

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

-Komisiji za posleddiplomsku nastavu-doktorske studije-

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 15.5.2014. godine, donelo je Odluku (broj 944/2) kojom se imenuje Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom **„Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike dendritskih ćelija različitih sojeva pacova“**, kandidata mr sc. dr med. Biljane Bufan, u sastavu:

1. Dr Zorica Stojić-Vukanić- mentor (Predsednik), vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu
- Farmaceutski fakultet
2. Dr Gordana Leposavić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr Mirjana Dimitrijević, naučni savetnik, Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Institut za virusologiju, serume i vakcine „Torlak“, Beograd

Mr sc. dr med. Biljana Bufan je zaposlena kao saradnik u nastavi na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kandidat je student doktorskih akademskih studija- modul farmakologija na Farmaceutskom fakultetu- Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr sc. dr med. Biljane Bufan pod nazivom: **„Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike dendritskih ćelija različitih sojeva pacova“** napisana je na 161 strani i sadrži 26 slika, 1 tabelu i 345 literaturnih navoda. Sadržaj

doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (27 strana), Ciljevi istraživanja (3 strane), Materijal i metode (27 strana), Rezultati (43 strane), Diskusija (27 strana), Zaključak (5 strana) i Literatura.

U poglavlju **UVOD**, na pregledan način izneti su relevantni podaci iz literature, koji nedvosmisleno ukazuju na opravdanost istraživanja, koja su prikazana u disertaciji i iz kojih jasno proizilazi da su ciljevi istraživanja smisljeno i precizno definisani.

CILJ ISTRAŽIVANJA ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike konvencionalnih dendritskih ćelija (kDĆ) pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja i da se utvrdi da li ove promene koreliraju sa promenom u osetljivosti na indukciju organ-specifičnih autoimunskih bolesti.

Poglavlje **MATERIJAL I METODE** sadrži detaljan opis metoda koje su korišćene za izolovanje i kultivaciju kDĆ, kao i metode koje su korišćene za ispitivanje fenotipskih i funkcijskih karakteristika kDĆ. Osim toga, budući da je za ispitivanje korelacije između promena u funkcijskim karakteristikama kDĆ i osetljivosti na indukciju organ-specifičnih autoimunskih bolesti korišćen eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), eksperimentalni model za multipulu sklerozu, detaljno je opisan postupak za indukciju ove bolesti, kao i parametri za praćenje razvoja bolesti.

U istraživanjima su korišćene mlade (3 meseca) i stare (26 meseci) ženke pacova AO i DA soja. Životinjama su, nakon žrtvovanja slezine pažljivo vađene; manji deo tkiva je uziman za analizu ekspresije gena za citokine, a ostatak je korišćen za izolovanje splenocita enzimskom digestijom, a potom je na gustinskom gradijentu izdvajana ćelijska frakcija niske gustine u kojoj se nalaze DĆ. Jedan deo ovih ćelija je upotrebljen za ispitivanje ispoljenost površinskih molekula (CD4, CD11b, MHC II, CD40, CD80, CD86 i TLR4). Ćelije koje ispoljavaju CD103 (subjedinica α_{OX-62} integrina) molekul su identifikovane korišćenjem monoklonskog MRC OX62 antitela (u daljem tekstu kDĆ) i potom je ispitivana njihova endocitozna sposobnost.

Iz drugog dela ćelija iz iste frakcije su izdvajane OX62+ ćelije korišćenjem magnetnih kuglica vezanih za MRC OX62 monoklonsko antitelo. Jedan deo ovako izdvojenih ćelija je iskorišćen za ispitivanje ekspresije gena za citokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β i IL-10) i TLR (*engl.* Toll like receptor) 4, receptor koji prepoznaje molekulske obrasce patogena.

Izdvojene kDĆ su, tokom noći, kultivisane u kompletnom medijumu sa ili bez dodatka lipopolisaharida (LPS), liganda za TLR4, koji stimuliše aktivaciju/sazrevanje DĆ. Nakon kultivacije ispitivana je:

- vijabilnost ćelija, korišćenjem 7-aminoaktinomicin D (7-AAD), metodom protočne fluorocitometrije,
- ispoljavanje površinskih molekula (MHC II, CD40, CD80, CD86) korišćenjem metode protočne fluorocitometrije,
- produkcija citokina (IL-10, TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-12, IL-23), određivanjem njihove koncentracije u supernatantima enzimskim imunotestovima (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) i ekspresije relevantnih gena u samim ćelijama, metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. Real-time polimerase chain reaction, RT-PCR).

Alostimulatorna sposobnost kDĆ je procenjivana merenjem proliferativnog odgovora CD4+ T limfocita koji su prethodno obeleženi fluorescentnom bojom- 5(6)-karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estrom (CFSE), metodom protočne citofluorimetrije.

U drugom segmentu studije ispitivana je osetljivost pacova na indukciju EAE-a. Životinje su imunizovane ubrizgavanjem paste koja se sastojala od homogenata kičmene moždine DA pacova i kompletnog Freund-ov adjuvansa i subkutanog davanja *Bordetella pertussis* vakcine. Kod ovih životinja svakodnevno je praćen tok bolesti i kvantifikovani su klinički znaci.

Dozvolu za rad sa eksperimentalnim životinjama, u sklopu istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, je izdala Etička komisija Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, odlukom od 19.6.2012. godine, zavedenom pod brojem 6/12.

