

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a od 19.03.2015. godine, broj 4600/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sci dr Lidije Zolotarevski, zaposlene u Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu u Institutu za patologiju i sudsku medicinu i kao asistent za predmet patologija na Katedri za morfološke nauke Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu, pod nazivom: „**MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE PROMENE U KOŽI PACOVA NAKON EPIKUTANE APLIKACIJE VARFARINA**“. Mentor doktorske disertacije je je Prof. dr Svetislav Tati redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, komentor je Prof. dr Milena Kataranovski redovni profesor na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku Biološkog fakulteta Univerzitet u Beogradu

U komisiju su imenovani:

1. Prof. dr Dimitrije Brašanac - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Danijela Dobrosavljevi - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Goran Brajuškovi - Biološki fakultet Iniverziteta u Beogradu

Ilanovi Komisije su detaljno prou ili priloženu doktorsku disertaciju i podnose Nau no-nastavnom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

IZVEŠTAJ

A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Lidije Zolotarevski „**MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE PROMENE U KOŽI PACOVA NAKON EPIKUTANE APLIKACIJE VARFARINA**“ napisana je na 240 strana A4 formata i sadrži 7 šema, 77 dijagrama i 84 kompozitnih slika. Podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura.

Poglavlje **UVOD** sadrži 48 stranica, a podeljeno je u tri velika naslova: **Struktura i funkcija kože** gde je koža definisana kao kompleksna telesna barijera prema spoljašnjoj sredini, koja obezbeđuje fizikohemijsku, imunološku i toksikološku zaštitu i održavanje homeostaze organizma. Funkcionalna histologija epiderma i derma je prikazana uz naglasak na mehanizme apsorpcije i dejstva egzogenih supstanci na nju. U poglavlju **Odbrambeni sistemi kože** detaljno su opisani odbrambeni sistemi kože sa posebnim osvrtom na funkciju barijere, ulogu T limfocita, mastocita i antioksidativne sisteme u koži. U poglavlju **Koža kao meta delovanja ksenobiotika** navedeni su patofiziološki mehanizmi ošte enja kože nakon dejstva razli itih fizi kih i hemijskih agenasa, uklju uju i oksidativni stres, mehanizme ošte enja elija, poreme aje elijskog ciklusa keratinocita i barijerne funkcije kože, i

imunomodulatorno - imunotoksi no dejstvo ksenobiotika. Opisana je uloga varfarina kao rodenticida i mehanizmi njegovog delovanja. Dat je dosadašnji pregled literature o njegovim nepovoljnim dejstvima na organizam sa posebnim osvrtom na kožu. Navedena su dosadašnja istraživanja o efektima i mehanizmima lokalnog epikutanog i perkutanog dejstva primene malih doza varfarina.

Tekst je upotpunjen sa sedam šema i jednom tabelom.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su napisani na jednoj stranici i primereno obrazlažu istraživanje i metodološki pristup. Izdvojena su 4 glavna cilja: 1. Ispitati dinamiku promena u oksidativnom metabolizmu kože, analizom osnovnih parametara oksidativnog stresa u homogenatu kože uklju uju i: nivo ukupnih sulfhidrilnih grupa, nivo redukovanog glutationa, nivo malon-dialdehida, pokazatelja lipidne peroksidacije. 2. Ispitati dinamiku promena u epidermu preko: analize promena debljine epiderma, broja slojeva keratinocita i TUNEL⁺ elija, imunohistohemijske analize (Ki67 i PCNA) i broja i morfometrijskih karakteristika pozitivnih elija. 3. Ispitati dinamiku promena u dermu: analizom broja dermalnih mezenhimnih elija, mastocita, T limfocita i dermalnih mikrovaskularnih prostora, morfometrijskom analizom mastocita, dermalnih mikrovaskularnih prostora i dla nih folikula, ispitati promene dermalnog ekstracelularnog matriksa trodimenzionalnom rekonstrukcijom uz pomo konfokalne mikroskopije. 4. Ispitati (svetlosnomikroskopski i ultrastrukturno) dinamiku strukturnih promena epiderma, dermalnog vezivnog tkiva i dermalnih mikrovaskularnih prostora i folikula.

