

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Biljana S. Bufan

**UTICAJ STARENJA NA
FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE
KARAKTERISTIKE DENDRITSKIH
ĆELIJA RAZLIČITIH SOJEVA PACOVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Biljana S. Bufan

**INFLUENCE OF AGING ON
PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL
CHARACTERISTICS OF DENDRITIC
CELLS FROM DIFFERENT RAT
STRAINS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014

MENTOR:

Dr sc. Zorica Stojić-Vukanić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr sc. Gordana Leposavić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

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

Datum odbrane: _____

UTICAJ STARENJA NA FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU DENDRITSKIH ĆELIJA RAZLIČITIH SOJEVA PACOVA

Rezime

Dendritske ćelije (DĆ) su profesionalne antigen-prezentujuće ćelije koje čine sponu između urođenog i stečenog imuniteta i imaju važnu ulogu u imunskom odgovoru. Pored toga, DĆ imaju ulogu u uspostavljanju i održavanju imunološke tolerancije, kao i u patogenezi autoimunskih bolesti. Istraživanja na polju biologije starenja ćelija imunskog sistema su pokazala da tokom starenja komponente i urođenog i stečenog imuniteta podležu promenama. Podaci vezani za uticaj starenja na DĆ nisu konzistentni i uglavnom se odnose na ćelije humanog porekla, ćelije primata i miševa, dok nema podataka o uticaju starenja na DĆ pacova.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike konvencionalnih DĆ (kDĆ) pacova, kao i mogući značaj sojnih razlika za nastanak starenjem uslovljenih promena ovih ćelija. Takođe, cilj je bio i da se utvrdi da li starenjem uslovljene promene kDĆ pacova koreliraju sa promenom osetljivosti pacova na indukciju organ-specifičnih autoimunskih bolesti. Ispitivane su sveže izolovane kDĆ i stimulisane *in vitro* lipopolisaharidom (LPS). Konvencionalne DĆ su izolovane iz slezina pacova uzrasta 3 meseca (mladi odrasli pacovi) i 26 meseci (stari pacovi) Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja, koji pokazuju različit stepen osetljivosti na indukciju organ-specifične autoimunske bolesti posredovane Th1/Th17 limfocitima, kao što je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE).

Starenje dovodi do veće zastupljenosti ćelija CD4- fenotipa u populaciji sveže izolovanih kDĆ starih AO pacova za razliku od mladih životinja, kod kojih je brojnija CD4+ subpopulacija, a ne utiče na zastupljenost ovih subpopulacija kod DA pacova, tako da je kod njih u oba uzrasta dominantna CD4- subpopulacija. Osim toga, sveže izolovane kDĆ starih AO pacova pokazuju nezreliji, a starih DA pacova zreliji fenotip, u odnosu na kDĆ mladih pacova odgovarajućeg soja, a što je procenjeno na osnovu nivoa ispoljenosti aktivacionih molekula (CD80, CD86 i CD40). U skladu sa fenotipom, endocitozni kapacitet kDĆ starih AO pacova je bio veći, dok je kod kDĆ starih DA pacova bio manji. Starenje dovodi do promena u ekspresiji iRNK za proinflamatorne i imunoregulatorne citokine kod pacova oba soja, s tim što su te promene suprotne kada

je u pitanju iRNK za IL-6 i IL-1 β (starenje smanjuje ekspresiju iRNK za IL-6, a povećava ekspresiju iRNK za IL-1 β kod AO), različite (iRNK za IL-10 raste kod DA, a ne menja se kod AO pacova) ili slične (ekspresija TNF- α se povećava kod oba soja pacova, a iRNK za TGF- β se značajno ne menja).

Kod AO pacova starenje povećava, a kod DA pacova smanjuje aktivaciju/sazrevanje kDĆ nakon stimulacije LPS-om. Kod pacova oba soja, starenje smanjuje sposobnost kDĆ stimuliranih LPS-om da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita, što se može povezati sa manjom gustinom MHC molekula II klase na ovim ćelijama u odnosu na odgovarajuće ćelije mladih pacova. Takođe, starenje dovodi do sojno specifičnih promena u sintezi i sekreciji citokina koji su važni za usmeravanje diferencijacije naivnih CD4+ T limfocita. Kod starih AO pacova povećava se sinteza i sekrecija IL-6 i IL-23, ključnih citokina za diferencijaciju Th17 limfocita, ali i IL-12 i TNF- α , koji usmeravaju diferencijaciju naivnih CD4+ limfocita u Th1 ćelije, a smanjuje sintezu i sekrecija IL-10. U kDĆ starih pacova DA soja, u prisustvu LPS-a pored povećanja sinteze i sekrecije IL-6 i IL-23, povećava se i sinteza i sekrecija IL-10, a smanjuje TNF- α , dok sinteza i sekrecija IL-12 ostaje na onom nivou koji je izmeren u ovim ćelijama koje su izolovane iz mladih pacova. Starenje povećava nivo IFN- γ (citokina koji karakteriše Th1 limfocite) i IL-17 (citokina koji karakteriše Th17 limfocite) u ko-kulturi alogernih CD4+ limfocita i kDĆ pacova AO soja stimuliranih LPS-om, dok u ko-kulturi kDĆ pacova DA soja stimuliranih LPS-om i alogernih CD4+ limfocita, ne dovodi do promene nivoa IFN- γ i IL-17, makar delimično usled povećane sekrecije IL-10 od strane kDĆ.

U zavisnosti od soja, starenje različito utiče na razvoj EAE-a. Starenjem AO pacovi, koji su relativno rezistentni na indukciju EAE-a u ranom adultnom uzrastu, postaju osetljiviji, dok DA pacovi, koji su u ranom adultnom uzrastu osetljivi na indukciju EAE-a, pokazuju značajno smanjenje osetljivosti sa starenjem. Ove promene u osetljivosti na indukciju EAE-a koreliraju sa starenjem uslovljenim promenama u ekspresiji gena za citokine koji usmeravaju diferencijaciju CD4+ limfocita u ćelije Th1/Th17 citokinskog profila.

U zaključku, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da starenje menja funkciju DĆ, ukazuju na ulogu genetskih faktora u nastanku tih promena i doprinose boljem razumevanju celularnih i molekulskih mehanizama koji stoje u osnovi promena

koje se uočavaju kod DC⁺ starih eksperimentalnih životinja, što bi moglo da predstavlja dobru polaznu osnovu za razvoj imunofarmakoloških strategija 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.

Ključne reči: konvencionalne dendritske ćelije pacova, starenje, sojne razlike, Th polarizacija, alostimulatorna sposobnost, endocitorna sposobnost, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija-Imunofarmakologija

UDK broj: 57.085 : [576.385 : 591.139] (043.3)

612.429 (043.3)

INFLUENCE OF AGING ON PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF DENDRITIC CELLS FROM DIFFERENT RAT STRAINS

Summary

Dendritic cells (DCs) are the professional antigen-presenting cells that form an interface between innate and adaptive immunity and play an important role in the immune response. They are also central in the establishment and maintenance of immune tolerance, as well as in the pathogenesis of autoimmune diseases. Aging is associated with the progressive immune system changes, which involve all types of immune cells. The data on age-associated DC alterations origin mainly from studies in mice and human, and are largely inconsistent, while there are no data on the influence of aging on rat DCs.

The aim of this thesis was to elucidate the influence of aging on the phenotypic and functional characteristics of conventional DCs (cDCs), and the possible significance of strain differences in the development of age-related changes. In addition, this thesis was aimed to investigate a putative correlation between age-related changes in cDC biology and rat susceptibility to induction of organ-specific autoimmune diseases. Freshly isolated cDCs and cDCs stimulated *in vitro* with lipopolysaccharide (LPS) were investigated. The cells were isolated from the spleens of 3- (young adult) and 26 month-old (aged) rats of Albino Oxford (AO) and Dark Agouti (DA) strain, which are relatively resistant (AO) and susceptible (DA) to the induction of Th1/Th17-mediated organ-specific autoimmune disease, as it is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

In AO rats aging increased relative proportion of cells exhibiting CD4- phenotype within population of freshly isolated cDCs, while in young animals CD4+ cells represented the predominant subpopulation within cDCs. In DA rats aging did not affect cDC subset composition, so predominance of CD4- subset within cDCs in rats of both ages was found. Aging affected surface phenotype and endocytic capacity of freshly isolated cDCs in a strain-specific manner. Namely, the lower surface density of activation markers (CD80, CD86 and CD40) on cDCs from aged AO rats and their higher endocytic capacity suggested that they were less mature than cDCs from young

rats. To the contrary, increased surface expression of activation markers on cDCs and decreased endocytic capacity of these cells in aged DA rats suggested that they were more mature than corresponding cells from young rats.

Freshly isolated cDCs from aged AO rats expressed increased amount of mRNA for TNF- α and IL-1 β and decreased that for IL-6 when compared with strain-matched young rats. On the other hand, in the same cells from aged DA rats the expression of mRNA for TNF- α , IL-6 and IL-10 was augmented and that for IL-1 β was diminished relative to that of corresponding mRNA in cDCs from strain-matched young animals. The amounts of mRNA for TGF- β in fresh cDCs from rats of both strains and that for IL-10 in the same cells from AO rats remained stable with aging.

Aging exerted differential influence on cDCs activation/maturation in rats of AO and DA strain. Namely, in AO rats the activation/maturation of cDCs increased upon stimulation with LPS, while in DA rats it decreased. In both rat strains, age-related decrease in cDC capacity to induce proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells in mixed leukocytes reaction (MLR) was found. This phenomenon most likely reflected a lower MHC II surface density on LPS-stimulated cDC from aged rats compared with those from young rats. Also, aging leads to strain specific changes in the production of cytokines driving/influencing Th polarization. In AO rats, aging increased the LPS-induced production of IL-6 and IL-23, the cytokines controlling Th17 cell polarization, as well as IL-12 and TNF- α , the cytokines that direct differentiation of naive CD4⁺ lymphocytes towards Th1 cells, while it reduced the production of immunoregulatory IL-10. In DA rats, apart from an increase in LPS-stimulated cDC production of IL-6 and IL-23 with aging, the changes in LPS-stimulated production of some other cytokines were found. Namely, aging increased and reduced the LPS-stimulated production of IL-10 and TNF- α , respectively, while the LPS-induced production of IL-12 remained stable with aging. The aging increased the level of IFN- γ (Th1 signature cytokine) and IL-17 (Th17 signature cytokine) in co-cultures of allogeneic CD4⁺ cells and LPS-stimulated cDC from aged AO rats, while in the co-cultures of LPS-stimulated cDC from aged DA rats with the same responder cells did not significantly influence the levels of IFN- γ and IL-17, at least partly due to the increased production of IL-10 by cDCs.

Aging influenced susceptibility to EAE in a strain-specific manner. With aging, AO rats, that are relatively resistant to the induction of EAE in early adult age, became more susceptible, while DA rats, which are highly susceptible to the induction of EAE in early adult age, were shown to be more resistant to the disease induction. These age-related changes in the sensitivity to the induction of EAE correlated with the age-related alterations in expression of genes encoding cytokines, which drive Th1/Th17 polarization.

In conclusion, the data obtained in this thesis indicated that aging alters the functional capacity of rat cDCs and pointed out to the molecular correlates of these changes. In addition, it pointed out to the role of genetic factors in their development. Overall, the findings presented in this thesis could represent a good starting point for designing new immunopharmacological strategy in order to prevent/minimize the adverse effects of aging on the immune system or, when it is needed, to improve the efficiency of the immune response.

