тешки метали и катран су или присутни у изузетно малој концентрацији или потпуно одсутни у аеросолу ENDS-а, што објашњава значајно већи број циркулишућих имунских ћелија у крви УК пацијената и у колону УК^{ENDS} мишева у односу на резултате CCs група у којима је дошло до компромитовања леукоцитне способности миграције.

Дувански дим CCs садржи и једињења попут 1,3-бутадиена, бензена, етилен оксида и акрилонитрила која додатно ремете способност имунских ћелија за пролиферацију и активацију (269). Ове токсичне хемикалије узрокују оксидативни стрес, ДНК оштећење и апоптозу у имунским ћелијама тако што активирају MAPK сигнални пут и транскрипционе факторе NF- κ B и AP-1 и на тај начин модулирају ниво секреције проинфламацијских цитокина и интензитет покретања системског инфламацијског одговора. Континуирана изложеност бензену смањује синтезу и експресију костимулаторних молекула попут CD80 и CD86 на DC чиме се ремети активација Т и NK ћелија (270), док изложеност 1,3-бутадиену и етилен-оксиду повећава ризик од великих делеција на гену HPRT (232,271). Етилен-оксид у малим количинама може да оштети синтезу ДНК у Т ћелијама чиме угрожава њихову способност за клонску експанзију (271).

Акрилонитрил нарушава стабилност липидних сплавов у ефекторским Т лимфоцитима, ремети сигнални пут Ras/Raf/MAPK и последично инхибира секрецију проинфламацијских цитокина (272). Детектован мањи број ефекторских Т лимфоцита у крви УК пацијената из групе пушача и у ткиву колона УК^{CCs} мишева највероватније је последица наведених штетних хемикалија присутних у дуванском диму. У аеросолу ENDS-а су 1,3-бутадиен, бензен, етилен оксид и акрилонитрил присутни у значајно нижим концентрацијама (0,1%–0,7%) у односу на дувански дим, тако да је у крви УК пацијената који су корисници ENDS-а и у дебелом цреву УК^{ENDS} мишева детектован драстично већи укупан број леукоцита који је био одговоран за интензивнији имунски одговор.

У дуванском диму CCs су присутни и PAH који везивањем за одговарајуће угљоводоничне рецепторе (енгл. *Aryl Hydrocarbon Receptor*, AhRs) на DC покрећу каскаду догађаја која ремети антиген-презентујуће способности ових ћелија.

Након детекције антигена, DC експримирају костимулаторне молекуле и секретује про-Th1 цитокин IL-12 који повећава експресију Tbx1 транскрипционог фактора и генерише ефекторске Th1 лимфоците, цитокин IL-4 (про-Th2) који делује на Gata-3 и генерише Th2 ћелије и цитокине IL-1 β , IL-6 и IL-23 (про-Th17) који преко ROR γ T генеришу Th17 ћелије. Међутим, PAH присутни у дуванском диму CCs редукују генску експресију која последично смањује синтезу и експресију костимулаторних молекула и МНС протеина (168). Додатно, PAH додатно ремете про-Th1/Th2/Th17 цитокинску секрецију у DC преко модулације транскрипционог фактора NF- κ B, чиме се додатно супримира активација Т лимфоцита (273). Стога, детектована смањена експресија CD40, I-A, CD86 код УК пацијената пушача и УК^{CCs} мишева потврдила је CCs-узроковану редукцију антиген-презентујуће способности DC и снижену активацију Th1, Th2 и Th17 лимфоцита који секретују IFN- γ , IL-4 и IL-17 у поређењу са резултатима интензивније инфламације у ENDS групама.

Драстична CCs-индукована супресија ћелијске комуникације између DC и Т ћелија довела је до ублажења интензитета имунског одговора посредованог Th1, Th2 и Th17 лимфоцитима и до побољшања зарастања оштећене слузокоже колона код УК^{CCs} мишева. Th1, Th2 и Th17 лимфоцити преко секреције TNF- α , IL-4, IL-17, IL-22 и IFN- γ промовишу проинфламацијски фенотип у неутрофилима, мастоцитима и макрофагима. Проинфламација повећава оксидативни стрес због индуковане синтезе ROS и узрокује дисрупцију интегритета црева и отежава зарастање и опоравак инфламацијом-узрокованог оштећења колона (163,164,274). Дакле, смањено присуство проинфламацијских моноцита/макрофага које је уочено у крви УК пацијената из групе пушача и у колону УК^{CCs} мишева промовисало је зарастање слузокоже колона претходно оштећено имунским одговором посредованим имунским ћелијама.

Супротно ефектима CCs, ENDS поред тога што промовише проинфламацијски фенотип у имунским ћелијама, подстиче и стварање толерогених DC, Treg и алтернативно-активираних M2 макрофага, чије присуство је детектовано у колону УК^{ENDS} мишева. Толерогене DC секретују IL-10 и TGF- β чије присуство активира FoxP3 транскрипциони фактор у наивним Т лимфоцитима и последично промовише стварање имunosупресивних Treg ћелија (275). Поред тога што директно покрећу зарастање имунским ћелијама узроковано оштећење слузокоже колона, посредством синтезе IL-10 индукују стварање M2 макрофага који експримирају CD206 и Arginase-1 и луче факторе раста који додатно побољшава зарастање слузокоже колона (166,274).

M2 макрофаги и Treg ћелије продукују и TGF- β који супресијом Jak/STAT сигналног пута зауставља ћелијски циклус у G1 фази и тиме редукује пролиферацију ефекторских Т лимфоцита (276). Додатно, Treg ћелије продукују још један имуносупресивни цитокин, IL-35, који инхибира процесе сазревања и активације DC чиме минимизира DC-зависну активацију Т лимфоцита (277). Сходно томе, повећано присуство имуносупресивних Treg ћелија које продукују IL-10, TGF- β и IL-35 у крви УК пацијената који су ENDS корисници и Treg, M2 макрофага и DC који секретују IL-10 у колону УК^{ENDS} мишева, објашњава зарастање оштећене слузокоже колоне.

Потенцијал да модулира ћелијску комуникацију антиген-презентујућих ћелија и Т лимфоцита поседује још једно важно једињење које улази у састав CCs и ENDS-а: никотин (161). Никотин, везивањем за $\alpha 7$ nAChR на DC и макрофагима, промовише секрецију медијатора имуносупресије TGF- β и IL-10 и последично индукује стварање Treg. Додатно, активацијом сигнализације која обухвата $\alpha 7$ nAChR/PI3K/Akt/Erk1/Erk2 повећава способност Treg за пролиферацију и секрецију антиинфламацијских цитокина TGF- β , IL-10 и IL-35 (139,161). Међутим, с обзиром на то да је концентрација никотина у аеросолу ENDS-а и дуванском диму CCs приближна (229), узрок дискрепанце у броју имунских ћелија након излагања ENDS-у и CCs би требало тражити у различитом начину обраде дувана, односно у једињењима по којима се разликују (катран, CO, 1,3-бутадиен, бензен, етилен оксид и акрилонитрил).

Дакле, за разлику од резултата детектованих у ХОБП и ДМ моделу, конзумација CCs и ENDS-а није погоршала системски инфламацијски одговор код мишева и пацијената оболелих од УК. Континуирана изложеност пацијената CCs и ENDS-у није појачао секрецију проинфламацијских цитокина који имају кључну улогу у прогресији УК. Дувански дим CCs је угрозио вијабилност и пролиферацију проинфламацијских имунских ћелија у улцеративном колону и значајно ублажио локалну инфламацију. Аеросол ENDS-а је такође супримирао инфламацију јер је снажнијим интензитетом генерисао имуносупресивни фенотип имунских ћелија. Ослабљен системски инфламацијски одговор је промовисао зарастање оштећене слузокоже колоне и клинички опоравак.

6. ОГРАНИЧЕЊА

На крају, важно је признати постојећа ограничења истраживања. У анималној студији су животиње након индукције и потврђивања болести биле изложене дуванском диму CCs/аеросолу ENDS-а свега неколико недеља, тако да би наредне студије требало да испитају дугорочне ефекте на прогресију индуковане болести и развој болест-специфичних компликација.

У клиничкој студији су сви испитаници из експерименталних или контролне групе били упарени према дужини трајања и учесталости конзумације CCs/ENDS, и према клиничким и демографским параметрима, што је за последицу имало релативно мали укупан број учесника у одређеним групама. Мали студијски узорак може потенцијално да утиче на статистичку снагу студије. Додатно, мала кохорта и потешкоће у утврђивању узрочно-последичне конекције, могу лимитирати применљивост резултата. Важно је напоменути да су крвни узорци добијени искључиво од пацијената на територији Републике Србије и да се стога резултати не могу генерализовати на друге регионе и популације. Резултати представљени у овој докторској дисертацији могу послужити као полазна тачка за дизајн клиничке студије која ће обухватити много већи број пацијената, различитих болести и региона, како би се омогућила што обимнија и детаљнија анализа ефеката конзумације CCs и ENDS-а на фенотип и функцију имунских ћелија које покрећу системски инфламацијски одговор и узорукују оштећење органа. Циљ будућих истраживања би требало бити усмерен на испитивање дугорочних последица CCs/ENDS-покренуте имуномодулације на настанак и егзацербацију различитих хроничних инфламацијских болести.

7. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, могу се извести следећи закључци:

1. И дувански дим и аеросол ENDS-а утичу на вијабилност, пролиферацију, регенеративни и имуномодулаторне потенцијал PDL-MSCs.
2. Изложеност и дуванском диму CCs и аеросолу ENDS-а може да модулира фенотип и ефекторске функције имунских ћелија које су важне за развој и прогресију ХОБП, УК и ДМ.
3. Дувански дим CCs приликом континуиране примене подстиче секрецију проинфламацијских цитокина у DC, макрофагима/моноцитима, неутрофилима, Т и В лимфоцитима, NK и NKT ћелијама чиме се промовише системски инфламацијски одговор и погоршава оштећење плућа и панкреаса.
4. У хроничној инфламацији, континуирана изложеност аеросолима ENDS-а, у поређењу са дуванским димом CCs-а, слабије индукује стварање проинфламацијског фенотипа у имунским ћелијама

8. СКРАТЕНИЦЕ

CCs	енгл. <i>Combustible cigarettes</i>
nAChR	енгл. <i>Nicotine acetylcholine receptors</i>
TSNA	енгл. <i>Tobacco-specific N-nitrosamines</i>
PAH	енгл. <i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
NAT	енгл. <i>N-Nitrosoanatabine</i>
NNN	енгл. <i>N-Nitrosonornicotine</i>
NNK	енгл. <i>4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone</i>
CO	енгл. <i>Carbon monoxide</i>
Ig	енгл. <i>Immunoglobulins</i>
ROS	енгл. <i>Reactive oxygen species</i>
FEV1	<i>Forced expiratory volume in first second</i>
FVC	енгл. <i>Forced Vital Capacity</i>
ESCs	енгл. <i>Embryonic stem cells</i>
iPSC	енгл. <i>Induced pluripotent stem are cells</i>
SSEA	енгл. <i>Stage-specific embryonic antigen</i>
OCT4	енгл. <i>Octamer 3/4</i>
SOX2	енгл. <i>Sex determining region Y-box 2</i>
ASCs	енгл. <i>Adult stem cells</i>
HSCs	енгл. <i>Hematopoietic stem cells</i>
MSCs	енгл. <i>Mesenchymal stem cells</i>
ADMSCs	енгл. <i>Adipose tissue derived mesenchymal stem cells</i>
UCMSCs	енгл. <i>Umbilical cord derived mesenchymal stem cells</i>
CD	енгл. <i>Cluster of differentiation</i>
MHC	енгл. <i>Major histocompatibility complex</i>
HLA-DR	енгл. <i>Human Leukocyte Antigen - DR</i>
AF-MSCs	енгл. <i>Amniotic fluid derived mesenchymal stem cells</i>
VCAM-1	енгл. <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

ICAM-1	енгл. <i>Intercellular cell adhesion molecule 1</i>
NK	енгл. <i>Natural killer cells</i>
CTL	енгл. <i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
TGF- β	енгл. <i>Transforming growth factor beta</i>
IL	енгл. <i>Interleukin</i>
PGE2	енгл. <i>Prostaglandin E2</i>
VEGF	енгл. <i>Vascular endothelial growth factor</i>
PDL-MSCs	енгл. <i>Periodontal ligament mesenchymal stem cells</i>
DAMP	енгл. <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	енгл. <i>Dendritic cell</i>
TNF- α	енгл. <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
IFN- γ	енгл. <i>Interferon-gamma</i>
NO	енгл. <i>Nitric oxide</i>
NADPH	енгл. <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NOD	енгл. <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
LRR	енгл. <i>Leucine-rich repeat</i>
NLRP3	енгл. <i>Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3</i>
iNOS	енгл. <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
MAPK	енгл. <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
JAK	енгл. <i>Janus kinase</i>
NF- κ B	енгл. <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Tregs	енгл. <i>Regulatory T cells</i>
FoxP3	енгл. <i>Forkhead box P3</i>
ENDS	енгл. <i>Electronic nicotine delivery systems</i>
DMEM	енгл. <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
FBS	енгл. <i>Fetal Bovine Serum</i>
DPBS	енгл. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EDTA	енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>

AqE	енгл. <i>Aqueous aerosol extracts</i>
NRU	енгл. <i>Neutral red uptake</i>
HEPES	енгл. <i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
ELISA	енгл. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
RD	енгл. <i>Reagent Diluent</i>
BSA	енгл. <i>Bovine serum albumin</i>
MLD	енгл. <i>Multiple low doses</i>
STZ	енгл. <i>Streptozotocin</i>
DSS	енгл. <i>Dextran sodium sulphate</i>
DAI	енгл. <i>Disease Activity Index</i>
PaO ₂	енгл. <i>Partial Pressure of Oxygen</i>
PaCO ₂	енгл. <i>Partial Pressure of Carbon Dioxide</i>
H&E	енгл. <i>Haematoxylin&Eosin</i>
TLR	енгл. <i>Toll-like receptors</i>
Tbx21	енгл. <i>T-Box Transcription Factor 21</i>
ROR γ	енгл. <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
PMA	енгл. <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
FSC	енгл. <i>Forward scatter</i>
SSC	енгл. <i>Side scatter</i>
FMO	енгл. <i>Fluorescence Minus One</i>
ANOVA	енгл. <i>One-way analysis of variance</i>
HbA _{1c}	енгл. <i>Glycosylated hemoglobin</i>
PaCO ₂	енгл. <i>Partial Pressure of Carbon Dioxide</i>
HPRT	енгл. <i>Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase</i>
AP1	енгл. <i>Activator protein-1</i>
IRF	енгл. <i>Interferon regulatory factors</i>
MMP	енгл. <i>Matrix metalloproteinases</i>
AhRs	енгл. <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>

9. ЛІТЕРАТУРА

1. Scharf P, Rizzetto F, Xavier LF, Farsky SHP. Xenobiotics Delivered by Electronic Nicotine Delivery Systems: Potential Cellular and Molecular Mechanisms on the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10293. doi:10.3390/ijms231810293
2. Kaufman AR, Twesten JE, Suls J, et al. Measuring Cigarette Smoking Risk Perceptions. *Nicotine Tob Res.* 2020;22(11):1937-1945. doi:10.1093/ntr/ntz213
3. Cho ER, Brill IK, Gram IT, Brown PE, Jha P. Smoking Cessation and Short- and Longer-Term Mortality. *NEJM Evid.* 2024;3(3):EVIDoA2300272. doi:10.1056/EVIDoA2300272
4. Su Z, Xie Y, Huang Z, et al. Second hand smoke attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990-2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *Respir Res.* 2025;26(1):174. doi:10.1186/s12931-025-03228-3
5. Seiler-Ramadas R, Sandner I, Haider S, Grabovac I, Dorner TE. Health effects of electronic cigarette (e-cigarette) use on organ systems and its implications for public health. *Wien Klin Wochenschr.* 2021;133(19-20):1020-1027. doi:10.1007/s00508-020-01711-z
6. Sansone L, Milani F, Fabrizi R, et al. Nicotine: From Discovery to Biological Effects. *Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14570. doi:10.3390/ijms241914570
7. Charlton A. Medicinal uses of tobacco in history. *J R Soc Med.* 2004;97(6):292-296. doi:10.1177/014107680409700614
8. Shoji T, Hashimoto T, Saito K. Genetic regulation and manipulation of nicotine biosynthesis in tobacco: strategies to eliminate addictive alkaloids. *J Exp Bot.* 2024;75(6):1741-1753. doi:10.1093/jxb/erad341
9. Singh N, Wanjar A, Sinha AH. Effects of Nicotine on the Central Nervous System and Sleep Quality in Relation to Other Stimulants: A Narrative Review. *Cureus.* 2023;15(11):e49162. doi:10.7759/cureus.49162
10. Sala M, Gotti C. Electronic nicotine delivery systems (ENDS): A convenient means of smoking?. *Pharmacol Res.* 2023;195:106885. doi:10.1016/j.phrs.2023.106885
11. Chong-Silva DC, Sant'Anna MFBP, Riedi CA, et al. Electronic cigarettes: "wolves in sheep's clothing". *J Pediatr (Rio J).* 2025;101(2):122-132. doi:10.1016/j.jpmed.2024.06.015
12. Al-Dahhan W, Kadhom M, Yousif E, et al. Extraction and Determination of Nicotine in Tobacco from Selected Local Cigarettes Brands in Iraq. *Letters in Applied NanoBioScience.* 2021;11(1):3278-3290. doi:10.33263/lianbs111.32783290
13. Gholap VV, Kosmider L, Golshahi L, Halquist MS. Nicotine forms: why and how do they matter in nicotine delivery from electronic cigarettes?. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;17(12):1727-1736. doi:10.1080/17425247.2020.1814736
14. Benowitz NL. The Central Role of pH in the Clinical Pharmacology of Nicotine: Implications for Abuse Liability, Cigarette Harm Reduction and FDA Regulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2022;111(5):1004-1006. doi: 10.1002/cpt.2555.