MATERIJAL I METODE su napisani na sedam strana. Opisan je eksperimentalni model i protokol epikutane aplikacije varfarina na ukupno 37 pacova (tri životinje u svakoj tretiranoj grupi, po jedna tretirana kontrolna životinja i jedna netretirana kontrolna životinja) inbrednog soja Dark Agouti (DA), uz detaljan opis njihovog uslova uvanja. Svi eksperimentalni postupci su vršeni u skladu sa principima Eti kog komiteta Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stankovi ". Precizno su navedeni na in davanja i vremenski intervali žrtvovanja pacova nakon epikutane aplikacije varfarina i na in uzorkovanja tkiva kože za dalja ispitivanja. Metodološki pristup objašnjen je posebnim odeljcima: biohemijske analize selektivnih parametara oksidativnog stresa (malondialdehida, sulfhidrilnih grupa i nivoa redukovanog glutationa) u homogenatu kože, histohemijske analize (Hematoksilin i eozin, Masson trichrom, Lendrum, Elastica Van Gieson, PAS i Giemsa), imunohistohemijske analize (linijski marker CD3 za T limfocite, markeri elijske proliferacije- Ki67, apoptoze- TUNEL test i odgovora na elijsko ošte enje-PCNA). Opisana je i metodologija pripreme tkiva za ultrastrukturnu analizu i konfokalnu mikroskopiju kao i principi morfometrijskih analiza digitalnih fotografija mikroskopskih preparata uzoraka tkiva. Poslednji odeljak ovog poglavlja disertacije odnosi se na koriš ene statisti ke metode u obradi podataka.

Originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju izneti su u poglavlju **REZULTATI**, koje sadrži 93 stranice. Rezultati su pregledno i sistemati no predstavljeni u formi 77 grafikona i 84 kompozitne slike, a sistematizovani su u skladu sa postavljenim ciljevima. Ovo poglavlje po inje odeljkom **Analiza oksidativnog metabolizma** gde su podaci sistematizovani kao promene nivoa lipidne peroksidacije, ukupnih sulfidrilnih grupa i

redukovanog glutationa u homogenatima kože. Odeljak **Promene u epidermu** odnosi se na prikaz promena debljine epiderma, broja slojeva keratinocita, promena broja TUNEL⁺, Ki67⁺ i PCNA⁺ elija u epidermu, kao i prikaz morfometrijskih karakteristika (površina, obim, opti ka gustina i cirkularnost) Ki67⁺ i PCNA⁺ elija u epidermu. Odeljak **Promene u dermu** prikazuje: promene broja dermalnih mezenhimnih elija, njihovu proliferativnu i sintetsku aktivnost i ultrastrukturnu analizu, promene broja i morfometrijske karakteristike mastocita (opti ka gustina, površina, obim, cirkularnost i odnos najveće i najmanje prenika) i njihovu ultrastrukturnu analizu. U okviru ovog poglavlja prikazane su promene ukupnog broja T limfocita u koži i njihova zastupljenost u epidermu, dermu i epitelu folikula. Prikazan je i broj i izgled dermalnih mikrovaskularnih prostora, kako svetlosno mikroskopski, tako i ultrastrukturno, i morfometrijska analiza lumena njihovih poprečnih preseka (površina, obim, cirkularnost i debljina njihovih zidova). Takodje je prikazana morfometrijska analiza (površine i obima) lumena poprečnih preseka velikih sebacealnih folikula i infundibuluma i istmusa malih sebacealnih folikula i prisustvo TUNEL⁺ elija u sebacealnim žlezdama velikih sebacealnih folikula. Svi podaci su prikazani kao efekti pojedinačnih doza u okviru istog termina i njihova dozno-vremenska dinamika. Opisno su analizirane promene ekstracelularnog matriksa u dermu: prisustvo edema, promene kolagenih vlakana nakon trodimenzionalne rekonstrukcije uz pomoć konfokalnog mikroskopa i promene elastičnih vlakana i njihova organizacija oko dlačnih folikula.