Key words: rat conventional dendritic cells, aging, strain differences in rats, Th polarization, allostimulatory capacity, cytokine production, endocytic capacity, experimental autoimmune encephalomyelitis

General subject area: Pharmacy

Subject area: Pharmacology-Immunopharmacology

UDC number: 57.085 : [576.385 : 591.139] (043.3)

612.429 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. DENDRITSKE ĆELIJE	2
1.1.1. Opšte karakteristike	2
1.1.2. Podela DĆ.....	3
1.1.3. Ontogeneza i homeostaza DĆ.....	4
1.1.3.1. Razvoj slezinskih kDĆ	6
1.1.4. Aktivacijski status i funkcijske karakteristike DĆ	7
1.1.5. Uloga DĆ u polarizaciji imunskog odgovora	9
1.1.6. Uloga DĆ u imunološkoj toleranciji.....	11
1.1.7. Uloga DĆ u nastanku autoimunskih bolesti	13
1.1.8. Dendritske ćelije pacova.....	14
1.1.8.1. Identifikacija, lokalizacija i subpopulacije	14
1.1.8.2. Fenotipske karakteristike.....	16
1.1.8.3. Funkcijske karakteristike.....	17
1.2. STARENJE IMUNSKOG SISTEMA	17
1.2.1. Promene na molekulskom nivou	19
1.2.2. Promene na ćelijskom nivou i nivou populacija ćelija	20
1.2.2.1. Limfo-hematopoetski odeljak u kostnoj srži	20
1.2.2.2. Ćelije stečenog imuniteta	20
1.2.2.3. Ćelije urođenog imuniteta	21
1.2.2.3.1. Dendritske ćelije	23
1.2.3. Imunopatološka stanja kod starih	25
1.3. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS	27
1.4. SOJNE RAZLIKE KOD PACOVA	28
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJAL I METODE	34
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	35
3.1.1. Eksperimentalne grupe i procedure	35
3.1.2. Dozvola Etičkog komiteta	36
3.2. HEMIKALIJE, ANTITELA I IMUNOKONJUGATI.....	36

3.3. IZDVAJANJE ČELIJA	39
3.3.1. Izdvajanje i aktivacija kDC	39
3.3.1.1. Dobijanje frakcije ćelija niske gustine.....	39
3.3.1.2. Imunomagnetno izdvajanje kDC	40
3.3.2. Izdvajanje CD4+ T limfocita iz slezine i obeležavanje CFSE-om.....	40
3.4. PROTOČNA CITOFLUOROMETRIJA	41
3.4.1. Priprema uzoraka za analizu ispoljenosti membranskih antigena.....	41
3.4.2. Analiza uzoraka protočnom citofluorometrijom	42
3.5. ODREĐIVANJE ENDOCITOZE DEKSTRANA.....	43
3.6. ODREĐIVANJE PROLIFERACIJE ALOGENIH CD4+ T LIMFOCITA.....	44
3.7. ODREĐIVANJE PREŽIVLJAVANJA kDC U KULTURI	44
3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA CITOKINE I TLR4.....	45
3.8.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva slezine i kDC.....	45
3.8.2. Prevođenje ukupne RNK u komplementarnu DNK	45
3.8.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu	46
3.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CITOKINA ENZIMSKIM IMUNOLOŠKIM METODAMA.....	47
3.9.1. TNF- α	48
3.9.2. IL-10	49
3.9.3. IL-12p70	49
3.9.4. IL-6	50
3.9.5. IL-23	51
3.9.6. TGF- β 1	51
3.9.7. IFN- γ	52
3.9.8. IL-17A	53
3.9.9. IL-4	54
3.10. INDUKCIJA I RAZVOJ EKSPREMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA.....	55
3.10.1. Indukcija EAE-a	55
3.10.2. Razvoj EAE-a.....	55
3.11. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	55

4. REZULTATI	57
4.1. UTICAJ STARENJA NA FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU SVEŽE IZOLOVANIH SLEZINSKIH kDC PACOVA AO I DA SOJA	58
4.1.1. Uticaj starenja na zastupljenost različitih subpopulacija kDC	58
4.1.2. Uticaj starenja na ispoljenost antigen-prezentujućih i kostimulatornih molekula	62
4.1.3. Uticaj starenja na ispoljenost TLR4 molekula	66
4.1.4. Uticaj starenja na endocitozni kapacitet	68
4.1.5. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine i TLR4	70
4.1.5.1. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u slezini.....	70
4.1.4.2. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine i TLR4 u kDC.....	72
4.2. UTICAJ STARENJA NA SPOSOBNOST AKTIVACIJE/SAZREVANJA SLEZINSKIH kDC PACOVA AO I DA SOJA U KULTURI NAKON STIMULACIJE LPS-OM.....	75
4.2.1. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDC iz kulture	75
4.2.1.1. „Spontana“ aktivacija u medijumu	75
4.2.1.2. Aktivacija LPS-om	80
4.2.2. Uticaj starenja na funkcijske karakteristike kDC iz kulture	84
4.2.2.1. Starenje smanjuje kapacitet kDC da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita	84
4.2.2.2. Uticaj starenja na sintezu i sekreciju citokina od strane kDC iz kulture	87
4.2.2.2.1. Ekspresija gena za citokine u kDC	87
4.2.2.2.2. Koncentracija citokina u supernatantima kultura kDC	91
4.2.2.3. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u ko-kulturama kDC i alogernih CD4+ T limfocita	95
4.3. UTICAJ STARENJA NA INDUKCIJU I RAZVOJ EAE-a.....	99
5. DISKUSIJA	100
5.1. UTICAJ STARENJA NA SVEŽE IZOLOVANE SLEZINSKE kDC PACOVA AO I DA SOJA.....	101
5.1.1. Uticaj starenja na zastupljenost različitih subpopulacija kDC	101
5.1.2. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike.....	103

5.1.3. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u kDĆ i tkivu slezine	104
5.1.4. Uticaj starenja na endocitozni kapacitet kDĆ.....	106
5.2. UTICAJ STARENJA NA SPOSOBNOST AKTIVACIJE/SAZREVANJA SLEZINSKIH kDĆ PACOVA AO I DA SOJA U KULTURI NAKON STIMULACIJE LPS-OM.....	108
5.2.1. Uticaj starenja na „spontanu“ aktivaciju kDĆ.....	108
5.2.2. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDĆ stimuliranih LPS-om	109
5.2.3. Uticaj starenja na kapacitet kDĆ da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita.....	112
5.2.4. Uticaj starenja na kapacitet kDĆ da usmeravaju diferencijaciju alogernih CD4+ T limfocita ka različitim Th efektorskim ćelijama	113
5.3. UTICAJ STARENJA NA INDUKCIJU I RAZVOJ EAE-A KOD PACOVA AO I DA SOJA	118
6. ZAKLJUČCI	122
7. LITERATURA	126

1. UVOD

1.1. DENDRITSKE ĆELIJE

1.1.1. Opšte karakteristike

Dendritske ćelije (DĆ) su profesionalne antigen-pozitivne ćelije (APĆ) sa važnom ulogom u započinjanju, održavanju i regulaciji imunskog odgovora. U okviru APĆ, one ispoljavaju jedinstvenu osobinu da aktiviraju naivne T limfocite i započnu primarni imunski odgovor, kao i da utiču na tip imunskog odgovora koji će se razviti (Banchereau i Steinman, 1998; Kapsenberg, 2003; Walsh i Mills, 2013). Osim sa T limfocitima, DĆ “komuniciraju” i sa drugim ćelijama, kako stečenog tako i urođenog imuniteta i predstavljaju sponu između urođenog i stečenog imuniteta (Hart, 1997; Banchereau i Steinman, 1998; Banchereau i sar., 2000; Walsh i Mills, 2013). Pored navedenih, značajna je i njihova uloga u indukciji i održavanju imunološke tolerancije i samim tim i u nastanku autoimunskih bolesti (Drakesmith i sar., 2000; Steinman i sar., 2003; Smits i sar., 2005).

Prvi opis ovih ćelija datira iz 1868. godine kada je Langerhans opisao epidermalne DĆ. Međutim, njihova funkcija nije bila poznata sve do sedamdesetih godina 20-tog veka, kada su Steinman i Cohn identifikovali DĆ u slezini miša i pokazali njihovu ulogu u primarnom imunskom odgovoru. Istraživanja sprovedena narednih godina su pokazala da se ove ćelije nalaze i u ne-limfnim tkivima, i to kako glodara tako i čoveka (Hart, 1997). DĆ su prisutne u svim tkivima, osim u mozgu, nekim delovima oka i testisa (Hart, 1997) i predstavljaju veoma retku populaciju ćelija. Procenjuje se da DĆ i njihovi prekursori čine samo 0.1% mononuklearnih ćelija periferne krvi (Hart, 1997), 1% - 2% ukupnog broja ćelija u perifernim tkivima i oko 4% ukupnih ćelija slezine miša (Duriancik i Hoag, 2009).

Osnovna morfološka karakteristika DĆ, po kojoj su i dobile naziv, su brojni citoplazmatski nastavci (dendriti) i oni su naročito izraženi kod aktivisanih/zrelih DĆ. Ovi nastavci mogu biti dužine $>10 \mu\text{m}$ i pripisuje im se značajna uloga u ostvarivanju bliskog kontakta sa drugim ćelijama (Banchereau i Steinman, 1998).

1.1.2. Podela DĆ

Populacija DĆ je, iako malobrojna, izuzetno heterogena. One se razlikuju prema lokalizaciji, putevima migracije, funkciji koju obavljaju u okviru imunskog sistema, kao i prema svom nastanku (razvojnog putu) (Shortman i Naik, 2007). Osnovna podela ovih ćelija u stanjima bez infekcije ili inflamacije je na konvencionalne (k) DĆ i plazmocitoidne (p) DĆ (Sathe i Shortman, 2008).

U okviru populacije kDĆ mogu se razlikovati migratorne i nemigratorne odnosno rezidentne kDĆ u limfnim tkivima (Sathe i Shortman, 2008). Migratorne kDĆ su lokalizovane u perifernim tkivima koja su direktno izložena delovanju spoljašnje sredine i ulasku patogena i one, putem limfnih sudova, migriraju ka drenirajućim limfnim čvorovima. Migracija kDĆ se odvija tokom inflamacije ili infekcije, ali i u njihovom odsustvu (Worbs i sar., 2006). Proces migracije je praćen sazrevanjem DĆ, pri čemu se mogu funkcionalno razlikovati zrele DĆ aktivisane patogenom od onih koje su sazrele u uslovima bez inflamacije ili infekcije. Prve, u limfnim čvorovima aktivišu naivne T limfocite, dok su ove druge zadužene za održavanje stanja tolerancije (Banchereau i Steinman, 1998; Romani i sar., 2003; Turnbull i sar., 2005).

Drugu grupu predstavljaju nemigrirajuće, rezidentne kDĆ, koje se nalaze u limfnim organima u kojima se i odvija njihov celokupan životni ciklus. U limfnim organima one preuzimaju antigene, prerađuju ih i prezentuju T limfocitima (Shortman i Naik, 2007). Ove nemigrirajuće, rezidentne ćelije čine većinu kDĆ u timusu i slezini (Vremec i sar., 2000), dok u limfnim čvorovima, u odsustvu infekcije ili inflamacije, one čine polovinu svih kDĆ (Henri i sar., 2001; Wilson i sar., 2003).

Migratorne i rezidentne kDĆ limfnih tkiva se dalje mogu podeliti na različite subpopulacije. Migratorne se razlikuju prema tkivu iz koga potiču i te razlike, koje se zasnivaju na ispoljenosti određenih površinskih markera, se zadržavaju i nakon dospevanja u limfni čvor (Valladeau i sar., 2000; Henri i sar., 2001). U okviru rezidentnih kDĆ se, takođe, mogu razlikovati subpopulacije i to na osnovu ispoljenosti površinskih molekula i funkcije ovih ćelija (Shortman i Liu, 2002).

Plazmocitoidne pre-DĆ se mogu naći u krvi, limfnim organima i perifernim tkivima i one tek nakon aktivacije stiču morfološke i funkcijske karakteristike DĆ (Shortman i Naik, 2007). Plazmocitoidne DĆ poseduju sposobnost produkcije velikih

količina interferona (*engl.* interferon, IFN) α/β kao odgovor na virusne i bakterijske infekcije (McKenna i sar., 2005). Njihova hronična aktivacija, bez postojanja infekcije, doprinosi razvoju autoimunskog procesa, dok, sa druge strane, neaktivisane ili alternativno aktivisane imaju ulogu u toleranciji (Swiecki i Colonna, 2010).