Statistička značajnost razlika između grupa različite starosti u ispoljenosti površinskih markera na sveže izolovanim kDĆ je određivana Studentovim t- tesom, dok je značajnost promena ekspresije iRNK određivana Mann-Whitney U-testom. Uticaj starenja i kultivacije/LPS-a na kDĆ je testiran dvofaktorskom analizom varijanse, uz primenu Bonferroni testa za *post hoc* poređenje. Kruskal-Wallis test, uz primenu Mann-Whitney U testa za *post hoc* poređenje, je korišćen za testiranje uticaja starenja/LPS-a na ekspresiju iRNK za citokine. Statistička značajnost je testirana korišćenjem komercijalnih statističkih paketa (SPSS for Windows 16.0. i GraphPad Prism v 5.0). P vrednost < 0.05 je smatrana statistički značajnom.

REZULTATI su prikazani na 26 slika uz 1 tabelu.

U poglavlju **DISKUSIJA** dobijeni rezultati su kritički diskutovani u svetlu relevantnih podataka iz literature.

Na kraju disertacije, dati su **ZAKLJUČCI**, koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U prvom segmentu poglavlja **REZULTATI** opisani su podaci dobijeni analizom uticaja starenja na fenotipske i funkcijske karakteristika kDC⁺ sveže izolovanih iz slezine pacova AO i DA soja.

Analiza zastupljenosti CD4⁺ i CD4⁻ subpopulacija u okviru populacije kDC⁺ **AO pacova** je pokazala da je starenje dovelo do promene njihovog odnosa, tako da je, za razliku od mladih životinja, kod kojih su dominantnu subpopulaciju činile CD4⁺ kDC⁺, kod starih životinja je odnos ovih subpopulacija promenjen u korist CD4⁻ kDC⁺. Promena odnosa subpopulacija kDC⁺ sa starenjem nije nađena kod pacova **DA soja**. Kod oba uzrasta životinja ovog soja CD4⁻ subpopulacija je bila dominantna.

Analiza fenotipa sveže izolovanih kDC⁺ životinja **AO soja** je pokazala da su sveže izolovane kDC⁺ starih životinja imale značajno veću ($p < 0.001$) površinsku gustinu (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) MHC molekula II klase, dok je površinska gustina kostimulatornih molekula (CD80, CD86 i CD40) bila značajno manja ($p < 0.05$) u odnosu na ćelije mladih životinja. Takođe, u sveže izolovanim kDC⁺ starih životinja bila je manja procentualna zastupljenost ćelija koje su eksprimirale TLR4 molekul u odnosu na istu populaciju ćelija kod mladih životinja.

Kod sveže izolovanih kDC⁺ starih životinja **DA soja** je, u odnosu na sveže izolovane kDC⁺ mladih životinja, nađen manji ($p < 0.01$) procenat MHC II⁺ i CD40⁺ ćelija. Sa druge strane, u okviru iste populacije ćelija starih životinja, nađen je veći ($p < 0.01$) procenat ćelija koje ispoljavaju CD80 i CD86 molekule u poređenju sa ćelijama mladih pacova. Za razliku od AO soja, kod DA soja starenje je povećalo ($p < 0.001$) procentualnu zastupljenost TLR4⁺ u okviru populacije sveže izolovanih kDC⁺ slezine.

Starenje je povećalo ($p < 0.001$) preuzimanje dekstrana endocitozom od strane kDC⁺ pacova AO soja, a smanjilo ($p < 0.05$) njegovo preuzimanje od strane kDC⁺ DA pacova.

Analiza ekspresije gena za pro-inflamatorne/imunostimulatorne citokine je pokazala da slezinske kDC⁺ starih **AO pacova** sadrže veće količine iRNK za TNF- α ($p < 0.05$) i IL-1 β ($p < 0.01$) i manje količine ($p < 0.05$) iRNK za IL-6, u odnosu na kDC⁺ mladih životinja istog

soja. Ekspresija gena za imunomodulatorne/imunosupresivne citokine IL-10 i TGF- β , nije se značajnije promenila starenjem kod ovih pacova.

Kada je analizirana ekspresija gena za iste citokine u kDĆ **DA pacova**, dobijeni su nešto drugačiji rezultati. Ove ćelije starih DA pacova su ekspimirale veće količine iRNK za TNF- α ($p < 0,05$) i IL-6 ($p < 0,01$), a manju ($p < 0,05$) količinu iRNK za IL- β u odnosu na odgovarajuće ćelije mladih životinja. Ekspresija iRNK za IL-10 je bila veća u kDĆ starih pacova. Starenje nije uticalo na ekspresiju iRNK za TGF- β .

Količina iRNK za TLR4 u kDĆ starih pacova oba soja je bila u saglasnosti sa rezultatom površinske ispoljenosti ovog molekula. Naime, starenje je smanjilo ($p < 0,01$) količinu iRNK za TLR4 u sveže izolovanim kDĆ starih AO pacova, a povećalo je ($p < 0,01$) u istim ćelijama DA pacova.

U drugom segmentu poglavlja **REZULTATI** su opisani podaci dobijeni ispitivanjem uticaja starenja na sposobnost aktivacije/sazrevanja kDĆ pacova AO i DA soja nakon stimulacije LPS-om u kulturi.

Analiza fenotipskih karakteristika kDĆ mladih i starih **AO pacova** stimuliranih LPS-om, pokazala je statistički značajno povećanje procentualne zastupljenosti ili površinske gustine svih ispitivanih markera (MHC II, CD80, CD86 i CD40) u poređenju sa ćelijama iste uzrastne grupe koje su gajene bez prisustva ovog faktora sazrevanja. Poređenjem fenotipskih karakteristika kDĆ nakon stimulacije LPS-om mladih i starih AO pacova nađena je manja ($p < 0,001$) površinska gustina MHC II i veća kostimulatornih molekula u poređenju sa stimuliranim ćelijama mladih životinja.