DISKUSIJA dobijenih rezultata napisana je na 45 stranica. Na detaljan način analizirani su dobijeni rezultati. Povezivanjem dozno zavisnih promena i udruženosti više dobijenih efekata, analizirani su mogući mehanizmi dejstva epikutano aplikovanog varfarina. Diskusija po inje poglavljem **Analiza oksidativnog metabolizma u koži** gde su komparativno analizirani dobijeni rezultati sa podacima iz literature uz objašnjenje dobijenih nalaza a u vezi oksidativnog stresa. U poglavlju **Analiza promena u epidermu** komparativno su analizirani dobijeni rezultati sa podacima iz literature, uz objašnjenje dobijenih nalaza, o histomorfološki uočenim promenama strukture epiderma i imunohistohemijski detektovanim promenama elijskog ciklusa epidermalnih elija. Detaljno su razmatrane morfometrijske karakteristike Ki67⁺ i PCNA⁺ jedara u epidermu a u vezi sa efektima mitotskog bloka i endoreduplikacijom keratinocita. U poglavlju **Analiza dermalnih mezenhimnih elija**, uz bogato dokumentovanu literaturu, analizira se ultrastrukturni nalaz apoptoze, toksične oštećenja i pojačane sintetske aktivnosti dermalnih fibroblasta i imunohistohemijski detektovane promene njihove proliferativne i sintetske aktivnosti sa posebnim osvrtom na reparatornu aktivnost PCNA molekula. U poglavlju **Analiza dermalnih mastocita** detaljno su poredjeni rezultati doktorske disertacije i literaturni podaci o njihovoj pojačanoj degranulaciji prvog dana i uticaju na dermalne fibroblaste i epiderm. U poglavlju **Analiza T limfocita** razmatran je njihov epidermotropizam i folikulotropizam a rezultati su poredjeni sa literaturnim podacima u smislu mehanizama koji dovode do ovih efekata. U poglavlju **Analiza promena u dlačnim folikulima** morfometrijski nalazi su poredjeni sa literaturnim podacima o njihovoj pojačanoj funkcionalnoj aktivnosti, naročito u sebacealnim žlezdama. U okviru šireg poglavlja **Analiza mikrovaskularnih prostora derma** studiozno su analizirani dobijeni morfometrijski podaci, uz bogato poredjenje sa literaturom, o remodeliranju i hemodinamskim promenama dermalne mikrocirkulacije sa osvrtom i na uticaj detektovane mastocitne aktivnosti. U poglavlju **Efekti hormone** komparativnom analizom sa literaturom i

sintezom dobijenih rezultata analiziran je hormeti ki efekat epikutano aplikovanog varfarina na epiderm, dermalne mezenhimne elije, dermalnu mikrocirkulaciju i mastocite i na imuni sistem kože.

Poglavlje **ZAKLJU AK** je izneto na 2 stranice u formi jasno definisanih i nedvosmislenih konstatacija, a ova kvalifikacija se odnosi na itavu doktorsku disertaciju.

U poglavlju **LITERATURA** citirano je 508 bibliografskih jedinica iz najreferentnijih me unarodnih i doma ih asopisa, uklju uju i i publikacije u kojima je kandidat bio autor i koautor.

B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Ovo istraživanje je pokazalo da epikutano aplikovan varfarin ima lokalni proinflamatorni, prooksidativni i imunomodulatorni efekat, a zavisno od aplikovane doze i direktan imunotoksi ni i dermatotoksi ni efekat. Histomorfološka analiza je pokazala promene u koži koje mogu, sa jedne strane, da odražavaju inflamatorno-reparatorni program, ali, sa druge, da predstavljaju uvod u patološke doga aje u koži. Uo ene dozno-vremenski zavisne promene analiziranih parametara pokazuju i efekte hormoneze.

Ispitani su efekti jednokratne lokalne epikutane aplikacije varfarina na kožu kod Dark Agouty pacova u dozama od 1 μ g, 10 μ g i 100 μ g i analizirana je sedmodnevna dinamika promena u koži.

Epikutano aplikovan varfarin u dozi od 1 μ g stimuliše prooksidativno i proinflamatorno dejstvo (kratkotrajna stimulacija mastocita i T limfocita) i prolazne adaptivno reparatorne promene u koži (kratkotrajnu stimulaciju proliferativne i sintetske aktivnosti elija u epidermu, sa promenom kožne barijere putem poja ane keratinizacije i funkcionalnim promenama u dermalnim fibroblastima, kapilarima i folikulima).

U dozi od 10 μ g varfarin indukuje imunomodulatorne efekte (kratkotrajni imunostimulatorni efekat u epidermu i dermu i prolongiran u folikularnom epitelu), prolazne adaptivno reparatorne promene (funkcionalne i morfološke promene mitotski i sintetski aktivnih epidermih elija, aktivaciju i adaptaciju dermalnih fibroblasta, stimulaciju funkcionalnih promena sebacealnih žlezda i dermalnih kapilara i angiogenezu), uz prolongirano narušavanje oksidativnog metabolizma.