Posebnu populaciju DĆ predstavljaju inflamatorne DĆ koje nastaju u uslovima infekcije ili inflamacije. Kao primer ovih ćelija navode se DĆ, koje u odgovoru na bakterijsku infekciju produkuju faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF) i inducibilnu azot monoksid (NO) sintazu (iNOS) (*engl.* TNF/iNOS-producing [Tip]-DC) (Serbina i sar., 2003) i DĆ porekla monocita (MoDĆ) (Čolić i sar., 2003; Sunderkotter i sar., 2004).

1.1.3. Ontogeneza i homeostaza DĆ

Dendritske ćelije, kao i drugi leukociti, vode poreklo od matične ćelije kostne srži (Liu i Nussenzweig, 2010). Poznato je da rano tokom hematopoeze nastaje zajednički mijeloidni progenitor (*engl.* common myeloid progenitor, CMP) i zajednički limfoidni progenitor (*engl.* common lymphoid progenitor, CLP) (Kondo i sar., 1997; Akashi i sar., 2000). Stavovi o poreklu DĆ u odnosu na ova dva progenitora su se menjali. Ranije stanovište, koje je danas uglavnom napušteno, je bilo da su DĆ mijeloidnog porekla zbog njihove sličnosti sa makrofagima i mogućnosti dobijanja DĆ od monocita u kulturi (Inaba i sar., 1993). Međutim, iznenađujući je bio nalaz da i od limfoidnog prekursora u timusu miša mogu da nastanu DĆ, uz objašnjenje da su CD8+ kDĆ limfoidnog, a CD8- kDĆ mijeloidnog porekla (Ardavin i sar., 1993). Ovaj koncept je opovrgnut kada je nekoliko studija na miševima pokazalo da sve subpopulacije DĆ mogu nastati i od CMP i od CLP (Manz i sar., 2001; Wu i sar., 2001), a što je potvrđeno i u eksperimentima sa humanim CMP i CLP (Chicha i sar., 2004). Ovakvi nalazi ukazuju na izuzetnu fleksibilnost razvojnog puta DĆ u odnosu na druge ćelije hematopoeznog sistema, kao i na to da se opredeljivanje ćelija da diferenciraju u pravcu DĆ i različitih subpopulacija DĆ dešava nishodno od CLP i CMP (Shortman i Naik, 2007). Danas preovlađuje mišljenje da je jedina karakteristika koja definiše mijeloidne odnosno limfoidne prekursore kao rane prekursore DĆ ispoljenost receptora tirozin kinaze 3 slične FMS (*engl.* FMS-like tyrosine kinase 3, Flt3) (D'Amico i Wu, 2003; Karsunky i sar., 2003) i upućuje na centralnu ulogu Flt3 liganda (L) u razvoju DĆ u

uslovima bez infekcije i inflamacije (Shortman i Naik, 2007). Mijeloidni prekursori su zastupljeniji u kostnoj srži, te je većina DĆ u slezini i limfnim čvorovima mijeloidnog porekla, dok je većina DĆ u timusu limfoidnog porekla, zbog veće zastupljenosti limfoidnih prekursora u tom limfnom organu (Shortman i Naik, 2007).

Sledeći u nizu nishodnih prekursora DĆ koji su izolovani iz kostne srži miša i imaju sposobnost diferencijacije u kDC su: prekursor makrofaga i DĆ (*engl.* macrophage dendritic cells precursor, MDP) i zajednički prekursor DĆ (*engl.* common dendritic cells precursor, CDP) ili pro-DĆ. Protočnom citometrijom nije pokazano prisustvo ovih ćelija ni u krvi ni u slezini (Sathe i Shortman, 2008).

Zajednički progenitor kDC limfnih tkiva, pDC i monocita je MDP ($\text{Lin}^- \text{cKit}^{\text{hi}} \text{CD115}^+ \text{CX3CR1}^+ \text{Flt3}^+$), i ove ćelije čine oko 0.5% svih mononuklearnih ćelija kostne srži miša (Jakubzick i sar., 2008). Njihovom daljom diferencijacijom nastaju, sa jedne strane monociti i od njih dalje makrofagi, a sa druge strane CDP. Od CDP ($\text{Lin}^- \text{cKit}^{\text{lo}} \text{CD115}^+ \text{Flt3}^+$) daljom diferencijacijom mogu nastati pre-kDC i pDC (Liu i Nussenzweig, 2010).

Pre-kDC ($\text{Lin}^- \text{CD11c}^+ \text{MHC II-SIRP}\alpha^{\text{int}} \text{Flt3}^+$) su direktni prekursori kDC. Oni iz kostne srži migriraju, putem krvi, u limfne organe, gde i ostaju (Liu i sar., 2009). Ove ćelije čine oko 0.5% svih leukocita kostne srži, 0.02% krvi, 0.05% slezine i 0.03% leukocita limfnih čvorova (Liu i sar., 2007). Pre-kDC kratko vreme ostaju u krvi (oko 1 h), što je, pored njihovog malog procenta, bio još jedan razlog zašto dugo vremena nisu bile identifikovane. Njih karakteriše i izrazita plastičnost u odnosu na dalji razvoj DĆ i od njih mogu nastati različite subpopulacije kDC u limfnim i ne-limfnim tkivima (Liu i Nussenzweig, 2010). Ove ćelije ne ispoljavaju morfologiju koja je karakteristična za DĆ. Pokazano je da slezinske pre-kDC miša, pre nego što ispolje CD4, CD8 i MHC II površinske molekule, ispoljavaju CD24 molekul i razlikuju se prema gustini njegove ispoljenosti. Od pre-kDC koje imaju veliku površinsku gustinu CD24 nastaju CD8+, a od onih koje imaju malu površinsku gustinu CD24 nastaju CD8- kDC (Naik i sar., 2006). U literaturi ne postoje podaci koji se odnose na heterogenost pre-kDC u slezini pacova i koji bi mogli da ukažu na njihovu usmerenost ka razvoju u pravcu CD4+ ili CD4- subpopulacije.

Uopšteno govoreći, homeostaza DC zavisi od dolaska prekursora iz kostne srži, broja deoba DC *in situ* (koji je ograničen) i njihovog vremena polu-života (Liu i Nussenzweig, 2010). Suprotno prethodnom uverenju da su DC terminalno diferencirane ćelije koje se ne dele, pokazano je da je oko 5% DC u limfnim i ne-limfnim tkivima u procesu deobe u svakom trenutku. Ove ćelije se u tkivima dele tokom 10-14 dana i nakon toga bivaju zamenjene novim pre-DC iz kostne srži. (Liu i Nussenzweig, 2010). Deoba DC u uslovima homeostaze je regulisana posredstvom receptora za limfotoksin (*engl.* lymphotoxin, LT)- β i Flt3. Efekat LT je ograničen na subpopulaciju mišijih CD8-kDC i ovaj citokin reguliše njihovu homeostatsku proliferaciju. Za razliku od njega, Flt3L utiče na sve stadijume razvoja DC u limfnim i ne-limfnim tkivima (Maraskovsky i sar., 1996; Waskow i sar., 2008). On je ključni faktor homeostaze ovih ćelija *in vivo* i reguliše i deobe zrelih DC *in situ* (Waskow i sar., 2008). Vreme polu-života DC varira od 5 do 7 dana u slezini, limfnom čvoru, jetri i bubregu, pa i do 25 dana u plućima (Liu i Nussenzweig, 2010).

Interesantan je nalaz da i CD4+CD25+Foxp3+ regulatorni T limfociti (T reg) imaju uticaja na razvoj i održavanje homeostaze DC. Tačnije, deplecija ovih T reg dovodi do ekspanzije DC u limfnim organima (Kim i sar., 2007). Sa druge strane, povećanje broja DC vodi povećanju broja T reg i obrnuto, sa smanjenjem broja DC smanjuje se i broj T reg. Ova povratna sprema između DC i T reg je posredovana Flt3L, koji se proizvodi lokalno i čiji izvor još uvek nije definisan. Promene u funkcionisanju ove sprege mogu dovesti do poremećaja funkcije imunskog sistema i toka autoimunskih bolesti (Liu i Nussenzweig, 2010).

1.1.3.1. Razvoj slezinskih kDC

Slezina se u eksperimentalnom radu često koristi kao izvor rezidentnih DC poreklom iz limfnog tkiva. Kada je u pitanju razvoj kDC u slezini, osim prethodno navedenih podataka koji se tiču razvoja DC, a odnose se na dolazak pre-kDC, vreme polu-života DC i homeostatsku proliferaciju ovih ćelija, interesantna je i činjenica da je ovaj organ u izvesnom stepenu nezavisan, u odnosu na kostnu srž i krv, u pogledu nastanka ovih ćelija. Naime, rezultati ispitivanja dugotrajnih kultura splenocita *in vitro* (Winzler i sar., 1997; Berthier i sar., 2000), kao i studije na parabiotičnim miševima (Kabashima i sar., 2005), ukazali su na postojanje značajnog endogenog pula prekursora

DC u slezini (Shortman i Naik, 2007). Takođe, u literaturi postoji podatak o uspešnom izolovanju ovog neposrednog, endogenog prekursora iz slezine miša i njegovoj usmerenoj diferencijaciji u pravcu svih subpopulacija kDC, ali ne i pDC (Shortman i Naik, 2007) i makrofaga (Naik i sar., 2006). U kakvom su odnosu ove slezinske pre-kDC sa prekursorima iz kostne srži nije poznato. Moguće je da slezinske DC vode poreklo i od pre-kDC iz kostne srži, ali isto tako, s obzirom da je slezina organ u kome se odvija hematopoeza, pretpostavlja se da mogu nastati i *in situ* od endogenog prekursora (Shortman i Naik, 2007).

1.1.4. Aktivacijski status i funkcijske karakteristike DC

Važna karakteristika DC, od koje umnogome zavisi i funkcija, je njihov aktivaciono/maturacioni status. Određivanjem ovog statusa, na osnovu ispoljenosti karakterističnih markera, može se napraviti razlika između nezrelih i zrelih, kao i između neaktivisanih i aktivisanih DC (Banchereau i Steinman, 1998; Naik, 2008). Nezrele DC karakteriše niska ispoljenost molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) i odsustvo ili niska ispoljenost kostimulatornih molekula (CD80 i CD86), kao i slaba sposobnost stimulacije T limfocita (Banchereau i Steinman, 1998). Glavna uloga nezrelih DC, koje su prisutne u perifernim tkivima i perifernim limfnim organima (rezidentne DC), je prihvatanje i obrada antigena, kako stranih tako i sopstvenih (Banchereau i sar., 2000, Guermonprez i sar., 2002). Za obavljanje ovog procesa, one koriste nekoliko mehanizama: makropinocitozu, endocitozu posredovanu receptorima i fagocitozu (Hart, 1997, Banchereau i Steinman, 1998, Banchereau i sar., 2000). Makropinocitozom DC nespecifično preuzimaju velike količine ekstracelularne tečnosti i kod njih je, za razliku od makrofaga i epitelnih ćelija, ovakav način preuzimanja konstitutivna osobina. Endocitozom i fagocitozom preuzimaju antigene iz ekstracelularne tečnosti. Endocitozom preuzimaju solubilne antigene, a fagocitozom apoptotične i nekrotične ćelije, viruse, bakterije, gljivice, parazite i druge čestice (Guermonprez i sar., 2002). Procesi prihvatanja i internalizacije antigena se obavljaju posredstvom receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena (*engl.* pathogen associated molecular patterns, PAMP), od kojih su najznačajniji: familija lektinskih receptora (manozni receptor-MR, DEC 205, DC-SIGN), receptori slični „Toll“-u (*engl.* Toll-like receptors,

TLR), receptori slični NOD-u, receptori slični RIG-u, receptori „čistači“ (*engl.* scavenger receptors) (Janeway i Medzhitov, 2002). Osim ovih, pokazano je postojanje i receptora za prepoznavanje antigena domaćina koji se oslobađaju u ekstracelularni prostor nakon oštećenja ćelije, kao što su HMGB1 (*engl.* high-mobility group protein box 1), proteini toplotnog šoka (*engl.* heat shock proteins, HSP) i S100A7B proteini. Ovi receptori se nazivaju DAMP receptori, jer prepoznaju molekulske obrasce oštećenja (*engl.* damage associated molecular patterns, DAMP) (Schmidt i sar., 2012). U proces preuzimanja antigena uključeni su i receptori za Fc fragment imunoglobulina (FcR) i receptori za komponente komplementa (CR) (Guermontprez i sar., 2002; Dubsky i sar., 2005). Makropinocitoza i endocitoza posredovana receptorima su kod DĆ izuzetno efikasne tako da su dovoljne piko- i nanomolarne koncentracije nekog antigena da on bude internalizovan i prezentovan, za razliku od ostalih APC, koje prezentuju antigene prisutne u mikromolarnim koncentracijama (Banchereau i Steinman, 1998).