15. Kolli AR, Kuczaj AK, Martin F, Hayes AW, Peitsch MC, Hoeng J. Bridging inhaled aerosol dosimetry to physiologically based pharmacokinetic modeling for toxicological assessment: nicotine delivery systems and beyond. *Crit Rev Toxicol.* 2019;49(9):725-741. doi:10.1080/10408444.2019.1692780
16. Pérez-Rubio G., López-Flores L.A., Cupertino A.P., et al. Genetic variants in smoking-related genes in two smoking cessation programs: A cross-sectional study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021;18:6597. doi: 10.3390/ijerph18126597.
17. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(4):338-349. doi: 10.2174/1570159X15666170912110450.
18. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;134(1):1-21. doi: 10.1016/j.jphs.2017.05.002
19. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1085. doi: 10.3389/fimmu.2017.01085.
20. Tae HS, Adams DJ. Nicotinic acetylcholine receptor subtype expression, function, and pharmacology: Therapeutic potential of α -conotoxins. *Pharmacol Res.* 2023;191:106747. doi:10.1016/j.phrs.2023.106747.
21. Diabasana Z., Perotin J., Belgacemi R., et al. Nicotinic Receptor Subunits Atlas in the Adult. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:7446. doi: 10.3390/ijms21207446.
22. Quick M.W., Lester R.A.J. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 2002;53:457–478. doi: 10.1002/neu.10109.
23. Somm E., Guérardel A., Maouche K., et al. Concomitant $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic AChR subunit deficiency leads to impaired energy homeostasis and increased physical activity in mice. *Mol. Genet. Metab.* 2014;112:64–72. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.03.003.
24. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron.* 2012;76(1):116-129. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.036
25. Wills L, Ables JL, Braunscheidel KM, et al. Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. *Pharmacol Rev.* 2022;74(1):271-310. doi:10.1124/pharmrev.121.000299
26. Zhang W, Pan X, Fu J, et al. Phytochemicals derived from *Nicotiana tabacum* L. plant contribute to pharmaceutical development. *Front Pharmacol.* 2024;15:1372456. doi:10.3389/fphar.2024.1372456
27. Xiao G, Wang L, Pan T, et al. Insights into tobacco leaf quality deterioration under long-term storage by investigating dynamic phytochemical and metabolite profile variations. *BMC Plant Biol.* 2025;25(1):611. doi:10.1186/s12870-025-06375-3
28. Schaller JP, Keller D, Poget L, et al. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;8:S27-S47. doi:10.1016/j.yrtph.2016.10.001
29. Baker R. Smoke generation inside a burning cigarette: Modifying combustion to develop cigarettes that may be less hazardous to health. *Progress in Energy and Combustion Science.* 2006;32(4):373–85.

30. Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, Schmidt TC, Saeedi R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Sci Total Environ.* 2022;813:152667. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152667
31. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012;91(2):142-149. doi:10.1177/0022034511421200
32. Zhang Q, Wen C. The risk profile of electronic nicotine delivery systems, compared to traditional cigarettes, on oral disease: a review. *Front Public Health.* 2023;11:1146949. doi:10.3389/fpubh.2023.1146949
33. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(7):767-790. doi:10.1021/tx000260u
34. Hoffmann D, Hoffmann I. Letters to the editor, tobacco smoke components. *Beitr Tabaksforsch Int.* 1998;18(1):49-52
35. Setshedi KZ, Maity A, Nyakale A, et al. Removal of Tobacco Specific Carcinogenic Nitrosamines in Mainstream Cigarette Smoke and Aqueous Solution□A Review. *ACS Omega.* 2025;10(21):20949-20967. doi:10.1021/acsomega.4c08529
36. Altarawneh M, Ali L. Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in thermal Systems: A Comprehensive Mechanistic review. *Energy & Fuels.* 2024;38(22):21735-21792
37. Seyler T, Mazumder S, Ahamed R, et al. Tobacco Smoke Is a Major Source of Aromatic Amine Exposure in U.S. Adults: 2013-2014 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* doi:10.1158/1055-9965.EPI-23-0071
38. Battu JR, Karthik S, Yashaswini G, et al. LC-MS/MS analysis of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in *Spodoptera litura* using the QuEChERS method. *Sci Rep.* 2023;13(1):12151. doi:10.1038/s41598-023-37656-2
39. Konstantinou E, Fotopoulou F, Drosos A, et al. Tobacco-specific nitrosamines: A literature review. *Food Chem Toxicol.* 2018;118:198-203. doi:10.1016/j.fct.2018.05.008
40. Pandol SJ, Apte MV, Wilson JS, Gukovskaya AS, Edderkaoui M. The burning question: why is smoking a risk factor for pancreatic cancer?. *Pancreatol.* 2012;12(4):344-349. doi:10.1016/j.pan.2012.06.002
41. Stepanov I, Sebero E, Wang R, Gao YT, Hecht SS, Yuan JM. Tobacco-specific N-nitrosamine exposures and cancer risk in the Shanghai Cohort Study: remarkable coherence with rat tumor sites. *Int J Cancer.* 2014;134(10):2278-2283. doi:10.1002/ijc.28575
42. Peng FJ, Lin CA, Wada R, et al. Cardiovascular risk factors in relation to hair polycyclic aromatic hydrocarbons in the NESCAV study. *Environment International.* 2024;194:109170. doi:10.1016/j.envint.2024.109170
43. Stading R, Gastelum G, Chu C, Jiang W, Moorthy B. Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:3-16. doi:10.1016/j.semcancer.2021.07.001
44. Buculei I, Dobrin ME, Matei D, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induced by Smoking and Air Pollution: Correlation with Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Toxics.* 2022;10(11):681. <https://doi.org/10.3390/toxics10110681>

45. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8(5):467. doi:10.3390/cells8050467
46. Fu M, Mei A, Min X, et al. Advancements in Cardiovascular Disease Research Affected by Smoking. *Rev Cardiovasc Med*. 2024;25(8):298. doi:10.31083/j.rcm2508298
47. Silva H. Tobacco Use and Periodontal Disease-The Role of Microvascular Dysfunction. *Biology (Basel)*. 2021;10(5):441.
48. Tekin M, Ceylan KB, Ozturk M. The effects of smoking on pain scores, vital signs, and analgesic consumption in patients undergoing tympanomastoidectomy surgery. *Tob Induc Dis*. 2024;22:10.18332/tid/189301. doi:10.18332/tid/189301
49. Lee JE, Jang TC, Seo YW. Unintentional fatal toxicity due to nicotine chewing gum: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(43):e31225. doi:10.1097/MD.00000000000031225
50. Scharf P, Broering M.F., da Rocha G.H.O., Farsky S.H.P. Cellular and molecular mechanisms of environmental pollutants on hematopoiesis. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:6996. doi: 10.3390/ijms21196996.
51. Cho S.H., Jeong S.H., Shin J., Park S., Jang S.I. Short-term smoking increases the risk of insulin resistance. *Sci. Rep*. 2022;12:3550. doi: 10.1038/s41598-022-07626-1.
52. Yankey B.N.A., Strasser S., Okosun I.S. A cross-sectional analysis of the association between marijuana and cigarette smoking with metabolic syndrome among adults in the United States. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev*. 2016;10:S89–S95. doi: 10.1016/j.dsx.2016.03.001.
53. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(10):1731–7. doi: 10.1016/j.jacc.2003.12.047.
54. Trakas N, Georgakopoulou VE, Melemenis D, et al. Association between smoking cessation and alterations in forced expiratory volume in one second (FEV1). A Follow-Up Study from a Greek Tobacco Cessation Clinic. *Addict Health*. 2022;14(2):87-95. doi:10.22122/AHJ.2022.196722.1244
55. Premkumar M, Anand AC. Tobacco, Cigarettes, and the Liver: The Smoking Gun. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2021;11(6):700–712.
56. Pham DV, Park PH. Recent insights on modulation of inflammasomes by adipokines: a critical event for the pathogenesis of obesity and metabolism-associated diseases. *Arch Pharm Res*. 2020;43(10):997-1016. doi:10.1007/s12272-020-01274-7
57. Dutta J, Singh S, Greeshma MV, Mahesh PA, Mabalirajan U. Diagnostic Challenges and Pathogenetic Differences in Biomass-Smoke-Induced versus Tobacco-Smoke-Induced COPD: A Comparative Review. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(19):2154. doi:10.3390/diagnostics14192154
58. Almeida-da-Silva CLC, Matshik Dakafay H, O'Brien K, Montierth D, Xiao N, Ojcius DM. Effects of electronic cigarette aerosol exposure on oral and systemic health. *Biomed J*. 2021;44(3):252-259. doi: 10.1016/j.bj.2020.07.003.