Analiza uticaja LPS-a na fenotipske karakteristike kDĆ mladih **DA pacova** je pokazala da je ovaj faktor sazrevanja uticao na povećanje ekspresije svih ispitivanih markera, osim CD40. Kod kDĆ starih životinja, LPS je značajnije uticao samo na promenu ekspresije CD86, jer je povećao i procentualnu zastupljenost CD86+ ćelija ($p < 0,05$) i gustinu njegove ispoljenosti ($p < 0,001$), u poređenju sa kDĆ starih životinja gajenih u odsustvu LPS-a.

Prethodno navedene promene u ispoljenosti ispitivanih površinskih molekula su rezultirale manjom ($p < 0,001$) gustinom ispoljenosti MHC II i CD40 molekula i manjim ($p < 0,05$) procentom CD86+ ćelija u okviru populacije kDĆ starih životinja koje su stimulirane LPS-om, u poređenju sa odgovarajućim kDĆ mladih životinja.

Analiza alostimulatorne sposobnosti kDĆ je pokazala da su nestimulirane kDĆ, bez obzira na soj i uzrast životinja iz kojih su izolovane, indukovale proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita, ali su bile manje efikasne u poređenju sa kDĆ stimuliranim LPS-om. Pored toga,

LPS-om stimulirane kDC starih životinja su pokazale manju sposobnost indukovanja proliferacije alogeničkih CD4⁺ T limfocita u odnosu na ove ćelije mladih životinja istog soja.

Ispitivanja ekspresije gena za citokine u kDC u ćelijama iz kulture su pokazala da su ove starih životinja **AO soja**, gajene samo u kompletnom medijumu, ekspimirale veće bazalne nivoe iRNK za: TNF- α ($p < 0.05$), IL-12p35 ($p < 0.001$), IL-23p19 ($p < 0.001$) i IL-6 ($p < 0.05$) i manje ($p < 0.001$) za IL-10 u odnosu na ćelije mladih životinja gajene pod istim uslovima. Količine ekspimirane iRNK za TGF- β se nisu razlikovale kod nestimuliranih kDC mladih i starih životinja.

Pod uticajem LPS-a, kDC mladih životinja su značajno povećale ($p < 0.001$) ekspresiju samo iRNK za IL-10 u poređenju sa nestimuliranim ćelijama životinja istog uzrasta. Suprotno, u kDC starih pacova nakon stimulacije LPS-om nađena je povećana ekspresija iRNK za: TNF- α ($p < 0.001$), IL-12p35 ($p < 0.001$), IL-23p19 ($p < 0.01$), IL-6 ($p < 0.001$) i TGF- β ($p < 0.001$), dok se ekspresija iRNK za IL-10 nije značajnije menjala, u poređenju sa nestimuliranim kDC životinja iste starosti.

Uočeno je, takođe, da kDC starih pacova posle stimulacije LPS-om ekspimiraju značajno veće ($p < 0.001$) količine iRNK za: TNF- α , IL-12p35, IL-23p19, IL-6 i TGF- β i manje ($p < 0.001$) za IL-10 nego ove ćelije mladih pacova.

Analiza bazalne ekspresije **iRNK** u nestimuliranim kDC mladih i starih **DA pacova** je pokazala višestruko veće ($p < 0.001$) količine iRNK za IL-23p19 u ćelijama starih životinja, dok se ekspresije gena za druge ispitivane citokine (TNF- α , IL-12p35, IL-6, IL-10 i TGF- β) nisu razlikovale.

Nakon aktivacije pod uticajem LPS-a, kDC mladih pacova su značajno povećale ($p < 0.05$) sadržaj iRNK za TNF- α , dok se ekspresija iRNK za IL-12p35, IL-6, IL-23p19, IL-10 i TGF- β nije značajnije promenila, u poređenju sa kontrolnim ćelijama životinja istog uzrasta. Sa druge strane, LPS je uticao na povećanje ekspresije iRNK za IL-6 ($p < 0.01$), IL-10 ($p < 0.001$) i TGF- β ($p < 0.001$) u kDC starih životinja.

Ispitivanje uticaja LPS-a na kDC mladih i starih životinja je pokazalo da ove ćelije starih životinja ispoljavaju značajno veće ($p < 0.001$) količine iRNK za IL-6, IL-23p19, IL-10 i TGF- β nego ćelije mladih životinja.

Koncentracije citokina u supernatantima kultura kDC mladih i starih pacova **oba ispitivana soja** u prisustvu ili bez LPS-a bila je u saglasnosti sa rezultatima ekspresije njihove iRNK.

Sposobnosti kDC da usmeravaju diferencijaciju i polarizaciju CD4+ T ćelijskog odgovora određiva je na osnovu koncentracije IFN- γ , marker CD4+ pomoćničkih (Th)1 limfocita, IL-4 (marker Th2 ćelija) i IL-17 (marker Th17 ćelija) u supernatantima kokultura kDC i CD4+ T limfocita. U supernatantima kokultura stimulisanih kDC mladih **AO pacova**, u odnosu na one iz kokultura sa nestimulisanim kDC životinja istog uzrasta, koncentracije IFN- γ i IL-17 se nisu značajno razlikovale. Za razliku od njih, nađena je veća koncentracija IFN- γ ($p < 0.001$) i IL-17 ($p < 0.05$) u supernatantima kokultura kDC stimulisanih LPS-om starih životinja i CD4+ ćelija u odnosu na supernatante kokultura sa nestimulisanim kDC životinja iste starosti. Konačno, poređenjem koncentracija citokina u supernatantima kokultura kDC starih životinja stimulisanih LPS-om i CD4+ limfocita sa koncentracijom citokina u supernatantima odgovarajućih kokultura mladih životinja, nađene su značajno veće ($p < 0.001$) koncentracije IFN- γ i IL-17.