Tokom procesa sazrevanja, DĆ smanjuju ekspresiju receptora za preuzimanje antigena i samim tim se smanjuje i ova njihova funkcija. Sa druge strane, ono što karakteriše ovaj proces je intenzivna obrada antigena, vezivanje antigenskih peptida sa MHC molekulima I i II klase i povećana ispoljenosti i duži polu-život ovih kompleksa na površini ćelije (Cella i sar., 1997). Povećana i produžena ekspresija antigena u kompleksu sa MHC molekulima, kao i povećana ekspresija kostimulatornih molekula (CD80 i CD86) tokom sazrevanja, su neophodne za efikasnu prezentaciju antigena i aktivaciju CD4+ i CD8+ T limfocita (Sharpe i Freeman, 2002). Osim navedenih promena, tokom sazrevanja DĆ dolazi i do povećavanja ekspresije adhezivnih molekula, promene ekspresije hemokinskih receptora, sekrecije hemokina i citokina, što sve zajedno čini DĆ najefikasnijim APC (Cella i sar., 1997; Sallusto i sar., 1998; Tan i O'Neill, 2005).

Prema ranijim shvatanjima, koja su danas prevaziđena, zrele DĆ su imale isključivo imunogenu ulogu (Dhodapkar i sar., 2001; De Heusch i sar., 2004). Međutim, danas postoje podaci koji pokazuju da zrele DĆ mogu da imaju i tolerogenu funkciju (Cools i sar., 2007), dok je imunogenost osobina koju imaju aktivisane DĆ, te se maturacija i aktivacija posmatraju kao dva odvojena procesa. Maturacija je proces diferencijacije nezrelih u zrele DĆ, dok je aktivacija zavisna od postojanja dodatnih signala, pre svega signala opasnosti (Tan i O'Neill, 2005). Signali opasnosti obuhvataju

endogene signale koje DĆ dobijaju od oštećenih ćelija i tkiva (proinflamatorni citokini, HSP, reaktivni kiseonični intermedijeri i drugi) i egzogene kao što su bakterijski i virusni produkti (lipopolisaharid [LPS], CpG motiv, dvolančana RNK) (Banchereau i sar., 2000; Galluci i Matzinger, 2001). U uslovima infekcije i inflamacije, gorepomenuti faktori, indukuju maturaciju i aktivaciju DĆ, pri čemu nastaju imunogene forme ovih ćelija (Tan i O'Neill, 2005). U odsustvu infekcije i inflamacije, DĆ preuzimaju apoptotične ćelije, čija internalizacija ne dovodi do aktivacije DĆ (Sauter i sar., 2000; Liu i sar., 2002). Apoptotične ćelije predstavljaju važan izvor sopstvenih antigena što je od ključnog značaja za održavanje periferne tolerancije (Steinman i sar., 2000).

Kao što je već prethodno navedeno, DĆ karakteriše jedinstvena sposobnost da aktivira naivne T limfocite. Dva signala neophodna za potpunu aktivaciju i sledstvenu proliferaciju T limfocita ostvaruju se posredstvom nekoliko ligand/receptor parova u okviru specijalizovanog područja kontakta T limfocita i APĆ tj. imunološke sinapse (Banchereau i Steinman, 1998; Lanzavecchia i Sallusto, 2001). Prepoznavanjem specifičnog antigenskog peptida u sklopu MHC molekula posredstvom T ćelijskog receptora (TĆR) na naivnom T limfocitu obezbeđuje se prvi signal, dok se drugi signal ostvaruje interakcijom kostimulatornih molekula na DĆ (pretežno CD80 i CD86) sa CD28 molekulom na T limfocitima (Banchereau i Steinman, 1998, Moser, 2003). Aktivacija naivnih T limfocita se odvija u perifernim limfnim organima (Banchereau i Steinman, 1998; Banchereau i sar., 2000).

1.1.5. Uloga DĆ u polarizaciji imunskog odgovora

Nakon prepoznavanja antigena i aktivacije, pomoćnički CD4⁺ T limfociti (*engl.* T helper, Th) diferenciraju u pravcu efektorskih ćelija koje će obezbediti najefikasniji odgovor protiv specifičnog mikroorganizma (Kapsenberg, 2003; Walsh i Mills, 2013). Danas je opšte prihvaćena podela ovih ćelija na Th1, Th2 i Th17 subpopulacije mada su nedavno opisane, iako još uvek nedovoljno proučene, i subpopulacije Th9, Th22 i folikulske pomoćničke T ćelije (*engl.* follicular Th, Tfh) (Walsh i Mills, 2013).

Uloga DĆ u diferencijaciji Th limfocita i polarizaciji imunskog odgovora ogleda se, pre svega, u obezbeđivanju odgovarajućeg citokinskog okruženja potrebnog za usmeravanje diferencijacije Th ćelija ka određenoj subpopulaciji i ono predstavlja treći signal, pored prepoznavanja antigena i kostimulacije, neophodan za uspešnu aktivaciju

T ćelija (de Jong i sar., 2005). Faktori koji takođe mogu da utiču na diferencijaciju T limfocita su i subpopulacija DĆ i receptori kojima DĆ prepoznaju odgovarajući mikroorganizam, vrsta mikroorganizma, doza antigena, afinitet kojim TĆR prepoznaje prezentovani antigen i drugo (Kapsenberg, 2000; Yamane i Paul, 2013; Walsh i Mills, 2013).

Imunski odgovor posredovan Th1 ćelijama je efikasan u odbrani od intracelularnih mikroorganizama (bakterija, virusa, protozoa) (Romagnani, 1999). Th1 ćelije sekretuju IFN- γ , ali i interleukin (*engl.* interleukin, IL)-2, IL-3 i TNF- α (Gutcher i Becher, 2007) i one, posredstvom ovih citokina deluju na makrofage, CD8+ T limfocite, B limfocite, urođenoubulačke (*engl.* natural killer, NK) ćelije (Kapsenberg, 2000; Walsh i Mills, 2013). Diferencijacija CD4+ T ćelija u Th1 subpopulaciju stimulisana je kombinacijom citokina IL-12p70 (heterodimerni molekul koji se sastoji od p40 i p35 podjedinice), koga proizvode aktivisane/zrele DĆ i makrofage (Macatonia i sar., 1995; Trinchieri, 2003; Hamza i sar., 2010) i IFN- γ koji sekretuju NK ćelije. Osim IL-12 i IFN- γ , polarizaciju imunskog odgovora u pravcu Th1 ćelija usmeravaju i IL-18 i IL-27 (Chang i sar., 2000; Pflanz i sar., 2002). Prepoznavanje antigena visokim afinitetom od strane CD4+ limfocita se takođe smatra važnim faktorom indukcije Th1 imunskog odgovora (Yamane i Paul, 2013).

Th2 ćelije imaju centralnu ulogu u odbrani organizma od ekstracelularnih parazita iz grupe helminata (Romagnani, 1999; Allen i Maizels, 2011). Ove ćelije proizvode IL-4, IL-5 i IL-13, kojima stimulišu produkciju IgE, utiču na alternativnu aktivaciju makrofaga i aktivaciju eozinofila, utiču na funkciju nekih ne-hematopoetskih ćelija itd. (Allen i Maizels, 2011; Chen i sar., 2012). Ovaj tip imunskog odgovora je dominantan i u alergijskim reakcijama (Deo i sar., 2010). Uloga DĆ u nastanku Th2 ćelija nije sasvim jasna, jer DĆ ne proizvode IL-4 koji je glavni citokin neophodan za razvoj Th2 limfocita. Smatra se da, nezavisno od produkcije IL-4, prepoznavanje antigena niskim afinitetom od strane TĆR-a, usmerava imunski odgovor u pravcu Th2 subpopulacije (Yamane i Paul, 2013; Walsh i Mills, 2013).

Th17 ćelije proizvode IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, faktor stimulacije kolonije granulocita i monocita (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i TNF- α , koji učestvuju u privlačenju leukocita, uglavnom neutrofila, ali i

monocita, na mesto prepoznavanja antigena. Smatra se da su ove ćelije važne u odbrani od ekstracelularnih bakterija i gljivica, ali mogu da doprinesu i nastanku mnogih autoimunskih bolesti (Mills, 2008; Martinez i sar., 2008). Diferencijacija naivnih CD4+ T ćelija u pravcu Th17 ćelija i njihova ekspanzija uključuje prisustvo brojnih citokina i drugih faktora u okruženju ovih ćelija i čini se kompleksijom nego polarizacija u pravcu Th1 i Th2 ćelija (Walsh i Mills, 2013). Za razvoj i održavanje Th17 ćelija potrebni su inflamatorni citokini kao što su IL-6 i IL-1 β , koje proizvode makrofagi i DĆ, IL-23 koji je sličan IL-12, jer pored p19 subjedinice u njegov sastav ulazi i p40 subjedinica, inače sastavni deo i IL-12 molekula, a i proizvode ga iste ćelije i faktor transformacije rasta (*engl.* transforming growth factor, TGF)- β (Lankford i Frucht, 2003; Bettelli i sar., 2006; Veldhoen i sar., 2006).

1.1.6. Uloga DĆ u imunološkoj toleranciji

Pored već opisanih uloga koje DĆ imaju u započinjanju i usmeravanju primarnog imunskog odgovora, ništa manje nije značajna ni njihova uloga u indukciji tolerancije (Steinman i sar., 2003). Imunološka tolerancija se definiše kao nereaktivnost na antigen kome je osoba izložena, a autotolerancija, odnosno, nereaktivnost na sopstvene antigene, jedna je od glavnih karakteristika stečenog imuniteta (Matzinger, 1994).

Imunološka tolerancija koja se odvija u centralnim (primarnim) limfnim organima, timusu i kostnoj srži, u toku sazrevanja limfocita, naziva se centralnom tolerancijom. Dendritske ćelije imaju ulogu u negativnoj selekciji timocita, koja podrazumeva fizičku eliminaciju tj. klonsku deleciju (apoptozu) ili funkcionalnu inaktivaciju (anergiju) limfocita koji ispolje visokoafinitetni receptor za kompleks sopstveni peptid/sopstveni MHC molekul na DĆ (Brockner i sar., 1997).

Autoreaktivni limfociti ipak mogu izbeći proces negativne selekcije i napustiti centralne limfne organe, što dalje iziskuje potrebu za postojanjem mehanizama periferne tolerancije, kojima se sprečava njihova aktivacija na periferiji, ali i aktivacija limfocita na strane nepatogene antigene iz spoljašnje sredine kojima je organizam stalno izložen. Mehanizmima periferne tolerancije sprečava se aktivacija zrelih T limfocita i razvoj imunskog odgovora i oni obuhvataju: deleciju T limfocita (apoptozu),

funkcionalnu inaktivaciju (anergiju) i aktivnu supresiju od strane T reg (Steinman i sar., 2003; Smits i sar., 2005; Rutella i sar., 2006; Chung i sar., 2013).

Sposobnost DC da indukuju perifernu toleranciju je najpre pokazana kod nezrelih DC u perifernim limfnim organima (Steinman i sar., 2003). U fiziološkim uslovima nezrele DC u perifernim tkivima fagocituju sopstvene apoptotične ćelije i migriraju u periferne limfne organe gde prezentuju antigene u odsustvu kostimulatornih molekula i proinflamatornih citokina, što indukuje anergiju antigen specifičnih T limfocita (Steinman i sar., 2003; Cools i sar., 2007). Osim anergije, nezrele DC mogu da indukuju i deleciju T limfocita, kao i nastanak različitih tipova T reg ćelija (Heath i sar., 2001; Rutella i sar., 2006).