59. Karanjkar RR, Preshaw PM, Ellis JS, Holliday R. Effect of tobacco and nicotine in causing staining of dental hard tissues and dental materials: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Dent Res*. 2023;9(1):150-164. doi:10.1002/cre2.683
60. Thiem DGE, Donkiewicz P, Rejaey R, et al. The impact of electronic and conventional cigarettes on periodontal health-a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2023;27(9):4911-4928. doi:10.1007/s00784-023-05162-4
61. Wasfi RA, Bang F, de Groh M, et al. Chronic health effects associated with electronic cigarette use: A systematic review. *Front Public Health*. 2022;10:959622. doi:10.3389/fpubh.2022.959622
62. Al-Odat I, Al-Fawaeir S. Impact of Tobacco Cigarette Smoking on Semen Quality and Serum Levels of Sex Hormones in Men: A Cross-Sectional Population-Based Study. *Health Sci Rep*. 2025;8(6):e70893. doi:10.1002/hsr2.70893
63. Dhage VD, Nagtode N, Kumar D, Bhagat AK. A Narrative Review on the Impact of Smoking on Female Fertility. *Cureus*. 2024;16(4):e58389. doi:10.7759/cureus.58389
64. Hamadneh J, Al-Zenati AA, Banihani SA. Semen Quality Measures in Hookah and Cigarette Smokers Compared to Nonsmokers. *ScientificWorldJournal*. 2025;2025:3380445. doi:10.1155/tswj/3380445
65. Kovac JR, Khanna A, Lipshultz LI. The effects of cigarette smoking on male fertility. *Postgrad Med*. 2015;127(3):338-341. doi:10.1080/00325481.2015.1015928
66. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res*. 2004;6:S125-S140. doi:10.1080/14622200410001669187
67. Azizbayli Y, Tatler A, James V, Watkins A, Fairclough LC. Parental Cigarette Smoke Exposure and Its Impact on Offspring Reproductive Health: A Systematic Review of Maternal, Paternal, and Dual-Smoking Effects. *International Journal of Translational Medicine*. 2025;5(3):34. <https://doi.org/10.3390/ijtm5030034>
68. Pineles BL, Park E, Samet JM. Systematic review and meta-analysis of miscarriage and maternal exposure to tobacco smoke during pregnancy. *Am J Epidemiol*. 2014;179(7):807-823. doi:10.1093/aje/kwt334
69. Juliá-Burchés C, Martínez-Varea A, Morales-Roselló J, Diago-Almela V. Impact of Maternal Smoking on Obstetric and Neonatal Outcomes in Twin Pregnancies: A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2024;13(23):7329. <https://doi.org/10.3390/jcm13237329>
70. Sun J, Liu X, Zhao M, Magnussen CG, Xi B. Dose-response association between maternal smoking during pregnancy and the risk of infant death: a nationwide, population-based, retrospective cohort study. *EClinicalMedicine*. 2023;57:101858. doi:10.1016/j.eclinm.2023.101858
71. Mishra A, Khan S. A, Jadhav K, Mehrotra N. Inhaling Risk: Smoking Impact on Male and Female Reproductive Health. *Biotech Res Asia* 2025;22(1).
72. McGrath JJC, Thayaparan D, Cass SP, et al. Cigarette smoke exposure attenuates the induction of antigen-specific IgA in the murine upper respiratory tract. *Mucosal Immunol*. 2021;14:1067–1076. doi: 10.1038/s41385-021-00411-9.

73. Bechara N, Hng TM, Gunton JE. The association between tobacco smoking and systolic toe pressures in active foot ulceration. *Sci Rep.* 2024;14(1):8550. doi:10.1038/s41598-024-59158-5
74. Xie G, Huang C, Jiang S, et al. Smoking and osteoimmunology: Understanding the interplay between bone metabolism and immune homeostasis. *J Orthop Translat.* 2024;46:33-45. doi:10.1016/j.jot.2024.04.003
75. Kroon LA. Drug interactions with smoking. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64(18):1917-1921. doi:10.2146/ajhp060414
76. Zanni S, Del Prete J, Capogrossi A, et al. Influence of cigarette smoking on drugs' metabolism and effects: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2025;81(5):667-695. doi:10.1007/s00228-025-03817-7
77. Gaya PV, Fonseca GWP, Tanji LT, et al. Smoking cessation decreases arterial blood pressure in hypertensive smokers: A subgroup analysis of the randomized controlled trial GENTSMOKING. *Tob Induc Dis.* 2024;22:10.18332/tid/186853. doi:10.18332/tid/186853
78. Pezzuto A, Ricci A, D'Ascanio M, et al. Short-Term Benefits of Smoking Cessation Improve Respiratory Function and Metabolism in Smokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2023;18:2861-2865. doi:10.2147/COPD.S423148
79. Rahman M, Alatiqi M, Al Jarallah M, et al. Cardiovascular Effects of Smoking and Smoking Cessation: A 2024 Update. *Glob Heart.* 2025;20(1):15. doi:10.5334/gh.1399
80. Le TTT, Mendez D, Warner KE. The Benefits of Quitting Smoking at Different Ages. *Am J Prev Med.* 2024;67(5):684-688. doi:10.1016/j.amepre.2024.06.020
81. Su L, Xu R, Ren Y, et al. Smoking exposure and cervical cancer risk: Integrating observational and genetic evidence. *J Int Med Res.* 2025;53(10):3000605251383687. doi:10.1177/03000605251383687
82. Korsbæk N, Landt EM, Dahl M. Second-Hand Smoke Exposure Associated with Risk of Respiratory Symptoms, Asthma, and COPD in 20,421 Adults from the General Population. *J Asthma Allergy.* 2021;14:1277-1284. doi:10.2147/JAA.S328748
83. Flor LS, Anderson JA, Ahmad N, et al. Health effects associated with exposure to secondhand smoke: a Burden of Proof study. *Nat Med.* 2024;30(1):149-167. doi:10.1038/s41591-023-02743-4
84. Grabowska K, Ziemichód W, Biała G. Recent Studies on the Development of Nicotine Abuse and Behavioral Changes Induced by Chronic Stress Depending on Gender. *Brain Sci.* 2023;13(1):121. doi:10.3390/brainsci13010121
85. Deshpande HU, Fedota JR, Castillo J, Salmeron BJ, Ross TJ, Stein EA. Not all smokers are alike: the hidden cost of sustained attention during nicotine abstinence. *Neuropsychopharmacology.* 2022;47(9):1633-1642. doi:10.1038/s41386-022-01275-8
86. Guérif V, Atlan M, Cristofari S. Pathophysiology of nicotine, place of nicotine substitutes and electronic cigarettes in plastic surgery: A review of the literature. *Ann Chir Plast Esthet.* 2022;67(3):119-124. doi:10.1016/j.anplas.2022.05.001

87. Varzideh F, Gambardella J, Kansakar U, Jankauskas SS, Santulli G. Molecular Mechanisms Underlying Pluripotency and Self-Renewal of Embryonic Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):8386. doi: 10.3390/ijms24098386.
88. Montilla-Rojo J, Bialecka M, Wever KE, et al. Teratoma Assay for Testing Pluripotency and Malignancy of Stem Cells: Insufficient Reporting and Uptake of Animal-Free Methods—A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(4):3879. <https://doi.org/10.3390/ijms24043879>
89. Cucinella G, Gullo G, Catania E, et al. Stem Cells and Infertility: A Review of Clinical Applications and Legal Frameworks. *J Pers Med.* 2024;14(2):135. doi:10.3390/jpm14020135
90. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Medical Sciences,* 2018;15(1):36–45.
91. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening. *Cells.* 2021;10(9):2319. doi:10.3390/cells10092319
92. Guo R, Mu W, Liu X, et al. Reprogramming of a human induced pluripotent stem cell line from one 48-year-old healthy male donor. *Stem Cell Res.* 2021;53:102339. doi:10.1016/j.scr.2021.102339
93. Li Y, Darabi R. Role of epigenetics in cellular reprogramming; from iPSCs to disease modeling and cell therapy. *J Cell Biochem.* 2022;123(2):147-154. doi:10.1002/jcb.30164
94. Andrews PW, Gokhale PJ. A short history of pluripotent stem cells markers. *Stem Cell Reports.* 2024;19(1):1-10. doi:10.1016/j.stemcr.2023.11.012
95. Chehelgerdi M, Behdarvand Dehkordi F, Chehelgerdi M, et al. Exploring the promising potential of induced pluripotent stem cells in cancer research and therapy. *Mol Cancer.* 2023;22(1):189. doi:10.1186/s12943-023-01873-0
96. Wolf DA, Beeson W, Rachel JD, et al. Mesothelial Stem Cells and Stromal Vascular Fraction for Skin Rejuvenation. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018;26(4):513-532. doi:10.1016/j.fsc.2018.06.011
97. Cheng T, Ding S, Liu S, Li Y, Sun L. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy ameliorates lupus through increasing CD4⁺ T cell senescence via MiR-199a-5p/Sirt1/p53 axis. *Theranostics.* 2021;11(2):893-905. doi:10.7150/thno.48080
98. Han Y, Li X, Zhang Y, et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* 2019;8(8):886.
99. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):63.
100. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1852.
101. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Deng YH, Tsai FC, Deng WP. Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2200. doi:10.3390/ijms19082200

102. Bina V, Brancato AM, Caliozna L, et al. Mesenchymal Stem Cells and Secretome as a New Possible Approach to Treat Cartilage Damage: An In Vitro Study. *Biomolecules*. 2024;14(9):1068. doi:10.3390/biom14091068
103. Teoh PL, Mohd Akhir H, Abdul Ajak W, Hiew VV. Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Perinatal Tissues: Sources, Characteristics and Isolation Methods. *Malays J Med Sci*. 2023;30(2):55-68. doi:10.21315/mjms2023.30.2.5
104. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2010;28:1435–1445.
105. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007;129:1377–1388.
106. Lebeau G, Ah-Pine F, Daniel M, et al. Perivascular Mesenchymal Stem/Stromal Cells, an Immune Privileged Niche for Viruses?. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14):8038. doi:10.3390/ijms23148038
107. Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
108. Shan Y, Zhang M, Tao E, et al. Pharmacokinetic characteristics of mesenchymal stem cells in translational challenges. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):242 doi:10.1038/s41392-024-01936-8
109. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, et al. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(2):280-287.
110. Williams T, Salmanian G, Burns M, et al. Versatility of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair and regenerative applications. *Biochimie*. 2023;207:33-48. doi:10.1016/j.biochi.2022.11.011
111. Volarevic V, Gazdic M, Simovic Markovic B, et al. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors*. 2017;43(5):633-644.
112. Popova AP, Bozyk PD, Goldsmith AM, et al. Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(6):L735-L743.
113. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):166-177.
114. Harrell CR, Miloradovic D, Sadikot R, et al. Molecular and Cellular Mechanisms Responsible for Beneficial Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Product “Exo-d-MAPPS” in Attenuation of Chronic Airway Inflammation. *Analytical Cellular Pathology*, 2020;2020:3153891.
115. Bojic S, Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. *Histol Histopathol*. 2014;29(6):699-706. doi:10.14670/HH-29.699
116. Tomokiyo A, Yoshida S, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Maeda H. Detection, Characterization, and Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Ligament Tissue. *Stem Cells Int*. 2018;2018:5450768. doi:10.1155/2018/5450768