Kod mladih **DA pacova** u supernatantima kokultura kDC aktivisanih LPS-om i alogeni CD4+ T limfocita izmerene su veće ($p < 0.05$) koncentracije IFN- γ u poređenju sa supernatantima kokultura sa nestimulisanim kDC mladih pacova. Zatim, značajno veće ($p < 0.05$) koncentracije IL-17 nađene su u supernatantima kokultura, kako nestimulisanih tako i stimulisanih kDC starih životinja i CD4+ ćelija, u poređenju sa odgovarajućim supernatantima kokultura mladih životinja.

Bez obzira na prisustvo LPS-a, nisu nađene razlike u koncentracijama IL-4 u supernatantima kokultura CD4+ T limfocita i kDC mladih i starih životinja oba ispitivana soja.

U trećem delu poglavlja **REZULTATI** opisani su podaci dobijeni praćenjem razvoja EAE-a kod mladih i starih životinja AO i DA soja. Kod starih imunizovanih životinja relativno rezistentnog **AO soja** nađeno je povećanje incidence obolevanja (0% mlade vs 60% stare). Prvi znaci bolesti u ovoj grupi životinja su registrovani 10.3 ± 1.36 dana, dok je maksimalni klinički znak bio 2, što odgovara paraparezi zadnjih ekstremiteta.

Kod starih imunizovanih životinja osetljivog **DA soja**, nađeno je smanjenje incidence obolevanja (100% mlade vs. 27.3% stare). Kod ovih životinja nije bilo razlike u danu početka bolesti (11.67 ± 0.41 mlade i 11.33 ± 0.41 stare), a stare životinje su ispoljile blažu kliničku sliku bolesti, što je procenjeno na osnovu maksimalnog kliničkog znaka 4 (tetraplegija tj. moribundno stanje) kod mladih i 2 kod starih životinja.

C. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

U literaturi postoje podaci o uticaju starenja na DĆ različitim životinjskih vrsta (primati, miševi, ljudi) (Agrawal i sar., 2007b; Wong i sar., 2010; Pereira i sar., 2011; Asquith i sar., 2012), ali ne i o uticaju starenja na DĆ pacova. Podaci o uticaju starenja na DĆ su umnogome kontradiktorni, a često i neuporedivi jer se: 1) odnose na ćelije različitog porekla (slezina, periferna krv, kostna srž), 2) ćelije nisu gajene pod istim uslovima, 3) su korišćeni različiti protokoli za stimulaciju aktivacije/sazrevanja, 4) ne postoji potpuna podudarnost između različitih populacija/subpopulacija DĆ izolovanih iz različitih životinjskih vrsta i 5) ćelije potiču iz jedinki različite starosti.

Sa druge strane, iako je pacov, posle miša, najčešće korišćena laboratorijska životinja nedostaju podaci o uticaju starenja na DĆ pacova. Iz tog razloga, istraživanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su bila usmerena na ispitivanje uticaja starenja na DĆ pacova dva soja različite sklonosti ka razvoju Th1/Th17 posredovanih autoimunskih bolesti, od kojih je jedan relativno rezistentan (AO), a drugi (DA) osetljiv (Lukić i sar., 2001; Miljković i Mostarica Stojković, 2006; Miljković i sar., 2006; Marković i sar., 2009).

Prema dostupnim literaturnim podacima, u okviru kDC pacova (svih osim kDC u timusu) se mogu razlikovati bar dve, morfološki, fenotipski i funkcijski različite supopulacije, za čiju se identifikaciju koristi, pre svega prisustvo tj. odsustvo CD4 molekula na površini ćelija (Liu i sar., 1998; Turnbull i MacPherson, 2001; Trinite i sar., 2000; Voisine i sar., 2002; Yrlid i MacPherson, 2003).

Hubert i saradnici (Hubert i sar., 2006) su pokazali da se odnosi subpopulacija DĆ u slezinama pacova Sprague-Dawley, Lewis i Brown Norway sojeva razlikuju i da su sojno zavisni. Rezultati ove studije su to potvrdili. Osim toga, oni su pokazali i kakvi su odnosi glavnih subpopulacija u okviru populacije kDC pacova AO i DA soja, koji nisu postojali u dostupnoj literaturi. Takođe, pokazano je da starenje dovodi do promena u odnosu subpopulacija kod AO, ali ne i DA pacova. Ovakvi rezultati navode na zaključak da se promena odnosa subpopulacija ne dešava nužno tokom starenja i da je i sojno zavisna. Prema dostupnim literaturnim podacima, promena odnosa subpopulacija slezinskih kDC opisana je kod starih miševa C57BL/6 soja (Wong i sar., 2010), dok nema podataka o uticaju starenja na zastupljenost pojedinačnih subpopulacija kDC kod pacova.