U dozi od 100 μ g varfarin ispoljava imunotoksi no i dermatotoksi no dejstvo, uz najve i stepen oksidativnog stresa i iscrpljivanje antioksidativnih mehanizama (indukcijom oksidativnog ošte enja, supresijom proliferativne aktivnosti epiderma, ošte enjem elija derma i dermalnih kapilara, prolongiranom hiperstimulacijom sebacealnih žlezda, angiogeneze i imuno-inflamatornog odgovora).

Dobijeni nalazi ukazuju na nove mehanizme dejstva ovog ksenobiotika u koži, a mogu da pomognu u sagledavanju do sada nedovoljno istraženih simptoma i patoloških stanja u koži kod profesionalne izloženosti, kao i neželjenih efekata varfarinske terapije, kakav je npr. kontaktni tip dermatitisa.

C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Program za profesionalno zdravlje (Environmental Health Criteria, EHC) Svetske zdravstvene organizacije klasifikovao je varfarin kao veoma opasni hemijski agens i dao preporuke za ispitivanje njegovih štetnih posledica (WHO, 1995). Relativno mali broj eksperimentalnih studija bavio se istraživanjem lokalnih efekata malih doza kumarinskih rodenticida na kožu. Nema radova koji se bave preciznijom dozno-vremenski zavisnom dinamikom promena u koži nakon akutne (jednokratne) primene.

U ovom radu nakon epikutane primene 1 μ g, 10 μ g i 100 μ g varfarina utvrđene su promene oksidativnog metabolizma u homogenatu tretirane kože koje ukazuju na postojanje lipidne peroksidacije i potrošnju intracelularnih reduktanata, kao što su protein tioli i GSH. Dobijeni rezultati ukazali su da varfarin uzrokuje peroksidaciju lipida elijskih membrana keratinocita i drugih elija u koži i oksidativno ošte enje. Ovakvi nalazi u skladu su sa po etnim istraživanjima bioloških posledica epikutane primene varfarina kod laboratorijskih pacova nakon 24^h koja su pokazala pove anje prooksidativne aktivnosti u homogenatima tkiva kože (Kataranovski, et al. 2005; Popov, et al. 2011).

U ovoj disertaciji histomorfološki, morfometrijski i imunohistohemijski u ene promene strukture epiderma i elijskog ciklusa epidermnih elija ukazale su na dozno-vremenski zavisn, kratkotrajan i prolongiran, adaptivni i reparatorni odgovor epiderma uzrokovan poreme ajem i ošte enjem epidermalne barijere koji je povezan sa promenama debljine epiderma, elijskog ciklusa keratinocita, diferencijacije i ošte enja epidermnih elija. Progresivni porast broja TUNEL⁺ elija, u površnim slojevima epiderma od prvog do sedmog dana, korelirao je sa uspostavljanjem (tre eg dana) i održavanjem granularnog sloja (do sedmog dana). Ovakav nalaz TUNEL⁺ elija u skladu su sa istraživanjima da je kornifikacija, prema klasifikaciji oblika elijske smrti, specifi an oblik apoptoze ali i proces terminalne diferencijacije keratinocita (Koemer, et al. 2012; Lippens, et al. 2005). Nakon primene 1 μ g varfarina signifikantni progresivni porast debljine epiderma od prvog do sedmog dana, udružen sa PCNA aktivnoš u epidermalnih elija prvog dana i relativnim (nesignifikantnim) porastom broja proliferativno aktivnih elija tre eg dana, ukazuje na fiziološku varijaciju elijskog ciklusa keratinocita. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima koja ukazuju da u uslovima iznenadnog disbalansa homeostaze epiderma, u toku ošte enja, keratinociti mogu imati razli ito trajanje mitotskog ciklusa (Jones and Watt, 1993). Nakon dejstva 10 μ g varfarina, diskretno smanjenje proliferativne aktivnosti epidermnih elija prvog i tre eg dana bilo je udruženo sa signifikantnim porastom njihove PCNA aktivnosti ve prvog dana. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima o fiziološkoj reparatornoj ulozi PCNA (Paunesku, et al. 2001; Maga and Hubscher, 2003). Manifestno smanjenje debljine epiderma tre eg dana bilo je udruženo sa poja anom kornifikacijom, što je u skladu sa istraživanjem morfometrijskih karakteristika elija epiderma miša koje je pokazalo da postoji inverzna veza