117. Harrell CR, Djonov V, Volarevic V. The effects of cigarette smoking and nicotine on the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*. 2022;37(2):93-100. doi:10.14670/HH-18-400
118. Ng TK, Huang L, Cao D, et al. Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials. *Sci Rep* 2015;5:1–7.
119. Ng TK, Carballosa CM, Pelaez D, et al. Nicotine Alters MicroRNA Expression and Hinders Human Adult Stem Cell Regenerative Potential. *Stem Cells and Development*, 2013;22(5):781–790.
120. Tarantino U, Cariati I, Greggi C, et al. Skeletal System Biology and Smoke Damage: From Basic Science to Medical Clinic. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(12):6629. <https://doi.org/10.3390/ijms22126629>
121. Herawati H, Sunariani J. The effects of nicotine on the periodontal tissue. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 2010;1(3):151-154.
122. Stramazzotti D, Coiana C, Zizzi A, et al. Impact of smoking on guided tissue regeneration using a biocomposite poly (lactic-co-glycolic) acid/sub-micron size hydroxyapatite with a rubber dam as an alternative barrier. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2015;28(1):21–28.
123. Sørensen LT. Wound healing and infection in surgery: the pathophysiological impact of smoking, smoking cessation, and nicotine replacement therapy: a systematic review. *Ann Surg*. 2012;255(6):1069-1079.
124. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-7218. doi:10.18632/oncotarget.23208
125. Antar SA, Ashour NA, Marawan ME, Al-Karmalawy AA. Fibrosis: Types, Effects, Markers, Mechanisms for Disease Progression, and Its Relation with Oxidative Stress, Immunity, and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4004. doi:10.3390/ijms24044004
126. Palomo M, Moreno-Castaño AB, Salas MQ, et al. Endothelial activation and damage as a common pathological substrate in different pathologies and cell therapy complications. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1285898. doi:10.3389/fmed.2023.1285898
127. Xiang Y, Zhang M, Jiang D, Su Q, Shi J. The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Front Immunol*. 2023;14:1267091. doi:10.3389/fimmu.2023.1267091
128. Caruso M, Emma R, Distefano A, et al. Comparative assessment of electronic nicotine delivery systems aerosol and cigarette smoke on endothelial cell migration: The Replica Project. *Drug Test Anal*. 2023;15(10):1164-1174. doi:10.1002/dta.3349
129. Russell AE, Liao Z, Tkach M, et al. Cigarette smoke-induced extracellular vesicles from dendritic cells alter T-cell activation and HIV replication. *Toxicol Lett*. 2022;360:33-43. doi:10.1016/j.toxlet.2022.02.004
130. Lugg ST, Scott A, Parekh D, Naidu B, Thickett DR. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease. *Thorax*. 2022;77(1):94-101. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-216296

131. Chen J, Wang X, Schmalen A, et al. Antiviral CD8⁺ T-cell immune responses are impaired by cigarette smoke and in COPD. *Eur Respir J*. 2023;62(2):2201374. doi:10.1183/13993003.01374-2022
132. Qiu F, Liang CL, Liu H, et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: up and down or upside down? *Oncotarget*. 2017;8(1):268–284.
133. White PC, Hirschfeld J, Milward MR, et al. Cigarette smoke modifies neutrophil chemotaxis, neutrophil extracellular trap formation and inflammatory response-related gene expression. *J Periodontal Res*. 2018;53(4):525-535. doi:10.1111/jre.12542
134. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009;183(4):2867-2883. doi:10.4049/jimmunol.0900473
135. Thatcher TH, Benson RP, Phipps RP, Sime PJ. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L412-L421. doi:10.1152/ajplung.00392.2007
136. Ortiz-Quintero B, Martínez-Espinosa I, Pérez-Padilla R. Mechanisms of Lung Damage and Development of COPD Due to Household Biomass-Smoke Exposure: Inflammation, Oxidative Stress, MicroRNAs, and Gene Polymorphisms. *Cells*. 2022;12(1):67. doi:10.3390/cells12010067
137. Kawasaki T, Ikegawa M, Kawai T. Antigen presentation in the lung. *Front Immunol*. 2022;13(1):860915.
138. Kumar A, Cherian SV, Vassallo R, Yi ES, Ryu JH. Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and management of smoking-related interstitial lung diseases. *Chest*. 2018;154(2):394–408.
139. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5):1033. doi:10.3390/ijerph15051033
140. Caramori G, Casolari P, Barczyk A, et al. COPD immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):497–515.
141. Elisia I, Lam V, Cho B, et al. The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. *Sci Rep*. 2020;10(1):19480.
142. Forno E, Ortega VE, Celedón JC. Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med*. 2023;44(3):519-530. doi:10.1016/j.ccm.2023.03.008.
143. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.011
144. Jenkins CR. Towards precision in defining COPD exacerbations. *Breathe (Sheff)*. 2021;17(3):210081. doi:10.1183/20734735.0081-2021

145. Meeraus WH, DeBarmore BM, Mullerova H, Fahy WA, Benson VS. Terms and Definitions Used to Describe Recurrence, Treatment Failure and Recovery of Acute Exacerbations of COPD: A Systematic Review of Observational Studies. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021;16:3487-3502. doi:10.2147/COPD.S335742
146. Hikichi M, Mizumura K, Maruoka S, Gon Y. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke. *J Thorac Dis*. 2019;11(Suppl 17):S2129-S2140. doi:10.21037/jtd.2019.10.43
147. Li Y, Hecht SS. Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem Toxicol*. 2022;165:113179. doi:10.1016/j.fct.2022.113179
148. Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13:3341-3348. doi:10.2147/COPD.S176122
149. Fu YS, Kang N, Yu Y, et al. Polyphenols, flavonoids and inflammasomes: the role of cigarette smoke in COPD. *Eur Respir Rev*. 2022;31(164):220028. doi:10.1183/16000617.0028-2022
150. Guo P, Li R, Piao TH, Wang CL, Wu XL, Cai HY. Pathological Mechanism and Targeted Drugs of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2022;17:1565-1575. doi:10.2147/COPD.S366126
151. McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J Clin Med*. 2017;6(2):21. doi:10.3390/jcm6020021
152. Lee H, Kim MJ, Lee IK, Hong CW, Jeon JH. Impact of hyperglycemia on immune cell function: a comprehensive review. *Diabetol Int*. 2024;15(4):745-760. doi:10.1007/s13340-024-00741-6
153. Cabrera SM, Henschel AM, Hessner MJ. Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl Res*. 2016;167(1):214-227. doi:10.1016/j.trsl.2015.04.011
154. Luo J, Ning T, Li X, Jiang T, Tan S, Ma D. Targeting IL-12 family cytokines: A potential strategy for type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2024;170:115958. doi:10.1016/j.biopha.2023.115958
155. Begum M, Choubey M, Tirumalasetty MB, et al. Adiponectin: A Promising Target for the Treatment of Diabetes and Its Complications. *Life (Basel)*. 2023;13(11):2213. doi:10.3390/life13112213
156. Lau EYM, Carroll EC, Callender LA, et al. Type 2 diabetes is associated with the accumulation of senescent T cells. *Clin Exp Immunol*. 2019;197(2):205-213. doi:10.1111/cei.13344

157. Antar SA, Ashour NA, Sharaky M, et al. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomed Pharmacother.* 2023;168:115734. doi:10.1016/j.biopha.2023.115734
158. Zhu P, Pan XF, Sheng L, Chen H, Pan A. Cigarette Smoking, Diabetes, and Diabetes Complications: Call for Urgent Action. *Curr Diab Rep.* 2017;17(9):78. doi:10.1007/s11892-017-0903-2
159. Śliwińska-Mossoń M, Milnerowicz H. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. *Diab Vasc Dis Res.* 2017;14(4):265-276. doi:10.1177/1479164117701876
160. Zhao K, Dong R, Yu Y, et al. Cigarette smoke-induced lung inflammation in COPD mediated via CCR1/JAK/STAT /NF-κB pathway. *Aging (Albany NY).* 2020;12(10):9125-9138. doi:10.18632/aging.103180
161. Mahmoudzadeh L, Abtahi Froushani SM, Ajami M, Mahmoudzadeh M. Effect of Nicotine on Immune System Function. *Adv Pharm Bull.* 2023;13(1):69-78. doi:10.34172/apb.2023.008
162. Saaoud F, Shao Y, Cornwell W, Wang H, Rogers TJ, Yang X. Cigarette Smoke Modulates Inflammation and Immunity via Reactive Oxygen Species-Regulated Trained Immunity and Trained Tolerance Mechanisms. *Antioxid Redox Signal.* 2023;38(13-15):1041-1069. doi:10.1089/ars.2022.0087
163. Kałużna A, Olczyk P, Komosińska-Vashev K. The role of innate and adaptive immune cells in the pathogenesis and development of the inflammatory response in ulcerative colitis. *J Clin Med.* 2022;11(2):400.
164. Gomez-Bris R, Saez A, Herrero-Fernandez B, et al. CD4 T-cell subsets and the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2696.
165. Kmiec Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci.* 2017;62(1):1–16.
166. Wang S, Wang J, Ma R, et al. IL-10 enhances T cell survival and is associated with faster relapse in patients with inactive ulcerative colitis. *Mol Immunol.* 2020;121(1):92–98.
167. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis.* 2014;8(8):717–725.
168. Papoutsopoulou S, Satsangi J, Campbell BJ, Probert CS. Review article: impact of cigarette smoking on intestinal inflammation direct and indirect mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020;51(12):1268–1285.
169. Nicolaides S, Vasudevan A, Long T, van Langenberg D. The impact of tobacco smoking on treatment choice and efficacy in inflammatory bowel disease. *Intest Res.* 2021;19(2):158–170.
170. Singh N, Bernstein CN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J.* 2022;10(10):1047–1053.