S obzirom na različite funkcijske karakteristike navedenih subpopulacija kDC, njihova relativna zastupljenost se povezuje sa sklonošću ka usmeravanju Th ćelijskog odgovora u

pravcu Th1 ili Th2 (Fournie i sar., 2001; Hubert i sar., 2006). Shodno tome, dominacija CD4+ ćelija, koje karakteriše produkcija male količine IL-12 i odsustvo produkcije TNF- α , kod mladih životinja AO soja, mogla bi biti povezana sa relativnom neosetljivošću ovog soja na razvoj Th1/Th17 posredovanih autoimunskih bolesti (Fournie i sar., 2001; Marković i sar., 2009). Suprotno ovome, kod pacova DA soja, koji je osjetljiv na indukovanje autoimunskih bolesti posredovanih Th1/Th17 ćelijskim odgovorom (Lukić i sar., 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006; Miljković i sar., 2006), nađena je dominacija CD4- ćelija, koje odlikuje produkcija velikih količina pro-inflamatornih citokina (Voisine i sar., 2002; Hubert i sar., 2006). Promene odnosa CD4+ i CD4- kDĆ koja je nađena kod starih AO pacova, mogla bi se povezati sa promenom njihove osjetljivosti na indukciju Th1/Th17 posredovanih autoimunskih bolesti, što je takođe ispitivano u ovoj studiji.

Ispitivanja karakteristika kDĆ mladih životinja su pokazala da ove ćelije imaju odlike nezrelih DĆ, što je u skladu sa literaturnim podacima, prema kojima gotovo sve DĆ slezine miša imaju karakteristike nezrelih ćelija (Iwasaki i Kelsall, 1999; Wilson i sar., 2003). Rezultati ove studije su pokazali da starenje utiče na promenu fenotipskih karakteristika kDĆ, kao i da je većina tih promena sojno zavisna.

Starenje je dovelo do promenjene endocitozne aktivnosti kDĆ, važne karakteristike nezrelih DĆ (Banchereau i sar., 2000) i ono je bilo u saglasnosti sa opisanim fenotipskim promenama ovih ćelija. Naime, kDĆ starih životinja AO soja su pokazale veću, a DA soja manju sposobnost preuzimanja dekstrana u poređenju sa ćelijama mladih životinja odgovarajućeg soja. Rezultati koje su dobili Agrawal i saradnici (Agrawal i sar., 2007a) ukazuju na smanjeno preuzimanje antigena od strane humanih DĆ monocitnog porekla kod starih osoba i ovakav nalaz pripisuju promena u prenosu signala u okviru PI3K/AKT signalnog puta u tim ćelijama (Agrawal i sar., 2007a).

Analiza produkcije citokina od strane sveže izolovanih kDĆ je obuhvatila određivanje količine iRNK za TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 i TGF- β . Produkcija TNF- α je kod kDĆ starih životinja oba soja bila veća u poređenju sa istim ćelijama mladih životinja odgovarajućeg soja. Povećanu bazalnu produkciju ovog citokina od strane DĆ su našle i druge grupe istraživača i povezuju ga sa povećanim bazalnim nivoom aktiviranog transkripcionog nuklearnog faktora-kapa B (*engl.* nuclear factor kB NF-kB) (Agrawal i sar., 2009; Panda 2010; Gupta i sar., 2014). Takođe, ovakav nalaz govori u prilog hroničnog sistemskog pro-inflamatornog statusa kod starih jedinki različitih vrsta (Brüünsgaard i Pedersen, 2003; Gómez i sar., 2006; Vasto i sar., 2007; Wong i Magnusson, 2013) i ukazuje na moguću ulogu DĆ u razvoju ovog fenomena.

Osim toga, promena produkcije IL-6 i IL-1 β kod kDC \acute starih životinja bila je sojno-zavisna. Rezultati dobijeni na mišijem modelu pokazuju da IL-6 ima dominantnu ulogu u regulaciji aktivacionog statusa DC \acute u stanju bez infekcije/inflamacije u slezini, koja se ogleda u sprečavanju njihove aktivacije/sazrevanja (Park i sar., 2004). Ovakve tvrdnje ne potkrepljuju dobijene rezultate, budući da je ekspresija gena za ovaj citokin bila niža kod DC \acute starih AO pacova, nezrelijeg fenotipa, a viša kod DA pacova. Moguće objašnjenje bi bilo da neki drugi faktor/i imaju dominantniju ulogu u regulaciji aktivacionog statusa DC \acute kod pacova ili kod starih životinja.

Kada su u pitanju imunosupresivni citokini, ekspresija iRNK za TGF- β se nije značajno promenila sa starenjem kod kDC \acute ispitivanih sojeva, dok je efekat na IL-10 bio različit. Kod kDC \acute starih AO pacova je produkcija ostala nepromenjena, dok su kDC \acute starih DA pacova eksprimirale više nivoe ovog citokina, u odnosu kDC \acute mladih životinja istog soja. U literaturi se DC \acute koje produkuju ovaj citokin označavaju kao ćelije sa tolerogenom funkcijom (Steinman i sar., 2003). Disregulacija produkcije ovog citokina bi mogla biti posledica intrizičkih promena, budući da je kod nekih ljudi uočena genetski uslovljena osobina, da se u starosti, u odgovoru na povećan nivo pro-inflamatornih medijatora, aktivira anti-inflamatorni odgovor, produkcija IL-10 i TGF- β , koji treba da spreči potencijalno štetno dejstvo hronične inflamacije (Larbi i sar., 2008). Naravno, osim intrizičnih i promene koje potiču iz okruženja DC \acute bi mogle da uslove promene u produkciji citokina.