između prose ne veli ine keratinocita i stepena njihove keratinizacije (Rowden, 1975). Nakon primene doze od 100µg varfarina, ve prvog dana, ultrastrukturno je uo ena nekroza grupa bazalnih keratinocita i signifikantno smanjenje njihove proliferativne aktivnosti. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima koja ukazuju da je ve i stepen ošte enja stem elija epiderma povezan sa smanjenjem proliferativne aktivnosti keratinocita (Sontheimer, 2009). U radu je sugerirano da pove anje debljine epiderma nakon ove doze varfarina uz smanjenje keratinizacije sedmog dana verovatno povezano sa degenerativnim procesima u keratinocitima.

Na osnovu analize promena broja i morfometrijskih karakteristika Ki67⁺ i PCNA⁺ jedara keratinocita u epidermu procenjena je njihova funkcionalna aktivnost. Dinamika ovih promena ukazuje da je efekat na proliferativnu aktivnost epidermnih elija koji indukuje najmanja doza varfarina, iako stimulatoran, u fiziološkim granicama. Interesantno je da srednja doza uzrokovala samo morfološke promene Ki67⁺ jedara, bez zna ajne promene njihovog broja. Neposredni supresivni efekat na proliferaciju elija u epidermu, koje je uzrokovala najve a doza prvog dana, zajedno sa pojavom jedarne iregularnosti prvog i tre eg dana u skladu je sa istraživanjima koja pokazuju da su ovakve morfološke promene posledica dejstva štetnog agensa na keratinocite kada oni blokiraju proliferaciju epidermnih stem elija (mitotski blok) i mogu da se diferenciraju endoreduplikacijom (Zanet, et al. 2010; Edgar, 2001). Dinamika promena PCNA⁺ elija u epidermu (pove anje/smanjenje, u zavisnosti od primenjene doze, rano nakon tretmana sa povratkom na kontrolne vrednosti na kraju ispitivanog perioda) je u skladu su sa ulogom PCNA molekula u reparaciji DNK ošte enja (Paunesku, et al. 2001; Maga and Hubscher, 2003). Morfometrijske karakteristike PCNA⁺ jedara ukazale su na mogu e postojanje endoreduplikacije u jedrima prvog dana nakon primene najve e doze varfarina i tre eg nakon primene srednje doze (Zanet, et al. 2010; Edgar, 2001).

Nakon svake od primenjenih doza varfarina prvog dana je utvrđeno smanjenje broja dermalnih mezenhimnih elija. Prisustvo fibroblasta sa ultrastrukturnim znacima apoptoze u skladu je sa istraživanjima koja ukazuju da je apoptoza, kao kontrolisani tip elijske smrti, i vrsta adaptacije elije na stresne uslove u spoljašnjoj sredini i probleme unutar same elije (Alford and Randhawa, 2000; Matsuzava and Ichijo, 2005). Nakon primene 100µg varfarina inicijalno smanjenje broja dermalnih mezenhimnih elija i smanjenje njihove proliferativne aktivnosti prvog dana je bilo udruženo sa detekcijom ultrastrukturnih promena fibroblasta karakteristi nih za toksi no ošte enje. U istom terminu sintetska aktivnost njihovih jedara je zna ajno porasla, što je bilo pra eno i njihovom naknadnom poja anom proliferativnom aktivnoš u tre eg i sedmog dana. Ovakvi nalazi ukazuju da epikutana aplikacija 100µg varfarina ispoljava dermatotoksi ni efekat ve prvog dana, i u dermu, što uti e i na smanjenje njihove proliferativne aktivnosti. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima da odgovor elije na genotoksi ni stres može biti ošte enje, ne samo DNK, ve i elijskih receptora za faktore rasta i citokine (Durocher and Jackson, 2001; Canman and Kastan, 1996). Oksidativna modifikacija tiola u tirozin-kinaznim receptorima za faktore rasta dovodi do njihove autofosforilacije i aktivacije (Dröge, 2002; Chen, et al. 1998). Direktnan toksi ni efekat na dermalne fibroblaste, uo en ultrastrukturno kao apoptoza i toksi no ošte enje, udružen je i sa najve im stepenom oksidativnog stresa i iscrpljenjem antioksidativnih mehanizama u koži.