Lutz i Schuler opisuju i „delimično“ zrele DC, kao DC sa tolerogenom funkcijom. Smatra se da „delimično“ zrele DC nastaju dejstvom TNF- α na nezrele DC u odsustvu mikroorganizma. „Delimično“ zrele DC ispoljavaju visoke nivoe MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula, ali ne sekretuju ili vrlo malo sekretuju proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6, TNF- α i IL-12, dok neke mogu čak da produkuju i IL-10. Ove ćelije nemaju sposobnost da stimulišu diferencijaciju CD4+ T limfocita u različite subpopulacije efektorskih ćelija i kao i nezrele, indukuju razvoj T reg limfocita. U prisustvu mikroorganizma ili nakon aktivacije posredstvom CD40 molekula, ove ćelije sazrevaju u snažne imunogene DC koje indukuju Th1 imunski odgovor (Lutz i Schuler, 2002).

Kako je već ranije pomenuto i zrele DC mogu imati tolerogenu funkciju (Smits i sar., 2005; Cools i sar., 2007). Pokazano je, na primer, da u odsustvu infekcije, DC sluzokoža, koje su važne za uspostavljanje tolerancije na neškodljive antigene iz spoljašnje sredine, imaju fenotip zrelih DC (Smits i sar., 2005). Takođe, nekoliko studija je pokazalo da zrele DC imaju značajnu ulogu u restimulaciji/ekspanziji T reg limfocita (Yamazaki i sar., 2003; Tarbell i sar., 2005; Brinster i sar., 2005). Isto tako, izlaganje DC nekim patogenima (*Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertusis*), takođe može da indukuje nastanak zrelih DC sa tolerogenom funkcijom (van der Kleij i sar., 2002; McGuirk i sar., 2002).

Tolerogenu funkciju imaju i DĆ koje su opisali Munn i saradnici, a koje ispoljavaju enzim indoleamin 2,3-dioksigenazu (IDO). IDO učestvuje u katabolizmu triptofana, aminokiseline neophodne za proliferaciju T ćelija, te se mehanizam kojim ove ćelije vrše supresiju imunskog odgovora ogleda upravo u inhibiciji proliferacije T limfocita (Munn i sar., 2002; Moser, 2003).

1.1.7. Uloga DĆ u nastanku autoimunskih bolesti

S obzirom na važnu ulogu koju DĆ imaju u uspostavljanju tolerancije, pretpostavlja se da bi poremećaj njihove funkcije mogao imati značajno mesto u patogenezi autoimunskih bolesti. Dokazi koji to potvrđuju su dobijeni u studijama izvedenim na animalnim eksperimentalnim modelima i onima koje su uključivale obolele od autoimunskih bolesti.

Kod bolesnika sa multiplom sklerozom (MS), u lezijama mozga i kičmene moždine, cerebrospinalnoj tečnosti i cirkulaciji, pronađen je povećan broj i kDC i pDC, i one su imale promenjen fenotip (povećana ekspresija kostimulatornih molekula i hemokinskih receptora) i funkciju (veća sekrecija citokina) u poređenju sa DĆ zdravih kontrola (Pashenkov i sar., 2001; Lopez i sar., 2006; Lande i sar., 2008;). Interesantan je i podatak da su ove promene kDC bile različite kod različitih formi MS (Lopez i sar., 2006; Karni i sar., 2006; Nuyts i sar., 2013). Pored MS-a, izmenjen broj, fenotip i funkcija DĆ pokazana je i kod insulin-zavisnog dijabetesa tipa 1 (Salomon i sar., 2000; Steptoe i sar., 2002; Liu i Beller, 2002), sistemskog eritemskog lupusa (Blanco i sar., 2001), reumatoidnog artritisa (Thomas i sar., 1999), Sjögrenovog sindroma (van Blokland i sar., 2000) i Gravesove bolesti (Molne i sar., 1994).

Smatra se da do pokretanja autoimunskog procesa dovode neadekvatni citokinski signali, odnosno izmenjen citokinski milje u hroničnim infekcijama, koji usmerava diferencijaciju DĆ u potencijalno opasne, imunogene forme DĆ koje bi mogle da imaju izmenjen put migracije, produkciju citokina i preradu antigena. Promena u preradi antigena bi mogla dovesti do prezentovanja sopstvenih, do tad „skrivenih“ determinanti i/ili determinanti porekla sopstvenih apoptotičnih ćelija (Drakesmith i sar., 2000).

Na nastanak ovakvih, imunogenih formi DĆ koje prezentuju sopstvene antigene autoreaktivnim limfocitima, utiču, pored infektivnih agenasa i takozvani signali opasnosti poreklom nekrotičnih ćelija (DAMP), ali i endogeni molekuli nastali kao posledica stresa. Ovi poslednji se u literaturi opisuju kao homeostatski signali opasnosti i potiču od narušene homeostaze tkiva i ćelija. Kao primeri ovih signala navode se: lokalna acidoza, promene osmolarnosti, hipoksija, oksidativni stres i drugi metabolički poremećaji (Gallo i Gallucci, 2013). Osim toga, mutacije gena, koji su važni za funkciju DĆ, dovode do disfunkcije ovih ćelija i pokretanja autoimunosti (Drakesmith i sar., 2000).

Kao rezultat svih ovih procesa nastaju DĆ koje mogu da aktivišu autoreaktivne T limfocite, da utiču na poremećaj balansa Th1/Th2/Th17 imunskog odgovora ili da onemoguće stvaranje T reg, što sve može da dovede do razvoja autoimunskog procesa (Drakesmith i sar., 2000).

1.1.8. Dendritske ćelije pacova

1.1.8.1. Identifikacija, lokalizacija i subpopulacije

U poređenju sa podacima u literaturi koji se odnose na mišije DĆ, podataka o ovim ćelijama kod pacova je neuporedivo manje, iako su ispitivanja DĆ pacova započela ubrzo nakon identifikacije ovih ćelija kod miševa (Klinkert i sar., 1980). Razlog za to su nedostatak odgovarajućih monoklonskih antitela (mAt) i transgenih životinja (Turnbull i MacPherson, 2001). Sa druge strane, na pacovima su rađene studije koje se odnose na procese migracije DĆ i koje su dale dragocene rezultate, a koje nije bilo moguće vršiti na miševima ni ljudima (Turnbull i MacPherson, 2001).

Do danas ni kod jedne vrste nije nađen marker karakterističan samo za DĆ, kojim bi bilo moguće identifikovati sve DĆ. Identifikacija i razdvajanje humanih i mišijih DĆ se vrši na osnovu prisustva MHC molekula II klase i CD11c molekula na ovim ćelijama. Kod pacova, iako i njihove DĆ ispoljavaju MHC molekule II klase i CD11c molekule, identifikacija i razdvajanje DĆ se vrši korišćenjem anti-OX62 mAt. Naime, DĆ koje ovo mAt prepoznaje ispoljavaju CD103 molekul (subjedinica α_{E2} integrina) i definišu se kao OX62+ DĆ (u daljem tekstu kDC), dok se one koje ne

ispoljavaju CD103 molekul definišu kao OX62- DC odnosno pDC. (Brenan i Puklavec, 1992; Turnbull i MacPherson, 2001; Voisine i sar., 2002; Brissette-Storkus i sar., 2002).

Imunohistohemijskom analizom je ispitivana distribucija CD103 (OX62) molekula u limfnim (timus, slezina, cervikalni limfni čvorovi, Pejerove ploče) i ne-limfnim organima (lamina propria tankog creva, intersticijum pluća, glomeruli bubrega, portne trijade jetre, Langerhansova ostrvca pankreasa i epitel horoidnog pleksusa) pacova, i pokazano je da je ona bila u korelaciji sa distribucijom DC. Takođe, nije bilo razlika u distribuciji ovog antigena kod različitih sojeva pacova kao što su PVG (*engl.* Piebald Virol Glaxo), AO (*engl.* Albino Oxford), DA (*engl.* Dark Agouti) i Lewis (Brenan i Puklavec, 1992). Tačna funkcija ovog molekula nije poznata. Utvrđeno je da je značajan za ćelijsku adheziju i da nema ulogu u aktivaciji T ćelija (Brenan i Puklavec, 1992; Brissette-Storkus i sar., 2002). Ovaj molekul, koji se danas koristi za identifikaciju i izdvajanje DC pacova, ipak se ne nalazi na svim DC i podaci o njegovoj zastupljenosti se razlikuju. De la Mata i saradnici (de la Mata i sar., 2001) su pokazali da OX62+ ćelije čine 41% - 59% ukupnih DC slezine, dok su Trinité i saradnici (Trinité i sar., 2000) utvrdili da 80% DC slezine, 70% DC timusa i 55% DC limfnog čvora ispoljava integrin koji prepoznaje anti-OX62 mAb. Dendritske ćelije epitela creva, kao i Langerhansove ćelije u epidermisu, ne ispoljavaju ovaj molekul (Brenan i Puklavec, 1992; Brissette-Storkus i sar., 2002). OX62 molekul je ispoljen i na $\gamma\delta$ T limfocitina u epitelu tankog creva i epidermisu kože (Brenan i Puklavec, 1992).

Kao što je prethodno navedeno, mišje (Anjuère i sar., 1999; Vremec i sar., 2000; Duriancik i sar., 2009) i humane (MacDonald i sar., 2002; Velásquez-Lopera i sar., 2008; Proietto i sar., 2012) DC odlikuje velika heterogenost. U skladu sa tim su i kod pacova, pored pDC, do danas opisane najmanje dve subpopulacije kDC, koje se mogu razlikovati na osnovu ispoljenosti CD4 molekula (Liu i sar., 1998). Autori su, koristeći model koji je omogućio sakupljanje limfe iz pseudo-aferentnih limfnih sudova, a koja je drenirana iz područja koje se normalno drenira u mezenterijalne limfne čvorove, u limfi pacova detektovali CD4+ i CD4- kDC (Liu i sar., 1998; Yrlid i MacPherson, 2003). Ove subpopulacije kDC su nađene i u slezini i o njihovim morfološkim, fenotipskim i funkcijskim karakteristikama postoje literaturni podaci (Trinité i sar., 2000; Voisine i sar., 2002; Hubert i sar., 2006). Subpopulacija CD4- kDC je relativno homogena, ćelije su veće od CD4+ kDC, mijeloidne morfologije, sa velikim, nepravilnim jedrom i

(velikom) obilnom citoplazmom sa inkluzijama. Za razliku od njih, subpopulacija CD4⁺ DĆ je heterogenija i većina ćelija ima malo, pravilno jedro sa malo citoplazme i bez inkuluzija (Trinité i sar., 2000; Voisine i sar., 2002).

Analizom lokalizacije subpopulacija DĆ u slezini pokazano je da CD4⁺ kDC okružuju T-zavisnu zonu bele pulpe, dok su CD4⁻ kDC nađene i u crvenoj pulpi i u T-zavisnim zonama bele pulpe (Turnbull i MacPherson, 2001). Nakon intravenskog davanja LPS-a, u T-zavisnim zonama slezine dolazi do povećanja broja DĆ, jer u ovu zonu dolaze CD4⁻ kDC iz crvene pulpe, kao i CD4⁺ kDC koje su okruživale T-zavisnu zonu (Turnbull i MacPherson, 2001).

1.1.8.2. Fenotipske karakteristike

Fenotipski, obe subpopulacije kDC ispoljavaju CD11b, CD11c, MHC II i CD161a molekule, dok CD4⁻ kDC, za razliku od CD4⁺ kDC ne ispoljavaju CD90, CD5 i SIRP- α (*engl.* signal inhibitory regulatory protein; OX41) (Trinité i sar., 2000; Voisine i sar., 2002).