Nalazi Huberta i saradnika (Hubert i sar., 2006) ukazuju na to da obe subpopulacije pacovskih kDC \acute eksprimiraju iRNK za TLR4. U ovom istraživanju, osim ekspresije iRNK za TLR4 u kDC \acute pacova, potvrđeno je i prisustvo produkta na površini ovih ćelija. Takođe, rezultati ove studije su pokazali sojno-zavisan uticaj starenja na promenu ekspresije TLR4 kod kDC \acute , jer je kod starih AO pacova nađena manja, a kod DA veća ekspresija ovog molekula.

Literaturni podaci koji se odnose na promene ekspresije TLR4 kod starih jedinki nisu konzistentni. Renshaw i saradnici (Renshaw i sar., 2002) su našli da kod slezinskih i peritonealnih makrofaga, starenje snižava ekspresiju TLR4, koja je zavisna od lokalizacije i aktivacionog statusa ćelija. Sa druge strane, studije na miševima nisu pokazale da se ekspresija TLR4 na limfocitima, makrofagama i peritonealnim makrofagama menja sa starenjem (Boehmer i sar., 2004; Sun i sar., 2012), dok su Asquith i saradnici (Asquith i sar., 2012), našli povećanu ekspresiju ovog molekula na mononuklearnim ćelijama periferne krvi starih rhesus majmuna (*Macaca mulatta*).

LPS-om stimulisane kDC starih AO pacova je karakterisala veća ekspresija kostimulatornih molekula (CD80, CD86 i CD40), veća produkcija TNF- α , IL12, IL-6, IL-23 i TGF- β i manja IL-10, u odnosu na kDC mladih životinja. Ove ćelije su ispoljile sposobnost da indukuju Th1 i Th17 ćelijski odgovor, ali su imale i nižu alostimulatornu aktivnost u poređenju sa stimulisanim kDC mladih životinja.

Za razliku od njih, LPS-om stimulisane kDC starih životinja DA soja su imale nezreliji fenotip, sa manjom ispoljenošću MHC II, CD86 i CD40 molekula, u odnosu na stimulisane ćelije mladih. Ove ćelije su produkovale veće količine IL-10, IL-6 i IL-23 i imale veću ekspresiju TGF- β , dok je produkcija TNF- α bila manja u poređenju sa kontrolnim, stimulisanim kDC mladih životinja. Stimulisane kDC starih životinja nisu imale sposobnost da indukuju Th1 ćelijski odgovor, za razliku od stimulisanih kDC mladih. Kada je u pitanju sposobnost indukovanja Th17 ćelijskog odgovora, iako je pokazano da su kDC starih jedinki indukovale produkciju IL-17 kod alogenih CD4+ T limfocita u većoj meri nego što su to činile ćelije mladih životinja, ova njihova sposobnost nije povećana pod uticajem LPS-a. Takođe, LPS-om stimulisane kDC starih pacova oba soja su imale sniženu sposobnost stimulacije alogenih CD4+ T limfocita u poređenju sa kDC mladih životinja istog soja.

Brojne studije su imale za cilj da ispituju sposobnost DC starih jedinki da odgovore na aktivacione stimulse, najčešće na agoniste TLR4, TLR2/6 i TLR9 i dobijeni su različiti rezultati. Najveći broj ispitivanja je sproveden na mišijim DC poreklom iz slezine ili dobijenim *in vitro* od matičnih ćelija kostne srži, a manji broj na humanim DC dobijenim od monocita periferne krvi i DC poreklom od nehumanih primata (Tesar i sar., 2006; Grolleau-Julius i sar., 2006; Agrawal i sar., 2007b; Agrawal i sar., 2009; Jones i sar., 2010; Asquit i sar., 2012). Rezultati većine sprovedenih studija pokazuju da starenje umanjuje sposobnost DC da odgovore na inflamatorni stimulus (Grollesu-Julius i sar., 2006; Pereira i sar., 2011; Li i sar., 2012), dok je jedan broj studija pokazao nepomenjenu sposobnost (Tesar i sar., 2006; Jones i sar., 2010) ili čak pojačanu sposobnost ćelija da odgovore na aktivacione stimulse (Agrawal i sar., 2007b; Agrawal i sar., 2009).

Poslednji segment istraživanja je bio posvećen ispitivanju osetljivosti starih ženki AO i DA pacova na indukciju EAE. Mlade životinje ova dva soja se razlikuju prema osetljivosti na indukciju ove bolesti, što ukazuje na snažan uticaj genetskih faktora na ovu njihovu osobinu (Fournié i sar., 2001; Swanborg, 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006). U skladu sa literaturnim podacima (Mostarica-Stojković i sar., 1982; Lukić i sar., 2001; Stošić-Grujičić i sar., 2004), pokazano je da su mlade ženke DA pacova osetljive na indukciju EAE,

dok su mlade ženke AO soja relativno rezistentne. Rezultati istraživanja koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju promjenjenu osetljivost na indukciju EAE-a kod starih životinja. Tačnije, stari pacovi AO soja su postali osetljiviji, dok su stari pacovi DA soja postali manje osetljivi i imali su blažu kliničku sliku u poređenju sa mladim pacovima odgovarajućeg, istog soja. Ovakav nalaz ne iznenađuje, s obzirom da je ranije pokazano da je kod glodara, moguća promena podložnosti razvoju EAE-a i kliničke slike bolesti sa starenjem i da su ove promene sojno-zavisne (Kallen i Nilsson, 1989; Ludowyk i sar., 1993; Ditamo i sar., 2005). Naime, kod starih mužjaka Fisher pacova i kod starih BALB/c miševa je uočena smanjena osetljivost (Levine i Sowinski, 1976, Endoh i sar., 1990), dok je kod starih Lewis pacova promenjen klinički oblik bolesti (Ludowyk i sar., 1993).