171. Selya AS, Foxon F. Trends in electronic cigarette use and conventional smoking: quantifying a possible 'diversion' effect among US adolescents. *Addiction*. 2021;116(7):1848-1858. doi:10.1111/add.15385
172. Kim CY, Lee K, Lee CM, Kim S, Cho HJ. Perceived relative harm of heated tobacco products and electronic cigarettes and its association with use in smoke-free places: a cross-sectional analysis of Korean adults. *Tob Induc Dis*. 2022;20(1):20. doi:10.18332/tid/145699
173. DeVito EE, Fagle T, Allen AM, *et al*. Electronic nicotine delivery systems (ENDS) use and pregnancy I: ENDS use behavior during pregnancy. *Curr Addict Rep*. 2021;8(3):347–365.
174. Znyk M, Jurewicz J, Kaleta D. Exposure to Heated Tobacco Products and Adverse Health Effects, a Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(12):6651. doi:10.3390/ijerph18126651
175. Smith ML, Gotway MB, Crotty Alexander LE, Hariri LP. Vaping-related lung injury. *Virchows Arch*. 2021;478(1):81-88. doi:10.1007/s00428-020-02943-0
176. St Helen G, Jacob Iii P, Nardone N, Benowitz NL. IQOS: examination of Philip Morris International's claim of reduced exposure. *Tob Control*. 2018;27(Suppl 1):s30-s36. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054321
177. Simonavicius E, McNeill A, Shahab L, Brose LS. Heat-not-burn tobacco products: a systematic literature review. *Tob Control*. 2019;28(5):582-594. doi:10.1136/tobaccocontrol-2018-054419
178. Mallock N., Böss L., Burk R., *et al*. Levels of selected analytes in the emissions of “heat not burn” tobacco products that are relevant to assess human health risks. *Arch. Toxicol*. 2018;92:2145–2149. doi: 10.1007/s00204-018-2215-y.
179. Ruprecht A.A., De Marco C., Saffari A., *et al*. Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. *Aerosol Sci. Technol*. 2017;51:674–684. doi: 10.1080/02786826.2017.1300231.
180. Albadrani MS, Tobaiqi MA, Muaddi MA, *et al*. A global prevalence of electronic nicotine delivery systems (ENDS) use among students: a systematic review and meta-analysis of 4,189,145 subjects. *BMC Public Health*. 2024;24(1):3311. doi:10.1186/s12889-024-20858-2
181. Ward AM, Yaman R, Ebbert JO. Electronic nicotine delivery system design and aerosol toxicants: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(6):e0234189. doi:10.1371/journal.pone.0234189
182. Bravo-Gutiérrez OA, Falfán-Valencia R, Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Ponciano-Rodríguez G, Pérez-Rubio G. Lung Damage Caused by Heated Tobacco Products and Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(8):4079.. doi:10.3390/ijerph18084079
183. Gale N, McEwan M, Eldridge AC, *et al*. Changes in biomarkers of exposure on switching from a conventional cigarette to tobacco heating products: a randomized, controlled study in healthy Japanese subjects. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(9):1220–1227. doi:10.1093/ntr/nty104

184. Polosa R, Morjaria JB, Caponnetto P, et al. Evidence for harm reduction in COPD smokers who switch to electronic cigarettes. *Respir Res.* 2016;17(1):166.
185. Polosa R, Morjaria JB, Prosperini U, et al. Health effects in COPD smokers who switch to electronic cigarettes: a retrospective-prospective 3-year follow-up. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13(1):2533–2542.
186. Kotoulas SC, Katsaounou P, Riha R, et al. Electronic Cigarettes and Asthma: What Do We Know So Far?. *J Pers Med.* 2021;11(8):723. doi:10.3390/jpm11080723
187. Yang X, Che W, Zhang L, Zhang H, Chen X. Chronic airway inflammatory diseases and e-cigarette use: a review of health risks and mechanisms. *Eur J Med Res.* 2025;30(1):223. doi:10.1186/s40001-025-02492-9
188. Murdaugh LB, Miliano C, Chen I, et al. Effect of chronic vapor nicotine exposure on affective and cognitive behavior in male mice. *Sci Rep.* 2024;14(1):6646. doi:10.1038/s41598-024-56766-z
189. Garrett PI, Honeycutt SC, Marston C, et al. Nicotine-free vapor inhalation produces behavioral disruptions and anxiety-like behaviors in mice: Effects of puff duration, session length, sex, and flavor. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021;206:173207. doi:10.1016/j.pbb.2021.173207
190. Montjean D, Godin Pagé MH, Bélanger MC, Benkhalifa M, Miron P. An Overview of E-Cigarette Impact on Reproductive Health. *Life (Basel).* 2023;13(3):827. doi:10.3390/life13030827
191. Djouina M, Ollivier A, Waxin C, et al. Chronic Exposure to Both Electronic and Conventional Cigarettes Alters Ileum and Colon Turnover, Immune Function, and Barrier Integrity in Mice. *J Xenobiot.* 2024;14(3):950-969. doi:10.3390/jox14030053
192. Sharma A, Lee J, Fonseca AG, et al. E-cigarettes compromise the gut barrier and trigger inflammation. *iScience.* 2021;24(2):102035. doi:10.1016/j.isci.2021.102035
193. BinShabaib M, ALHarthi SS, Akram Z, et al. Clinical periodontal status and gingival crevicular fluid cytokine profile among cigarette-smokers, electronic-cigarette users and never-smokers. *Arch Oral Biol.* 2019;102:212-217. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.001
194. Mokeem SA, Alasqah MN, Michelogiannakis D, Al-Kheraif AA, Romanos GE, Javed F. Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1 β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;61:38-43. doi:10.1016/j.etap.2018.05.016
195. ALHarthi SS, BinShabaib M, Akram Z, Rahman I, Romanos GE, Javed F. Impact of cigarette smoking and vaping on the outcome of full-mouth ultrasonic scaling among patients with gingival inflammation: a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2019;23(6):2751-2758. doi:10.1007/s00784-018-2725-2
196. Mravec B, Tibensky M, Horvathova L, Babal P. E-Cigarettes and Cancer Risk. *Cancer Prev Res (Phila).* 2020;13(2):137-144. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0346
197. Mills A, Dakhlallah D, Ranpara A, et al. Pregnancy and Postpartum Effects of Electronic Cigarettes on Maternal Health and Vascular Function in the Fourth Trimester. *Cardiovasc Toxicol.* 2025;25(3):325-340. doi:10.1007/s12012-025-09961-x

198. Wang X, Lee NL, Burstyn I. Smoking and use of electronic cigarettes (vaping) in relation to preterm birth and small-for-gestational-age in a 2016 U.S. national sample. *Prev Med.* 2020;134:106041. doi:10.1016/j.ypmed.2020.106041
199. Kim S, Oancea SC. Electronic cigarettes may not be a "safer alternative" of conventional cigarettes during pregnancy: evidence from the nationally representative PRAMS data. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020;20(1):557. doi:10.1186/s12884-020-03247-6
200. Mohammed HO, Ahmed Alaa El-Din E, Farag AI. Impact of e-cigarettes on colonic mucosa and the role of recovery: involvement of oxidative and inflammatory pathway. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(45):64561-64571. doi:10.1007/s11356-021-15575-x
201. Mi Y, Tan Y, Yu Y, et al. Relationship between smoking status and ulcerative colitis: a meta-analysis based on a case-control study. *Sci Rep.* 2025;15(1):13329. doi:10.1038/s41598-025-97617-9
202. Hayashi S, Hamada T, Zaidi SF, et al. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(10):G968-G978. doi:10.1152/ajpgi.00346.2013
203. Lakhan SE, Kirchgessner A. Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. *J Transl Med.* 2011;9:129. doi:10.1186/1479-5876-9-129
204. Visser W.F., Klerx W.N., Cremers H.W.J.M., Ramlal R., Schwillens P.L., Talhout R. The Health Risks of Electronic Cigarette Use to Bystanders. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019;16:1525. doi: 10.3390/ijerph16091525.
205. Gaur S, Agnihotri R. Health Effects of Trace Metals in Electronic Cigarette Aerosols-a Systematic Review. *Biol Trace Elem Res.* 2019;188(2):295-315. doi:10.1007/s12011-018-1423-x
206. Orellana-Barrios MA, Payne D, Mulkey Z, Nugent K. Electronic Cigarettes—A Narrative Review for Clinicians. *Am J Med.* 2015;128(7):674-681. doi:10.1016/j.amjmed.2015.01.033
207. McAlinden KD, Eapen MS, Lu W, Sharma P, Sohal SS. The rise of electronic nicotine delivery systems and the emergence of electronic-cigarette-driven disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020;319(4):L585-L595. doi:10.1152/ajplung.00160.2020
208. ISO 20778:2018; Cigarettes Routine Analytical Cigarette Smoking Machine—Definitions and Standard Conditions with an Intense Smoking Regime. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2018.
209. ISO. ISO 3402:1999. Tobacco and tobacco products — Atmosphere for conditioning and testing. 1999.
210. ISO. ISO/TR 19478–2:2015. ISO and Health Canada intense smoking parameters—part 2: examination of factors contributing to variability in the routine measurement of TPM, water and NFDPM smoke yields of cigarettes. ISO; 2015.
211. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L; MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of 144 multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013;15:1054-1061.

212. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5.47.1-5.47.20. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70
213. Beauchemin ET, Hunter C, Maurice CF. Dextran sodium sulfate-induced colitis alters the proportion and composition of replicating gut bacteria. *mSphere.* 2025;10(1):e0082524. doi:10.1128/msphere.00825-24
214. Xu HM, Huang HL, Liu YD, et al. Selection strategy of dextran sulfate sodium-induced acute or chronic colitis mouse models based on gut microbial profile. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):279. doi:10.1186/s12866-021-02342-8
215. Saghir SAM, Al-Gabri NA, Khafaga AF, et al. Thymoquinone-PLGA-PVA Nanoparticles Ameliorate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats via Regulation of Inflammatory Cytokines and iNOS Signaling. *Animals (Basel).* 2019;9(11):951.
216. Petrovic I, Pejnovic N, Ljubic B, et al. Overexpression of Galectin 3 in Pancreatic β Cells Amplifies β -Cell Apoptosis and Islet Inflammation in Type-2 Diabetes in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:30. doi:10.3389/fendo.2020.00030
217. Xu H, Cai F, Li P, et al. Characterization and Analysis of the Temporal and Spatial Dynamic of Several Enteritis Modeling Methodologies. *Front Immunol.* 2021;12:727664. doi:10.3389/fimmu.2021.727664
218. Amon L, Dudziak D, Backer RA, et al. Guidelines for DC preparation and flow cytometry analysis of mouse lymphohematopoietic tissues. *Eur J Immunol.* 2023;53(12):e2249893. doi:10.1002/eji.202249893
219. Kim E, Tran M, Sun Y, Huh JR. Isolation and analyses of lamina propria lymphocytes from mouse intestines. *STAR Protoc.* 2022;3(2):101366. doi:10.1016/j.xpro.2022.101366
220. Matsubara T, Takagi M, Uwabo T, Soh J, Toyooka S, Morita M. Comparing the Activity of Peripheral Blood Mononuclear Cells Frozen Under Electromagnetic Field Freezing and Standard Slow-Freezing. *Biomed Res Int.* 2025;2025:9884345. doi:10.1155/bmri/9884345
221. Rajabi H, Mortazavi D, Konyalilar N, et al. Forthcoming complications in recovered COVID-19 patients with COPD and asthma; possible therapeutic opportunities. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):173. doi:10.1186/s12964-022-00982-5
222. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity.* 2022;55(1):31-55. doi:10.1016/j.immuni.2021.12.013
223. Solt LA, Burris TP. Th17 cells in Type 1 diabetes: a future perspective. *Diabetes Manag (Lond).* 2015;5(4):247-250. doi:10.2217/DMT.15.19
224. Rehman K, Haider K, Akash MSH. Cigarette smoking and nicotine exposure contributes for aberrant insulin signaling and cardiometabolic disorders. *Eur J Pharmacol.* 2021;909:174410. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174410
225. Volarevic V, Zdravkovic N, Harrell CR, et al. Galectin-3 Regulates Indoleamine-2,3-dioxygenase-Dependent Cross-Talk between Colon-Infiltrating Dendritic Cells and T Regulatory Cells and May Represent a Valuable Biomarker for Monitoring the Progression of Ulcerative Colitis. *Cells.* 2019;8(7):709. doi:10.3390/cells8070709
226. Tatiya-Aphiradee N, Chatuphonprasert W, Jarukumjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2018;30(1):1-10. doi:10.1515/jbcpp-2018-0036

227. Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM, et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J*. 2010;60(1):7-30.
228. Uguna CN, Snape CE. Should IQOS Emissions Be Considered as Smoke and Harmful to Health? A Review of the Chemical Evidence. *ACS Omega*. 2022;7(26):22111-22124. doi:10.1021/acsomega.2c01527
229. Zhang Q, Jeon J, Goldsmith T, et al. Characterization of an electronic nicotine delivery system (ends) aerosol generation platform to determine exposure risks. *Toxics*. 2023;11(2):99.
230. Greenberg JM, Carballosa CM, Cheung HS. Concise Review: The Deleterious Effects of Cigarette Smoking and Nicotine Usage and Mesenchymal Stem Cell Function and Implications for Cell-Based Therapies. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(9):1815-1821. doi:10.1002/sctm.17-0060
231. Kamel AHM, Kamal SM, AbuBakr N. Effect of smoking on the proliferation capacity and osteogenic potential of human dental pulp stem cells (DPSCs). *Dent Med Probl*. 2020;57(1):19-24. doi:10.17219/dmp/113179
232. Liu S, Ao L, Du B, et al. HPRT mutations in lymphocytes from 1,3-butadiene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect*. 2008;116(2):203-208. doi:10.1289/ehp.10353.
233. Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, Rich AM, Seymour GJ. FoxP3+ regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2018;53(4):622-635. doi:10.1111/jre.12552
234. De la Rosa-Ruiz MDP, Álvarez-Pérez MA, Cortés-Morales VA, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T cells. *Cells*. 2019;8(12):1491. doi:10.3390/cells8121491
235. Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev*. 2019;28(15):995-1003. doi:10.1089/scd.2019.0025
236. Chen XT, Chen LL, Tan JY, Shi DH, Ke T, Lei LH. Th17 and Th1 Lymphocytes Are Correlated with Chronic Periodontitis. *Immunol Invest*. 2016;45(3):243-254. doi:10.3109/08820139.2016.1138967
237. Groenewegen KH, Postma DS, Hop WC, et al. Increased systemic inflammation is a risk factor for COPD exacerbations. *Chest*. 2008;133(2):350-357. doi:10.1378/chest.07-1342
238. Cha SR, Jang J, Park SM, Ryu SM, Cho SJ, Yang SR. Cigarette Smoke-Induced Respiratory Response: Insights into Cellular Processes and Biomarkers. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(6):1210. doi:10.3390/antiox12061210
239. Cook PC, MacDonald AS. Dendritic cells in lung immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):449-460. doi:10.1007/s00281-016-0571-3
240. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:672395. doi:10.1155/2010/672395
241. Freeman CM, Curtis JL. Lung Dendritic Cells: Shaping Immune Responses throughout Chronic Obstructive Pulmonary Disease Progression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(2):152-159. doi:10.1165/rcmb.2016-0272TR

242. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, *et al.* Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a lung tissue research consortium study. *Respir Res.* 2010;11(1):45.
243. Lee KH, Lee J, Jeong J, *et al.* Cigarette smoke extract enhances neutrophil elastase-induced IL-8 production via proteinase-activated receptor-2 upregulation in human bronchial epithelial cells. *Exp Mol Med.* 2018;50(7):1–9.
244. Caruso M, Emma R, Distefano A, *et al.* Electronic nicotine delivery systems exhibit reduced bronchial epithelial cells toxicity compared to cigarette: the Replica Project. *Sci Rep.* 2021;11(1):24182.
245. Richards GA, Theron AJ, van den Bout I, *et al.* Comparison of the effects of electronic cigarette vapours and tobacco smoke extracts on human neutrophils *in vitro*. *ERJ Open Res.* 2023;9(3):00502-2022. doi:10.1183/23120541.00502-2022
246. Leszczyńska K, Jakubczyk D, Górska S. The NLRP3 inflammasome as a new target in respiratory disorders treatment. *Front Immunol.* 2022;13:1006654. doi:10.3389/fimmu.2022.1006654
247. Finch DK, Stolberg VR, Ferguson J, *et al.* Lung dendritic cells drive natural killer cytotoxicity in chronic obstructive pulmonary disease via IL-15R α . *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(9):1140–1150.
248. Danov O, Wolff M, Bartel S, *et al.* Cigarette smoke affects dendritic cell populations, epithelial barrier function, and the immune response to viral infection with H1N1. *Front Med (Lausanne).* 2020;7(1):571003..
249. Shyam Prasad Shetty B, Chaya SK, Kumar V S, *et al.* Inflammatory Biomarkers Interleukin 1 Beta (IL-1 β) and Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Are Differentially Elevated in Tobacco Smoke Associated COPD and Biomass Smoke Associated COPD. *Toxics.* 2021;9(4):72. doi:10.3390/toxics9040072
250. Kubysheva N, Boldina M, Eliseeva T, *et al.* Relationship of Serum Levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and Lung Function Parameters in Patients with COPD, Asthma-COPD Overlap, and Bronchial Asthma. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:4652898. doi:10.1155/2020/4652898
251. Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, *et al.* Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2011;105(11):1648–1654
252. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(7):1126–1167
253. Choudhury P, Biswas S, Singh G, *et al.* Immunological profiling and development of a sensing device for detection of IL-13 in COPD and asthma. *Bioelectrochemistry.* 2022;143:107971. doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107971
254. Yu Y, Zhao L, Xie Y, *et al.* Th1/Th17 Cytokine Profiles are Associated with Disease Severity and Exacerbation Frequency in COPD Patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020;15:1287-1299. doi:10.2147/COPD.S252097
255. Xiong XF, Zhu M, Wu HX, Fan LL, Cheng DY. Immunophenotype in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Respir Res.* 2022;23(1):137. doi:10.1186/s12931-022-02058-x