Prema Voisine i saradnicima, nijedna od subpopulacija sveže izolovanih kDC ne ispoljava CD86 i CD40 kostimulatorne molekule, dok je CD80 molekul više eksprimiran na CD4⁺ kDC nego na CD4⁻ kDC (Voisine i sar., 2002). Iako su CD4⁺ i CD4⁻ kDC najzastupljenije subpopulacije, u slezini u okviru CD4⁻ kDC postoji mala subpopulacija (<5%) koja, za razliku od prethodno navednih, ispoljava niske nivoe kostimulatornih molekula (CD86 i CD40) (Trinité i sar., 2000). Podaci koji se odnose na ispoljenost CD8 α molekula na pacovskim DĆ, a na osnovu čijeg prisustva je izvršena podela mišjih DĆ na subpopulacije, su oprečni, jer je u jednoj studiji pokazano prisustvo (de la Mata i sar., 2001), a u drugoj odsustvo (Trinité i sar., 2000; Voisine i sar., 2002) ovog molekula na DĆ slezine pacova Takođe, pokazano je da CD4⁻ kDC, za razliku od CD4⁺ kDC, ispoljavaju visoke nivoe CD200 (OX2) molekula koji bi mogao biti jedan od markera za razdvajanje ove dve subpopulacije DĆ (Voisine i sar., 2002).

Imajući u vidu značaj TLR u prepoznavanju različitih mikroorganizama, kao i u sledstvenoj aktivaciji DĆ i započinjanju stečenog imunskog odgovora, na DĆ pacova je ispitivana ekspresija različitih TLR (Hubert i sar., 2006). Za razliku od pDC, koje karakteriše visoka ekspresija iRNK za TLR7 i 9 i srednja/niska ekspresija iRNK za

ostale TLR, kDĆ ispoljavaju širi repertoar TLR. Subpopulacija CD4⁻ kDĆ ispoljava visoke nivoe iRNK za TLR1, 2, 3 i 10 i umerene nivoe iRNK za TLR4, 5, 6, 7 i 9, dok CD4⁺ kDĆ subpopulacija ispoljava sve TLR (TLR1-10), od kojih su visoko ekspimirani TLR1, 2, 3 i 7 (Hubert i sar., 2006). Ekspresija TLR nije bila sojno-zavisna i sličan obrazac ekspresije ovih receptora na DĆ je pokazan kod pacova SPD (*engl.* Sprague Dawley), Lewis i BN (*engl.* Brown Norway) soja (Hubert i sar., 2006).

1.1.8.3. Funkcijske karakteristike

Sveže izolovane CD4⁻ kDĆ imaju nezreo fenotip i slabo indukuju proliferativni odgovor alogenih CD4⁺ T limfocita. Takođe, ove ćelije nakon stimulacije sekretuju velike količine IL-12 i TNF- α i usmeravaju imunski odgovor u pravcu Th1 ćelija (Voisine i sar., 2002), a mogu da ispolje i citotoksičnu aktivnost, nalik NK ćelijama, (Josien i sar., 1997; Trinité i sar., 2000), kakvu nemaju DĆ iz limfnih čvorova i timusa (Josien i sar., 1997; Trinité i sar., 2000). Za razliku od CD4⁻, CD4⁺ kDĆ proizvode male količine IL-12 i snažno indukuju proliferaciju alogenih CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, kao i diferencijaciju ka Th1, Th2 i citotoksičnim T limfocitima (*engl.* cytotoxic T cells, CTL) (Voisine i sar., 2002).

1.2. STARENJE IMUNSKOG SISTEMA

Interesovanje istraživača za promene kojima podleže imunski sistem tokom starenja organizma je u porastu. Razlog za ovo jesu demografski podaci koji ukazuju na produženje ljudskog života i povećanje broja starih ljudi, kao i shvatanje da je pravilno funkcionisanje imunskog sistema jedan od ključnih faktora koji određuje dužinu životnog veka (Aspinall i Goronzy, 2010). Ispitivanja uticaja starenja na imunski sistem nisu bila od velikog interesa u vreme kada je prosečan životni vek čoveka iznosio oko 40 godina. Međutim, napredak medicine i bolji socio-ekonomski uslovi uticali su na produženje životnog veka, i do preko 80 godina, i doveli do prilagođavanja svih sistema u organizmu, pa i imunskog, ovoj promeni (Aw i sar., 2007; Aspinall i Goronzy, 2010).

Kada je u pitanju zastupljenost stare populacije, a kod ljudi se početkom starosti smatra 65. godina života, prema nekim predviđanjima, do 2030. godine više od 25% svetskog stanovništva će biti staro, a taj procenat je već dostignut u Evropi i Japanu

(Aw i sar., 2007). Ovakve demografske promene nose sa sobom i povećanu učestalost oboljenja koja pogađaju stare osobe.

Promene kojima podleže imunski sistem tokom starenja označavaju se terminom „*immunosenescence*“. Jedna od sveobuhvatnijih definicija te promene opisuje kao poremećaj imunskog sistema koji nastaje zbog smanjenja regenerativne sposobnosti ćelija, promene potencijala diferencijacije ćelijskih prekursora, nemogućnosti homeostatskih kontrolnih mehanizama da odgovore na ponavljane podsticaje i „grešaka“ koje se dešavaju na nivou ćelije (Aspinall i Goronzy, 2010).

Starenje imunskog sistema ne podrazumeva obavezno progresivno smanjenje njegove funkcije i kompetentnosti, već bi te promene trebalo posmatrati kao rezultat složenog i kontinuiranog procesa remodelovanja, gde dolazi do progresivnog gubitka nekih funkcija, dok su druge nepromenjene ili čak pojačane (Burkle i sar., 2007). Ovakve promene kod starih osoba dovode, direktno ili indirektno, do povećanja predispozicije za razvoj infektivnih i inflamatornih bolesti i malignih bolesti, ali i paradoksalno, do povećanja učestalosti autoreaktivnih patoloških stanja (Grolleau-Julius, 2010).

Podaci dobijeni iz studija sprovedenih na stogodišnjacima i iz longitudinalnih studija čiji su ispitanici bili stariji od 80 godina (OCTO studije) (Olsson i sar., 2000; Franceschi i sar., 2007), pokazuju da izloženost organizma infektivnim agensima tokom života ima veliki uticaj na promene imunskog sistema tokom starenja (Pawelec i sar., 2005; Larbi i sar., 2008). Osim hronične izloženosti antigenu, drugi važan faktor koji ima uticaj na starenje i patogenezu bolesti vezanih za starenje je i stanje koje se označava terminom „*inflamm-aging*“, a predstavlja subklinički hronični inflamatorni proces kod starih (Franceschi i sar., 2000). Naime, u serumu starih osoba, kao i u serumu starih miševa i pacova, izmerene su nekoliko puta veće vrednosti proinflamatornih citokina i proteina akutne faze, nego kod mladih (Brüünsgaard i Pedersen, 2003; Gómez i sar., 2006; Vasto i sar., 2007; Wong i Magnusson, 2013). Još uvek nije poznato koje ćelije su odgovorne za sekreciju proinflamatornih citokina i drugih proinflamatornih medijatora koji doprinose stanju hronične inflamacije (Swain i Nikolich-Zugich, 2009). Kao najverovatniji izvori se navode aktivisani makrofagi i T limfociti (Larbi i sar., 2008; Shaw i sar., 2010), mada se ne isključuju ni uloga

fibroblasta, adipocita, endotelnih ćelija, mišićnih ćelija, stromalnih ćelija (Swain i Nikolich-Zugich, 2009; Maggio i sar., 2006; Panda i sar., 2010) i DC (Panda i sar., 2010).

Pretpostavlja se da je genetska predispozicija ka povećanoj sekreciji proinflamatornih citokina, sa jedne strane, i smanjenom antiinflamatornom odgovoru na tu sekreciju, sa druge strane, u osnovi inflamatornih patoloških stanja u starijem životnom dobu. Za razliku od starih osoba sa „proinflamatornim“ fenotipom, koji se povezuje sa povećanim morbiditetom i mortalitetom, pokazano je da dugovečne osobe (stogodišnjaci) poseduju genske varijante koje im omogućavaju da optimizuju balans između pro- i antiinflamatornih citokina i drugih medijatora inflamacije (Franceschi i sar., 2007; Larbi i sar., 2008). Njihov imunski sistem uspeva da prevaziđe štetan efekat proinflamatornih citokina produkcijom antiinflamatornih, kao što su IL-10 i TGF- β , ali i da očuva sposobnost efikasnog reagovanja na infektivne agense (Vasto i sar., 2007; Forsey i sar., 2003).

Istraživanja na polju biologije starenja imunskog sistema su pokazala da starenje dovodi do promena svih komponenti imunskog sistema i to, kako ćelija, počev od nediferencirane matične ćelije u kostnoj srži, pa do diferencirane zrele ćelije, tako i tkiva koja formiraju specifičnu mikrosredinu koja indirektno može da utiče na funkciju ćelija koje se u njoj nalaze.

1.2.1. Promene na molekulskom nivou

Najupečatljivija karakteristika starenja ćelija je skraćivanje telomera (Goronzy i sar., 2006). Telomere su kratki nizovi ponovljenih nukleotida na krajevima hromozoma, koje su značajne za očuvanje integriteta hromozoma, tako da se njihovo skraćivanje može dovesti u vezu sa promenjenim funkcijama ćelija u starosti (Hornsby, 2007). Kod starih organizama je nađeno da epigenetske promene, kao što su hipo- ili hipermetilacije DNK i modifikacije histona (Bàrtovà i sar., 2008; Grolleau-Julius, 2010; Montoya-Ortiz, 2013), kao i promene u ekspresiji mikro RNK (Liu i sar., 2012; Noren Hooten i sar., 2013), mogu uticati na gensku ekspresiju i samim tim i na modulaciju ćelijske funkcije. U daljem tekstu su navedene još neke promene na molekulskom nivou koje se povezuju sa starenjem organizma.

1.2.2. Promene na ćelijskom nivou i nivou populacija ćelija

1.2.2.1. *Limfo-hematopoetski odeljak u kostnoj srži*

Sposobnost diferencijacije u pravcu mijeloidne ili limfoidne loze krvnih ćelija, ali i u pravcu ne-hematogenih ćelija, kao i sposobnost samoobnavljanja su važne osobine pluripotentne matične ćelije, koja se nalazi u kostnoj srži i od koje nastaju sve ćelije koje čine imunski sistem. Tako da generalno gledano, uticaj starenja na ove ćelije bi mogao da se odrazi na funkciju imunskog sistema uopšte. Kada je u pitanju promena broja ovih ćelija uslovljena starenjem, de Haan i sar. su pokazali da kod dugoživećih miševa C57B1/6 soja dolazi do povećanja, a kod kratkoživećeg DBA/2 do smanjenja broja matičnih ćelija u kostnoj srži i time istakli značaj genetskih faktora u regulaciji broja ovih ćelija (de Haan i sar., 1997; de Haan i sar., 1999). Nekoliko studija je pokazalo da „stare“ matične ćelija imaju smanjenu sposobnost naseljavanja kostne srži i adherencije za stomalne ćelije kostne srži (Harrison i sar., 1989; Chen i sar., 2000; Xing i sar., 2006; Chambers i sar., 2007). Studije su pokazale da i kod humanih CD34+ matičnih ćelija, kao i kod mišijih, sa starenjem dolazi do smanjenja broja i funkcije (Gale i sar., 1997; Kollman i sar., 2001). Takođe, pokazana je i povećana sposobnost „starih“ matičnih ćelija da diferenciraju u pravcu mijeloidne, a smanjena u pravcu limfoidne loze (Min i sar., 2006; Aw i sar., 2007; Geiger i sar., 2009), dok je proliferativni kapacitet mijeloidnih i limfoidnih progenitorskih ćelija bio manji kod starih jedinki (Min i sar., 2006; Geiger i sar., 2009)

Uticaj starenja na ćelije kostne srži može biti posledica intrizičnih i ekstrizičnih faktora. Kao najčešći intrizični faktori navode se disfunkcija telomera (Rudolph i sar., 1999; Dolle i sar., 2006; Rossi i sar., 2007), nemogućnost popravke oštećenja DNK van telomera (Rossi i sar., 2007) i povećana ekspresija gena p16^{ink4a} (regulator ćelijskog ciklusa i tumor supresorski gen) (Molofsky i sar., 2006; Krishnamurthy i sar., 2006). Od spoljašnjih faktora, najveći značaj se pridaje promeni mikrosredine u kostnoj srži, jer sa starošću se odeljak hematopoeze smanjuje i zamenjuje masnim tkivom (Gruver i sar., 2007).