Citirana literatura:

Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol* 2007a;178:6912-22.

Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 2007b;42:421-6.

Agrawal A, Tay J, Ton S, Agrawal S, Gupta S. Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. *J Immunol* 2009;182:1138-45.

Aspinall R, Goronzy JJ. Immune senescence. *Curr Opin Immunol* 2010;22:497-9.

Asquith M, Haberthur K, Brown M, Engelmann F, Murphy A, Al-Mahdi Z, et al. Age-dependent changes in innate immune phenotype and function in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 2012;2.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Boehmer ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol* 2004;75:342-9.

Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003;23:15-39.

Ditamo Y, Degano AL, Maccio DR, Pistoresi-Palencia MC, Roth GA. Age-related changes in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 2005;83:75-82.

Endoh M, Rapoport SI, Tabira T. Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice. *J Neuroimmunol* 1990;29:21-31.

Fournie GJ, Cautain B, Xystrakis E, Damoiseaux J, Mas M, Lagrange D, et al. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol Rev* 2001;184:145-60.

Gomez CR, Acuna-Castillo C, Nishimura S, Perez V, Escobar A, Salazar-Onfray F, et al. Serum from aged F344 rats conditions the activation of young macrophages. *Mech Ageing Dev* 2006;127:257-63.

Grolleau-Julius A, Garg MR, Mo R, Stoolman LL, Yung RL. Effect of aging on bone marrow-derived murine CD11c+CD4-CD8alpha- dendritic cell function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:1039-47.

Gupta S. Role of dendritic cells in innate and adaptive immune response in human aging. *Exp Gerontol* 2014;54:47-52.

- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan JM, Ouabed A, Heslan M, et al. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol* 2006;177:1007-16.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999;190:229-39.
- Jones SC, Brahmakshatriya V, Huston G, Dibble J, Swain SL. TLR-activated dendritic cells enhance the response of aged naive CD4 T cells via an IL-6-dependent mechanism. *J Immunol* 2010;185:6783-94.
- Kallen B, Nilsson O. Age as a factor determining susceptibility for experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;90:16-9.
- Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology* 2008;23:64-74.
- Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in aged F344 rats. *J Gerontol* 1976;31:271-4.
- Li G, Smithey MJ, Rudd BD, Nikolich-Zugich J. Age-associated alterations in CD8alpha+ dendritic cells impair CD8 T-cell expansion in response to an intracellular bacterium. *Aging Cell* 2012;11:968-77.
- Liu L, Zhang M, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 1998;161:1146-55.
- Ludowyk PA, Hughes W, Hugh A, Willenborg DO, Rockett KA, Parish CR. Astrocytic hypertrophy: an important pathological feature of chronic experimental autoimmune encephalitis in aged rats. *J Neuroimmunol* 1993;48:121-34.
- Lukic ML, Mensah-Brown E, Galadari S, Shahin A. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Dev Immunol* 2001;8:193-200.
- Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, et al. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol* 2009;47:141-6.
- Miljkovic D, Mostarica-Stojkovic M. Resistance to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis –a tool for studying pathogenesis of the central nervous system autoimmunity. *Iugoslavi Physiol Pharmacol Acta* 2006; 42(1): 1-18.
- Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, et al. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *J Neurosci Res* 2006;84:379-88.
- Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Cellular and genetic basis of the relative resistance to the induction of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in albino oxford (AO) rats. *Adv Exp Med Biol* 1982;149:699-702.
- Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009;30:325-33.
- Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010;184:2518-27.
- Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173:3844-54.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging, January 2002 update. *Fronti Biosci* 2002;7:d1056-183.
- Pereira LF, de Souza AP, Borges TJ, Bonorino C. Impaired in vivo CD4+ T cell expansion and differentiation in aged mice is not solely due to T cell defects: decreased stimulation by aged dendritic cells. *Mech Ageing Dev* 2011;132:187-94.
- Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002;169:4697-701.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010;22:507-13.

- Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol* 2012;24:331-41.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 2003;21:685-711.
- Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol* 2000;78:91-102.
- Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol* 2004;136:49-55.
- Sun Y, Li H, Yang MF, Shu W, Sun MJ, Xu Y. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *PloS one* 2012;7:e39224.
- Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 2001;184:129-135.
- Tesar BM, Walker WE, Unternaehrer J, Joshi NS, Chandele A, Haynes L, et al. Murine [corrected] myeloid dendritic cell-dependent toll-like receptor immunity is preserved with aging. *Aging Cell* 2006;5:473-86.
- Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 2000;165:4202-8.
- Turnbull E, MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev* 2001;184:58-68.
- Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 2007;128:83-91.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002;169:2284-91.
- Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003;102:2187-94.
- Wong CP, Magnusson KR, Ho E. Aging is associated with altered dendritic cells subset distribution and impaired proinflammatory cytokine production. *Exp Gerontol* 2010;45:163-9.
- Wong CP, Magnusson KR, Ho E. Increased inflammatory response in aged mice is associated with age-related zinc deficiency and zinc transporter dysregulation. *J Nutr Bioch* 2013;24:353-9.
- Yrliid U, Macpherson G. Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. *APMIS* 2003;111:756-65.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati doktorske disertacije mr sc. dr med. Biljane Bufan su publikovani u 2 rada u međunarodnim časopisima, od čega jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (**M21**) i jedan rad u međunarodnom časopisu (**M23**). Kandidat je deo rezultata svoje disertacije izlagao u vidu jednog saopštenja na međunarodnom naučnom skupu štampanog u izvodu (**M34**) i jednog saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampanog u izvodu (**M64**).