256. Velotti F, Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Front Immunol.* 2020;11:587581. doi:10.3389/fimmu.2020.587581
257. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2460. doi:10.3390/ijms19082460
258. Ning W, Xu X, Zhou S, et al. Effect of high glucose supplementation on pulmonary fibrosis involving reactive oxygen species and TGF- β . *Front Nutr.* 2022;9:998662. doi:10.3389/fnut.2022.998662
259. Silva BSA, Lira FS, Ramos D, et al. Severity of COPD and its relationship with IL-10. *Cytokine.* 2018;106:95-100. doi:10.1016/j.cyto.2017.10.0180.
260. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23-63. doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
261. Bouquet J, Tabor DE, Silver JS, et al. Microbial burden and viral exacerbations in a longitudinal multicenter COPD cohort. *Respir Res.* 2020;21(1):77. doi:10.1186/s12931-020-01340-0
262. Nițulescu IM, Ciulei G, Cozma A, Procopciuc LM, Orășan OH. From Innate Immunity to Metabolic Disorder: A Review of the NLRP3 Inflammasome in Diabetes Mellitus. *J Clin Med.* 2023;12(18):6022. doi:10.3390/jcm12186022
263. Herder C, Kannenberg JM, Carstensen-Kirberg M, et al. Serum levels of interleukin-22, cardiometabolic risk factors and incident type 2 diabetes: KORA F4/FF4 study. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):17. doi:10.1186/s12933-017-0498-6
264. Becker M, Dirschl SM, Scherm MG, Serr I, Daniel C. Niche-specific control of tissue function by regulatory T cells-Current challenges and perspectives for targeting metabolic disease. *Cell Metab.* 2024;36(2):229-239. doi:10.1016/j.cmet.2023.12.019
265. Tuomela K, Levings MK. Genetic engineering of regulatory T cells for treatment of autoimmune disorders including type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2024;67(4):611-622. doi:10.1007/s00125-023-06076-2
266. Herold KC, DeLong T, Perdigo AL, Biru N, Brusko TM, Walker LSK. The immunology of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol.* 2024;24(6):435-451. doi:10.1038/s41577-023-00985-4
267. Ware MB, ElRayes BF, Lesinski GB. Mirage or long-awaited oasis: reinvigorating T-cell responses in pancreatic cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8:e001100. doi:10.1136/jitc-2020-001100
268. Chung S, Sundar IK, Hwang JW, et al. NF- κ B inducing kinase, NIK mediates cigarette smoke/TNF α -induced histone acetylation and inflammation through differential activation of IKKs. *PLoS One.* 2011;6(8):e23488. doi:10.1371/journal.pone.0023488
269. Talhout R, Schulz T, Florek E, et al. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(2):613–628.
270. Guo H, Ahn S, Zhang L. Benzene-associated immunosuppression and chronic inflammation in humans: a systematic review. *Occup Environ Med.* 2020;2020(1):106517.

271. Lynch HN, Kozal JS, Russell AJ, et al. Systematic review of the scientific evidence on ethylene oxide as a human carcinogen. *Chem Biol Interact.* 2022;364:110031. doi:10.1016/j.cbi.2022.110031
272. Li XJ, Li B, Huang JS, et al. Effects of acrylonitrile on lymphocyte lipid rafts and RAS/RAF/MAPK/ERK signaling pathways. *Genet Mol Res.* 2014;13(3):7747–7756.
273. Yu YY, Jin H, Lu Q. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immunity. *J Transl Autoimmun.* 2022;5:100177. doi:10.1016/j.jtauto.2022.100177
274. Zhao J, Lu Q, Liu Y, et al. Th17 Cells in inflammatory bowel disease: cytokines, plasticity, and therapies. *J Immunol Res.* 2021;2021(1):8816041.
275. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2018;11(1):1756284818793558.
276. Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol.* 2017;52(7):777–787
277. Zong Y, Deng K, Chong WP. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules. *Front Immunol.* 2024;15:1387975. doi:10.3389/fimmu.2024.1387975

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Магистар фармације Николина Кастратовић рођена је 23.11.1995. године у Пећи. Основну и средњу школу завршила је као носилац дипломе „Вук Караџић”. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је 2014. године, а дипломирала 2019. са просечном оценом 9,10 (9 и 10/100). По Конкурсу за стипендирање најбољих студената завршне године основних и интегрисаних академских студија, добила је стипендију “Доситеја”. Уписала је докторске студије-Докторска школа-медицинске науке, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија 2019. године и постаје стипендиста Министарства науке, технолошког развоја и иновација. Маг. фарм. Николина Кастратовић је завршила два мастер програма: Регенеративна медицина и Биоинжењеринг. Тренутно је запослена као асистент за ужу научну област Медицинска генетика. Добитник је награде Факултета медицинских наука за “Најбољи публикован рад у категорији базичне науке” у 2023. години. Део докторске дисертације о утицају CCs и ENDS-а на регенеративни потенцијал PDL-MSCs је награђен од Центра изузетних вредности за смањење редукције штетности (енгл. *Center of Excellence for the Acceleration of Harm Reduction*, CoEHAR) са седиштем у Катањи, Италији, у категорији “Најбољи млади таленат 2023”. У 2024. години је добила награду “Најбољи млади истраживач” коју је доделио Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Маг. фарм. Николина Кастратовић је члан Удружења токсиколога Србије и ментор у Центру за рад са талентованим ђацима регионалног Центра за образовање у Крагујевцу. На бројним међународним научним скуповима је презентovala резултате истраживања у којима је учествовала.

БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА

1. **Kastratovic N**, Cekerevac I, Sekerus V, et al. Effects of combustible cigarettes and heated tobacco products on immune cell-driven inflammation in chronic obstructive respiratory diseases. *Toxicol Sci.* 2024;200(2):265-276. doi:10.1093/toxsci/kfae068
2. **Kastratovic N**, Zdravkovic N, Cekerevac I, et al. Effects of Combustible Cigarettes and Heated Tobacco Products on Systemic Inflammatory Response in Patients with Chronic Inflammatory Diseases. *Diseases.* 2024;12(7):144. doi:10.3390/diseases12070144
3. **Kastratovic N**, Markovic V, Arsenijevic A, et al. The Effects of Combustible Cigarettes and Electronic Nicotine Delivery Systems on Immune Cell-Driven Inflammation and Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. *Nicotine Tob Res.* 2025;27(3):542-552. doi:10.1093/ntr/ntae193
4. **Kastratovic N**, Arsenijevic A, Harrell CR, et al. Effects of combustible cigarettes and electronic nicotine delivery systems on immune cell-driven inflammation: Evidences from diabetic patients and multiple low dose streptozotocin-treated diabetic mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 2024;38(9):e23841. doi:10.1002/jbt.23841
5. **Kastratovic N**, Milosevic-Djordjevic O, Harrell CR, Djonov V, Volarevic V. Effects of combustible cigarettes and electronic nicotine delivery systems on the regenerative properties of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament (PDL-MSCs). *Histol Histopathol.* 2025;40(7):1041-1049. doi:10.14670/HH-18-854
6. **Kastratovic N**, Markovic V, Harrell CR, et al. Effects of Combustible Cigarettes and Electronic Nicotine Delivery Systems on the Development and Progression of Chronic Lung Inflammation in Mice. *Nicotine Tob Res.* 2024;26(6):704-714. doi:10.1093/ntr/ntad235

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

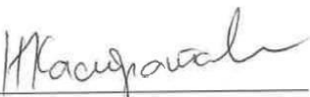
„Утицај дуванског дима конвенционалних цигарета и аеросола електронских уређаја за испоруку никотина на регенеративни потенцијал мезенхималних матичних ћелија и инфламацију у хроничним инфламацијским болестима“

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,

У Крагујевцу, 15.04.2026. године,


потпис аутора

Николина Д. Кастратовић

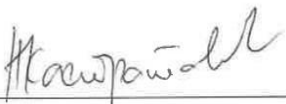
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Утицај дуванског дима конвенционалних цигарета и аеросола електронских
уређаја за испоруку никотина на регенеративни потенцијал мезенхималних
матичних ћелија и инфламацију у хроничним инфламацијским болестима“**

истоветне.

У Крагујевцу, 15.04.2026. године,



потпис аутора

Николина Д. Кастратовић

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Николина Д. Кастратовић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

„Утицај дуванског дима конвенционалних цигарета и аеросола електронских уређаја за испоруку никотина на регенеративни потенцијал мезенхималних матичних ћелија и инфламацију у хроничним инфламацијским болестима“

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, 15.04.2026. године,



потпис аутора

Николина Д. Кастратовић

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/>