1.2.2.2. *Ćelije stečenog imuniteta*

Od svih ćelija imunskog sistema, kada je u pitanju proces starenja, najviše su proučavani **T limfociti**. Tome je doprinela važna efektorska i regulatorna uloga koju

ove ćelije imaju u imunskom odgovoru, ali i involucija timusa, fenomen koji se povezuje sa starenjem organizma (Salam i sar., 2013). Sa involucijom timusa, smanjuje se produkcija naivnih T limfocita i njihov izlazak iz timusa, što dalje remeti odnos novopridošlih naivnih T limfocita, „starijih“ naivnih T limfocita i memorijskih T limfocita u okviru pula ukupnih T limfocita. Ovaj odnos se kod starih menja u korist memorijskih T limfocita, koje karakteriše oligoklonska ekspanzija, što sa druge strane, dovodi do smanjenja raznolikosti repertoara T limfocita (smanjenje počinje u šestoj deceniji života ljudi) i što se odražava na imunitet (Nikolich-Zugich, 2005; Salam i sar., 2013).

Takođe, nađene su i promene na celularnom i subcelularnom nivou. Neke od njih su: smanjena sposobnost T limfocita da odgovore na stimulus antigenom, defekt u prenosu signala posredstvom TCR, podložnost oštećenjima DNK nakon aktivacije ili radijacije, smanjena ekspresija koreceptora, smanjena sekrecija IL-2 i proliferacija nakon stimulacije od strane APC, smanjena ekspresija aktivacionih markera i markera diferencijacije (Haynes i sar., 1999; Nikolich-Zugich, 2005).

Humoralni imunitet kod starih osoba je takođe kompromitovan, a promene se dešavaju na više nivoa, počev od progenitorske ćelije pa sve do zrelih **B limfocita**, što rezultira kvantitativnim (smanjena produkcija antitela) i kvalitativnim (predominantna produkcija antitela niskog afiniteta) promenama u odgovoru B limfocita (Frasca i sar., 2005; Frasca i Blomberg, 2011). Pul B limfocita se smanjuje tokom starenja i veruje se da do toga dolazi usled smanjene proizvodnje ćelija u kostnoj srži, pa i ćelija usmerenih ka B limfocitnoj lozi. Takođe, enzim aktivacijom indukovana citidin deaminaza (*engl.* activation-induced cytidine deaminase, AID), koji reguliše promenu klase antitela, kao i transkripcioni faktor E47, koji reguliše njegovu ekspresiju, su nishodno regulisani kod starih ćelija (Frasca i sar., 2004). Promene u funkciji B limfocita starih jedinki su jednim delom posledica i disfunkcije T limfocita (Salam i sar., 2013).

1.2.2.3. Ćelije urođenog imuniteta

Stanovište, da komponente urođenog imuniteta tokom starenja ne podležu promenama, već se to dešava primarno u okviru odeljka stečenog imuniteta (Pawelec i sar., 2002) nije više aktuelno i rezultati brojnih istraživanja koja su vršena poslednje

decenije su pokazala upravo suprotno (Panda i sar., 2009; Shaw i sar., 2010; Solana i sar., 2012).

Neutrofili su fagocitne ćelije i prve koje dolaze na mesto infekcije ili oštećenja tkiva (Kumar i Sharma, 2010). Većina studija pokazuje da se broj ovih ćelija tokom starenja ne menja (Fulop i sar., 1985; Chatta i Dale, 1996) i da je očuvana sposobnost adherencije za endotelne ćelije, ekstravazacije i migracije na mesto infekcije (Biasi i sar., 1996; Butcher i sar., 2001). Međutim, neke funkcije ovih ćelija se menjaju sa starenjem. Istraživanja rađena uglavnom na neutrofilima starih osoba su pokazala da ove ćelije imaju smanjenu sposobnost hemotakse i intracelularnog ubijanja posredovanog slobodnim radikalima (Butcher i sar., 2001; Peters i sar., 2009). Pokazana je i smanjena sposobnost fagocitoze opsonizovanih bakterija, kao što su *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, zbog smanjene površinske ekspresije Fc γ receptora (CD16) (Butcher i sar., 2001) i sposobnost da odgovore na faktore preživljavanja, kao što je GM-CSF (Fortin i sar., 2007). U osnovi ovih promena je poremećaj u prenosu signala, koji je posledica promenjene strukture i funkcije lipidnih „raftova“, koji su sastavni delovi ćelijske membrane (Alvarez i sar., 2001).

Monociti i makrofagi su važan deo urođenog imuniteta i imaju ulogu kako u odbrani od mikroorganizama (virusi, bakterije, maligno transformisane ćelije), tako i u povezivanju urođenog i stečenog imuniteta (Geissmann i sar., 2010; Cros i sar., 2010). Monociti se nalaze u krvi i slezini, a tokom inflamacije, diferenciraju u tkivne makrofage i u inflamatorne DĆ (Shortman i Naik, 2007; Auffray i sar., 2009). Podaci koji se odnose na promenu broja monocita tokom starenja su oprečni (Plowden i sar., 2004; Della Bella i sar., 2007). Nyugen i saradnici (Nyugen i sar., 2010) su pokazali da starenje utiče na promenu zastupljenosti subpopulacija monocita i njihovu funkciju kod ljudi. Ispitivanja makrofaga, uglavnom porekla glodara, su pokazala da kod ovih ćelija sa starenjem dolazi do poremećaja funkcije (Shaw i sar., 2010; Solana i sar., 2012). Tokom starenja se smanjuje sposobnost ovih ćelija da vrše fagocitozu, da proizvode slobodne radikale i da prezentuju antigene (Gomez i sar., 2008; Solana i sar., 2012). Takođe, nađena je i izmenjena ekspresija i funkcija TLR (Renshaw i sar., 2002; van Duin i Shaw, 2007; Agrawal i sar., 2010). Interesantan je i podatak da humani nestimulisani makrofagi starih osoba u *in vitro* uslovima pokazuju pro-inflamatorni

citokinski profil, dok je nakon stimulacije LPS-om produkcija citokina manja u poređenju sa nestimulisanim ćelijama (Franceschi i sar., 2007; Solana i sar., 2012).

NK ćelije su citotoksične ćelije i imaju ulogu u ranoj odbrani od intracelularnih mikroorganizama, pre svega virusa, i tumorskih ćelija (Parham, 2006). Pokazano je da starenje povećava i procenat i apsolutni broj ovih ćelija, ali i da dolazi do redistribucije subpopulacija ovih ćelija (Borrego i sar., 1999; Chidrawar i sar., 2006; Le Garff-Tavernier i sar., 2010). Naime, udeo nezrelih NK ćelija, koje proizvode imunoregulatorne citokine (CD56^{bright}) se smanjuje, dok se broj zrelih NK ćelija sa većom citotoksičnom sposobnošću (CD56^{dim}) povećava (Tarazona i sar., 2000; Chidrawar i sar., 2006). Citotoksičnost NK ćelija kod starih osoba, gledano po pojedinačnoj ćeliji, je smanjena (zbog smanjenja ispoljenost aktivacionih receptora NKp30 i NKp46 i povećanja ispoljenosti inhibitornih receptora) (Chidrawar i sar., 2006; Le Garff-Tavernier i sar., 2010; Almeida-Oliveira i sar., 2011; Solana i sar., 2012), dok je ukupna citotoksičnost ovih ćelija očuvana zahvaljujući promenama u odnosu subpopulacija (Panda i sar., 2009). Nađena je i smanjena produkcija IFN- γ i hemokina (MIP-1 α , IL-8, RANTES) pod uticajem IL-2 (Krishnaraj i Bhooma, 1996; Mariani i sar., 2002). Smanjena produkcija citokina i hemokina, koja se ne može kompenzovati, poput citotoksične funkcije, može da kompromituje razvoj stečenog imuniteta kod starih (Panda i sar., 2009). Poznato je i da NK ćelije "komuniciraju" sa DĆ, bilo posredstvom NKp30 receptora na NK ćelijama i nepoznatog liganda na DĆ, bilo preko solubilnih faktora (IFN- γ , TNF- α). S tim u vezi, prethodno navedene promene kojima podležu NK ćelije tokom starenja mogu dovesti, direktno ili indirektno, do poremećaja u razvoju stečenog imunskog odgovora u virusnim infekcijama i protiv tumorskih ćelija (Solana i sar., 2012).

1.2.2.3.1. Dendritske ćelije

U literaturi se mogu pronaći podaci koji se odnose na uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike DĆ čoveka, primata i miša. Ti podaci su često kontradiktorni i teško ih je porediti jer su: 1) analizovane ćelije različitog porekla (slezina, periferna krv), 2) ćelije gajene pod različitim uslovima, 3) korišćeni različiti protokoli za njihovu aktivaciju/sazrevanje, 4) ne postoji potpuna podudarnost između različitih populacija/subpopulacija DĆ kod različitih vrsta, 5) ćelije poticale iz jedinki

različite starosti (Agrawal i sar., 2007b; Agrawal i sar., 2008; Wong i sar., 2010; Pereira i sar., 2011).

Kada je u pitanju broj DC, Tan i saradnici (Tan i sar., 2012) su, analizirajući broj kDC u slezini, limfnim čvorovima i plućima miševa starih 18 meseci, sojeva C57BL/6 i BALB/c, našli da je on bio nepromenjen u odnosu na mlade, osim u plućima C57BL/6, gde je bio povećan, dok su Pereira i saradnici (Pereira i ar., 2011) detektovali smanjenje broja DC u slezini starih miševa. U slezini 26 meseci starih C57BL/6 miševa nađena je promena odnosa subpopulacija DC u poređenju sa slezinama mladih životinja (Wong i sar., 2010). Kod nehumanih primata, majmuna *rhesus macaque*, starenje nije uticalo na zastupljenost DC u perifernoj krvi, ali je u okviru DC promenjen odnos subpopulacija u korist mijeloidnih DC (Asquith i sar., 2012). U perifernoj krvi starih osoba, Agrawal i saradnici (Agrawal i sar., 2007b) nisu našli promenu broja DC u poređenju sa mladim osobama, dok su Della Bella i saradnici (Della Bella i sar., 2007) našli progresivno smanjenje broja mijeloidnih DC sa starenjem i nepromenjen broj pDC. Takođe, ova grupa je našla da DC starih osoba imaju zrelijih fenotip u poređenju sa DC mladih osoba (Della Bella i sar., 2007). Interesantan je i nalaz Jing i saradnika (Jing i sar., 2009), koji ukazuje na smanjenu zastupljenost kDC i pDC u perifernoj krvi starih osoba koje boluju od bar jedne onesposobljavajuće bolesti (Alchajmerova bolest na primer) ili od bar dve hronične bolesti, dok je ona nepromenjena kod zdravih starih osoba.

Nekoliko studija je pokazalo smanjenje gustine Langerhansovih ćelija (LC) u epidermisu kože, mukoznim tkivima i epitelu tonzila starih osoba (Gilcherest i sar., 1982; Kurban i Bhawan, 1990; Indrasingh i sar., 1999). Smanjenje gustine LC nađeno je i u koži i u Pajerovim pločama starih miševa, u poređenju sa mladim miševima (Choi i Sauder, 1987; Fujihashi i McGhee, 2004). Varas i saradnici (Varas i sar., 2003) su pokazali smanjenu gustinu timusnih DC kod starih miševa. Stichel i Luebbert (Stichel i Luebbert, 2007) su našli da kod zdravih miševa, starih oko 12 meseci, započinje nakupljanje DC i T limfocita u mozgu i to najpre u belojoj masi, a tokom narednih 12 meseci njihov broj se povećava i mogu se detektovati i u sivoj masi.