Publikovani radovi iz doktorske disertacije:

1. Stojic-Vukanic Z, **Bufan B**, Arsenovic-Ranin N, Kosec D, Pilipovic I, Perisic-Nanut M, Lepasovic G. Aging affects AO rat splenic conventional dendritic cell subset composition, cytokine synthesis and T- helper polarizing capacity. Biogerontology 2013; 14(4): 443-459. (**M21**)
2. **Bufan B**, Đikić J, Nacka-Aleksić M, Stojić-Vukanić Z, Dimitrijević M, Lepasović G. Strain-specific differences in age-related changes in rat susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis and dendritic cell cytokine gene expression. Genetika 2014; 46(1):287-301. (**M23**)

Saopštenje na međunarodnom skupu štampano u izvodu

1. **Bufan B**, Stojic-Vukanic Z, , Arsenovic-Ranin N, Kosec D, Pilipovic I, Perisic M, Đikić J, Lepasovic G. Age-associated shift in rat dendritic cell T-helper polarizing capacity. 15th International Congress of Immunology. August 22-27 2013, Milan, Italy. Book of Abstracts P1.09.04 p284. (**M34**)

Saopštenje na skupu nacionalnog značaja štampano u izvodu

1. **Bufan B**, Stojić-Vukanić Z, Arsenović-Ranin N, Pilipović I, Kosec D, Nacka-Aleksić M, Đikić J, Perišić M, Lepasović G. Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike dendritskih ćelija slezine pacova. Svetski dan imunologije-2012. 24.4.2012. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd. (**M64**)

E. ZAKLJUČAK- OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Interesovanje istraživača za promene imunskog odgovora kod starih životinja i ljudi je u porastu. Razlog za ovo jesu demografski podaci koji ukazuju na produženje životnog veka i povećanje broja starih ljudi i shvatanje da je očuvana funkcija imunskog sistema jedan od ključnih faktora koji određuje dužinu životnog veka (Aspinall i Goronzy, 2010). U tom kontekstu, treba istaći da incidenca infektivnih bolesti i mortalitet od infektivnih bolesti značajno raste kod starih, dok se efikasnost odgovora na vakcinaciju dramatično smanjuje. Pored toga, uočava se i povećanje incidence malignih bolesti, dok su podaci vezani za autoimunske bolesti kod starih kontradiktorni.

Kada je u pitanju uticaj starenja na pojedine ćelijske komponente ovog sistema, ranije je smatrano da promene primarno pogađaju odeljak stečenog imuniteta (Pawelec i sar., 2002), a da komponente urođenog imuniteta (gde spadaju i DĆ) tokom starenja ne podležu promenama, ili podležu znatno manje izraženim promenama. Rezultati brojnih istraživanja koja su vršena poslednjih desetak godina su pokazala suprotno (Panda i sar., 2009; Shaw i sar., 2010; Solana i sar., 2012). Imajući u vidu sve prethodno navedeno, verujemo da bi rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji mogli da budu od značaja za bolje razumevanje promena u funkciji DĆ, kao profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija sa važnom ulogom u započinjanju, održavanju i regulaciji imunskog odgovora kod starih jedinki (Banchereau i sar., 2000).

Osim toga, važno je istaći da rezultati ove disertacije ukazuju i na ulogu genetskih faktora u nastanku promena funkcije DĆ starih jedinki. S obzirom na ulogu DĆ u imunskom odgovoru, jasno je da bi ove promene mogle da imaju i važne patofiziološke implikacije, što dalje sugeriše značaj genetskih faktora u imunopatologiji koja se javlja kod starih. Posebno, treba istaći rezultate koji ukazuju da je promena u osetljivosti eksperimentalnih životinja na indukciju organ specifičnih autoimunskih bolesti, kao što je EAE, kod starih genetski uslovljena, što bi moglo da doprinese razumevanju ranije uočenog fenomena da genetski faktori utiču na vreme pojave prvih simptoma autoimunske bolesti, težinu i tok bolesti.

Konačno, treba istaći da bi rezultati ove doktorske disertacije, ukazujući na neke od celularnih i molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi promena koje se uočavaju kod DĆ starih eksperimentalnih životinja, mogli da predstavljaju dobru polaznu osnovu za razvoj imunofarmakoloških „intervencija“ s ciljem da se spreče/umanje neželjeni efekti starenja na

imunski sistem i patologiju koja je vezana za poremećaje njegove funkcije, odnosno da se poveća efikasnost imunskog odgovora, onda kada je to potrebno, npr. pred velike hirurške zahvate, pri davanju sezonske vakcine protiv gripa itd.

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da rezultati kandidata mr sc. dr med. Biljane Bufan, koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos oblasti Farmakologije - Imunofarmakologije.

Rezultati doktorske disertacije su publikovani u dva rada: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu kategorije **M21** i jedan rad u međunarodnom časopisu kategorije **M23** i u vidu jednog saopštenja na međunarodnom naučnom skupu (**M34**) i jednog saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampanog u izvodu (**M64**).

Uzimajući u obzir sve izloženo, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju mr sc. dr med. Biljane Bufan i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike dendritskih ćelija različitih sojeva pacova“.

Dr Zorica Stojić-Vukanić-mentor (Predsednik komisije),
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Gordana Lepasavić,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Mirjana Dimitrijević,
naučni savetnik, Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“
Institut za virusologiju, serume i vakcine „Torlak“, Beograd

Beograd, 04.07.2014.