Dobijeni rezultati ukazuju da bi prooksidativni efekat varfarina mogao imati uticaja na signalnu aktivnost u koži. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima koja opisuju, da pod dejstvom varfarina kod makrofaga, nastaje indukcija fosforilacije I B, koji je neophodan za aktivaciju transkripcionog faktora NF- B (Kater, et al. 2002) kao i da dikumarol indukuje sintezu stresom aktivirane protein kinaze (SAPK) (Cross, et al. 1999).

Analizom distribucije i promena broja T limfocita u koži tretiranih životinja uo en je dozno-zavisan imunomodulatorni efekat epikutano aplikovanog varfarina na zastupljenost T limfocita i njihov epidermotropizam. Ovakvi nalazi u skladu su sa eksperimentalnim istraživanjima na laboratorijskom soju pacova, u kojima je utvrđeno da epikutano aplikovan varfarin pokazuje lokalno proinflamatorno dejstvo u koži kada keratinociti sti u pove an kapacitet da stimulišu aktivaciju i proliferaciju T limfocita i da produkuju solubilne faktore aktivacije T limfocita, kao što je TNF- (Kataranovski, et al. 2005; Popov, et al. 2011). Derm je prirodno stanište konvencionalnih T limfocita, a varfarin indukuje porast broja T limfocita u ovom delu kože. Najve a doza varfarina pokazala je najve i efekat u koži pacova jer je uzrokovala perzistentan porast broja T limfocita u svim strukturama kože. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima kumarinskih derivata auraptena i varfarina, koji kao egzogeni agensi, u *in vitro* i *in vivo* uslovima indukuju keratinocite na poja anu produkciju proinflamatornih citokina IL-1 i TNF- , koji privla e T limfocite u derm (Tanaka, et al. 1990; Popov Aleksandrov, et al. 2014). Preciznije, prolongirana produkcija IL-1 i produkcija IL-17 od strane epidermnih elija stimuliše dermalnu akumulaciju i epidermotropizam T limfocita pod dejstvom egzogenog varfarina (Popov Aleksandrov, et al. 2014). Nakon dejstva srednje i najve e doze varfarina uo eno je protrahovano prisustvo intraepitelnih T limfocita u folikulima, kao i poja ana funkcija sebacealnih žlezda (dilatacija infundibuluma i istmusa folikula i poja ana sekretorna aktivnost) Autor sugeriše potrebu za detaljnijim istraživanjem uo ene povezanosti folikulotropizma T limfocita sa imunologijom folikularnog organa u cilju definisanja uloge sebacealnih žlezda i T limfocita u ovim procesima.

Imunomodulatorni efekat varfarina je pokazan i na nivou mastocita. Svaka od aplikovanih doza varfarina ve prvog dana stimulisala je zna ajno pove anje broja i funkcionalnu aktivaciju mastocita, sa njihovom masivnom degranulacijom do tre eg dana i povratkom na po etne vrednosti sedmog dana. Najve a doza varfarina indukovala je najve i stepen morfoloških i funkcionalnih promena mastocita u smislu prolongiranog smanjenja njihovog broja i usporenijeg oporavka funkcije. Ovakvi nalazi ukazuju da i varfarin stimuliše hiperplaziju i funkcionalnu aktivaciju mastocita, što je u skladu sa istraživanjima da je lokalno pove anje broja mastocita u tkivu nakon dejstva razli itih stresora posledica njihove proliferacije, prolongiranog preživljavanja i lokalne redistribucije – regrutacije okolnih zrelih mastocita (Hamaguchi, et al. 1987; Kambre, et al. 2001). Promene mast elija pod delovanjem varfarina su u skladu sa savremenim podacima o mast elijama kao bitnoj elijskoj komponenti imunskog sistema kože u odgovoru na razli ite nokse (Dawicki and Marshall, 2007; Abraham and John, 2010).

Sve primenjene doze varfarina su stimulisale remodeliranje dermalne mikrocirkulacije: inicijalnu poja anu obliteraciju sa kasnijom elongacijom i pove anjem broja mikrovaskularnih prostora. Najmanja i najve a doza varfarina su stimulisale i prolongiranu

dilataciju dermalnih mikrovaskularnih prostora do sedmog dana, s tim što je ona bila najizraženija trećeg dana, u vreme degranulacije mastocita. Ovakvi nalazi u skladu su sa poznatim uticajem sekretornih produkata mastocita na morfološku adaptaciju i hemodinamske promene u mikrocirkulaciji u različitim fiziološkim i patološkim stanjima (Theoharides, et al. 2012). Srednja doza varfarina je prvog dana stimulisala vazokonstrikciju, sa naknadnom prolongiranom dilatacijom. Ova vazokonstrikcija je bila udružena sa detekcijom fenotipske adaptacije dermalnih mastocita, prvog i trećeg dana, u vretenaste elije. Ovakav nalaz u skladu je sa istraživanjima koja potvrđuju da je vretenasta morfologija mastocita udružena sa kontraktilnom funkcijom tkiva u kome se oni nalaze (Stefanov, et al. 2007; Hristov, et al. 2008).

Analizom ukupnog broja dermalnih mikrovaskularnih prostora utvrđeno je da se njihov broj prvog dana značajno smanjio, srazmerno primenjenim dozama varfarina, što je bilo povezano sa njihovom obliteracijom i ultrastrukturnim nalazom apoptoze i nekroze endotela i pericita, već nakon primene i najmanje i srednje doze. Ovakvi nalazi u skladu su sa istraživanjima koja ukazuju da redoks signalni sistem, koji ima svoje fiziološke funkcije, može da posreduje u pokretanju poremećaja endotelne funkcije putem aktivacije receptora endotelne elije koji indukuju njihovu smrt (Li, et al. 2007). Srednja i najveća doza varfarina su uzrokovale porast ukupnog broja dermalnih mikrovaskularnih prostora sedmog dana i njihovu elongaciju, tj. vaskularno remodeliranje/angiogenezu u dermu, što je u skladu sa istraživanjima koja ukazuju da su intususcepcija i pupljenje dva komplemetarna mehanizma dinamiki remodeliranja i adaptacije mikrovaskulature na izmenjene hemodinamske uslove u tkivu (Jain, 2003). Ovakvi nalazi u skladu su i sa istraživanjima koja ukazuju da među osnovne pokrete angiogeneze spada i oksidativni stres (Pugh and Ratcliffe, 2003) a poznato je da se i mastociti akumuliraju na mestima aktivne angiogeneze gde svojom degranulacijom uzrokuju neovaskularizaciju (Norrby and Sorbo, 1986).

D) OBJAVLJENI ILI SAOPŠTENI REZULTATI KOJI SU U VEŠTAČENJU I NE DEO TEZE

Zolotarevski L, Jović M, Popov Aleksandrov A, Milosavljević P, Brajusković G, Demenescu J, Mirkov I, Ninkov M, Kataranovski D, and Kataranovski M. Skin response to epicutaneous application of anticoagulant rodenticide warfarin is characterized by differential time- and dose-dependent changes in cell activity. *Cutan Ocul Toxicol*, Early Online: 1–8. DOI: 10.3109/15569527.2015.1008701

E) ZAKLJUČAK (OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE)

Doktorska disertacija **“Morfološke i funkcionalne promene u koži pacova nakon epikutane primene varfarina”** kandidata Lidije Zolotarevski, magistra medicinskih nauka, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju specifičnosti reakcije kože na egzogeno dejstvo jednokratne primene malih doza varfarina. Pokazana varijabilnost i dinamika odgovora kože od adaptivnog do dermatotoksičnog upu uje na različite mehanizama dejstva primenjenih doza varfarina. Uočena udruženost više mehanizama nakon dejstva pojedinačne doze varfarina ukazuje na imunomodulatorni i imunotoksični / dermatotoksični efekat. Ovakvo utvrđeni efekti mogu biti od značaja za razumevanje nekih nedovoljno jasnih patoloških

stanja u koži, naročito kod profesionalne izloženosti antikoagulantnim rodenticidima, ali i neželjenih dejstava varfarinske terapije, i uopšteno, u daljem istraživanju različitih egzogenih stresora koji narušavaju kožnu barijeru i njene adaptivno reparatorne mehanizme. Posebno interesantan aspekt istraživanja je analiza efekata hormona varfarina kao ksenobiotika.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju magistra medicinskih nauka Lidije Zolotarevski i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka (oblast Medicina Patologija).

U Beogradu, 24.04.2015.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Svetislav Tati

Prof. dr Dimitrije Brašanac

Doc. dr Danijela Dobrosavljević

Komentor

Prof. dr Milena Kataranovski

Prof. dr Goran Brajušković