Preuzimanje antigena je važna funkcija nezrelih DC. Smanjena sposobnost preuzimanja antigena pokazana je kod DC koje su dobijene u kulturi diferencijacijom monocita starih osoba u poređenju sa ćelijama dobijenim na isti način od monocita

mladih osoba (Agrawal i sar., 2007b). Ista grupa je pokazala i smanjenu sposobnost MoDC starih osoba da migriraju u pravcu već koncentracije hemokina (Agrawal i sar., 2007b). Takođe, pokazana je i oštećena migratorna sposobnost humanih LC (Bhushan i sar., 2002). Nasuprot ovim rezultatima, pokazana je normalna trans-endotelna migracija DC humane periferne krvi (Pietschmann i sar., 2000). U starih miševa je, takođe, pokazana u *in vivo* uslovima, izmenjena migratorna sposobnost DC ka drenirajućim limfnim čvorovima (Linton i sar., 2005), kao i LC ka regionalnim limfnim čvorovima (Choi i Sauder, 1987).

U brojnim studijama koje su imale za cilj da ispituju sposobnost DC starih jedinki da odgovore na aktivacione stimuluse, najčešće na agoniste TLR4, TLR2/6 i TLR9, dobijeni su različiti rezultati. Najveći broj studija je pokazao da starenje smanjuje sposobnost DC da odgovore na inflamatorni stimulus (Grolleau-Julius i sar., 2006; Pereira i sar., 2011; Li i sar., 2012), dok je jedan broj studija pokazao nepomenjenu (Tesar i sar., 2006; Jones i sar., 2010) ili čak i pojačanu sposobnost ovih ćelija da odgovore na agoniste TLR (Agrawal i sar., 2007a; Agrawal i sar., 2009). Uprkos kontradiktornim rezultatima, postignuta je opšta saglasnost kada je u pitanju smanjen odgovor DC starih jedinki na inflamatorne stimuluse (Wong i Goldstein, 2013). Naime, smatra se da je aktivacija T limfocita od strane DC smanjena kod sistemskih bakterijskih infekcija (Li i sar., 2012), plućnih infekcija izazvanih respiratornim virusima (Katz i sar., 2004) i tumora (Grolleau-Julius i sar., 2006), a da je očuvana kod sistemskih virusnih infekcija (Tesar i sar., 2006). Proces starenja utiče i na funkciju pDC i to, pre svega, na produkciju IFN tipa I u odgovoru na virusne infekcije (Wong i Goldstein, 2013).

1.2.3. Imunopatološka stanja kod starih

Promene koje pogađaju komponente imunskog sistema tokom starenja, nose sa sobom povećan rizik od oboljevanja od infektivnih i inflamatornih, autoimunskih i malignih bolesti.

Kod starih osoba najčešće su infekcije urinarnog i respiratornog trakta, reaktivacije hroničnih virusnih infekcija (*Herpes virus* i *Varicella-zoster virus*), zatim bakterijske infekcije (*Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium*), gljivične (*Candida*) i parazitarne (High, 2004; Montoya-

Ortiz, 2013). Sa druge strane, zaštita od infektivnih bolesti, koja se indukuje vakcinacijom, nije optimalna (Nikolich-Zugich, 2008; Weinberger i sar., 2008). Kod starih osoba je povećana i incidenca bolesti u čijem nastanku značajnu ulogu ima inflamacija, kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, ateroskleroza, dijabetes tip 2 (Brüüsgaard i Pedersen, 2003; McGeer i McGeer, 2004).

Povećanju incidence malignih bolesti u starosti doprinose, kako faktori koji favorizuju tumorogenezu (akumulacija oštećenja ćelija izazvana slobodnim radikalima, virusima, karcinogenima), tako i sužavanje repertoara T limfocita i disfunkcija limfocita i DC (Shurin i sar., 2007; Pawelec i sar., 2010; Fulop i sar., 2011).

Starenje se povezuje i sa izmenjenom incidencom autoimunskih bolesti. Većina literaturnih podataka upućuje na povećanje incidence u starijem životnom dobu, ako se izuzme reproduktivni period kod žena (Grolleau-Julius, 2010). Međutim, incidenca nekih autoimunskih bolesti se sa starenjem smanjuje (dijabetes tip 1 i multipla skleroza) (Leslie i Delli Castelli, 2004; Vollmer i Waxman, 1991).

Kod starih osoba povećana je reaktivnost na sopstvene antigene i na to upućuje češći nalaz autoantitela (reumatoidni faktor, anti-nuklearna antitela, anti-fosfolipidna antitela, anti-tireoglobulin antitela) (Hasler i Zouali, 2005; Johnson, 2006).

Smatra se da su razlozi za povećanu sklonost za razvoj autoimunskog procesa kod starih: 1) produžena izloženost većim koncentracijama autoantigena zbog njihovog neadekvatnog uklanjanja, 2) oštećenje ili izmene anatomskih barijera koje mogu dovesti do oslobađanja skrivenih sopstvenih antigena, 3) posttranslacione obrade sopstvenih proteina koje se dešavaju u starijem životnom dobu (oksidacija, formiranje isoaspartila), 4) infekcije i 5) maligne bolesti, koje mogu doprineti neodgovarajućoj izloženosti sopstvenim antigenima.

Razvoju autoimunosti doprinose i promene na ćelijskom nivou. Kao primeri se navode defekti u aktivaciji i izmenjen prenos signala u T i B limfocitima (Nikolich-Zugich, 2005; Frasca i Blomberg, 2011; Salam i sar., 2013), promene fenotipa i funkcije DC (Agrawal i sar., 2012), promene u odnosu citokina koje produkuju Th1, Th2, Th17 i T reg ćelije (Hawkley i Cacioppo, 2004; Uciechowski i sar., 2007; Lee i sar., 2011).

1.3. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS

Eksperimentalni autoimunski encefalomyelitis (EAE) je najčešće korišćen animalni model humane inflamatorne demijelinizirajuće bolesti centralnog nervnog sistema (CNS) - MS i u upotrebi je od 30-tih godina prošlog veka (Rivers i Schwentker, 1935). Ovaj model se često koristi i kao model CD4⁺ T ćelijski posredovane, organ-specifične autoimunske bolesti, budući da ove ćelije imaju značajno mesto u patogenezi bolesti (Constantinescu i sar., 2011).

EAE se može indukovati kod različitih vrsta primata i glodara. Kada su glodari u pitanju, na kojima je i urađen najveći broj studija, zapažena je sojno-zavisna osetljivost na indukciju bolesti (Miljković i Mostarica Stojković, 2006). Takođe, primećeno je i da su pacovi generalno osetljiviji od miševa (Swanborg, 2001). Bolest je moguće indukovati imunizacijom antigenom ili antigenima mijelina (aktivan EAE) ili adoptivnim transferom mijelin-specifičnih aktivisanih CD4⁺ T limfocita (pasivan EAE) (Zamvil i Steinman, 1990; Swanborg, 2001; Swanborg i Stepaniak, 2001; Miljković i Mostarica Stojković, 2006).

Imunski odgovor na autoantigene, u ovom slučaju na antigene CNS-a, je regulisan brojnim celularnim i molekulskim mehanizmima (Goodnow i sar., 2005). U induktivnoj (inicijalnoj) fazi bolesti, APC na periferiji aktiviraju autoreaktivne, antigen-specifične CD4⁺ T limfocite (Bach i sar., 2004; Platten i Steinman, 2005), koji zatim, u odgovoru na hemotaktičke signale, migriraju u ciljno tkivo tj. CNS (Ransohoff i sar., 2003). U CNS-u, u perivaskularnom prostoru, bivaju reaktivisani od strane tamošnjih APC, nakon čega prodiru u parenhim, gde ispoljavaju svoju efektorsku funkciju, uglavnom produkujući citokine (Wheeler i Owens, 2005; Platten i Steinman, 2005).

Stanovište, da glavnu ulogu u patogenezi bolesti imaju Th1 ćelije koje produkuju IFN- γ , dovedeno je u sumnju kada je kod miševa pokazano da defekt/izostanak IL-12/Th1, ne smanjuje osetljivost ovih životinja na indukciju bolesti, već je čak i pojačavaju (Ferber i sar., 1996; Gran i sar., 2002). Sa druge strane, pokazano je da su miševi koji nemaju p40 subjedinicu IL-12 postali rezistentniji na indukciju bolesti (Zhang i sar., 2003). Otkriće IL-23, za koji je pokazano da deli p40 subjedinicu sa IL-12, kao i Th ćelija koje produkuju IL-17 (Th17), pomoglo je u rasvetljavanju patogeneze EAE-a i MS (El-behi i sar., 2010). Prema današnjem konceptu, ulogu u

patogenezi inflamacije u CNS-u imaju Th1 i Th17 ćelije. Od njihove relativne zastupljenosti na mestu inflamacije i predominantne produkcije jednog ili drugog citokina, zavisi i klinička forma MS-a. Ova tvrdnja ima utemeljenje u nalazu da u inflamaciji posredovanoj Th1 ćelijama dominiraju makrofagi i ona je lokalizovana pretežno u kičmenoj moždini, dok Th17 ćelije indukuju inflamciju prevashodno u mozgu i ona se karakteriše infiltracijom neutrofila (Kroenke i sar., 2008; Stromnes i sar., 2008).

Prethodno, ukratko opisan patološki proces koji se dešava u CNS-u, kao posledicu ima demijelinizaciju, gubitak aksona i gliozu (Constantinescu i sar., 2011). Bolest se kod obolelih životinja manifestuje motornom disfunkcijom, kao ascendentna mlitava paraliza. Ona zahvata najpre rep, zatim zadnje ekstremitete i može da progredira do paralize prednjih ekstremiteta i/ili moribundnog stanja, pa čak i smrti (Takeuchi i sar., 2013).

1.4. SOJNE RAZLIKE KOD PACOVA

Pacov je, posle miša, najčešće korišćena eksperimentalna životinjska vrsta u imunološkim istraživanjima, ali i istraživanjima na polju fiziologije, patologije, toksikologije, transplantacije, farmakologije, ponašanja i drugih oblasti. Danas postoji više od 200 različitih sojeva pacova (Kacew i Festing, 1996) i odabir odgovarajućeg soja za određena ispitivanja je od velike važnosti, budući da se oni razlikuju po fiziološkim, biohemijskim, reproduktivnim, bihejvioralnim i drugim parametrima. Sa imunološkog aspekta, interesantna je činjenica da se pacovi, kao uostalom i ljudi, razlikuju po svojoj podložnosti, odnosno otpornosti prema infektivnim i ne-infektivnim zapaljenskim (inflamatornim) bolestima (Vasilev i sar., 2009). U imunološkim istraživanjima značajno mesto pripada istraživanjima fenomena imunološke tolerancije i autoimunskih bolesti i brojni su primeri različitih sojeva miševa i pacova koje karakteriše različita osetljivost na indukciju ovih bolesti. Kao primer se često navode pacovi Lewis i DA soja kod kojih se lako indukuju Th1 posredovane organ-specifične autoimunske bolesti (EAE, uveoretinitis, dijabetes indukovano streptozotocinom, artritis) i pacovi BN soja koji su podložni razvoju Th2 posredovanih sistemskih autoimunskih bolesti (mijastenija gravis, hiper IgE produkcija, glomerulopatija) (Fournié i sar., 2001). Takođe, manje ili više neosetljivim na indukciju Th1 posredovanih autoimunskih bolesti

se smatraju i pacovi AO, PVG i Fisher soja (Mostarica-Stojkovic i sar., 1982a,b; Swanborg, 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006; Miljković i sar., 2006). U osnovi sojno-zavisnog odgovora na indukciju autoimunskih bolesti je različita genetska osnova ovih životinja (Fournié i sar., 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006).

Kao što je prethodno rečeno, pacovi AO i DA soja (odrasle mlade jedinke) se odlikuju različitom osetljivošću na indukciju Th1 posredovanih autoimunskih bolesti i iz tog razloga se koriste za međusobna poređenja u istraživanjima rezistencije/osetljivosti na ove bolesti, pre svega EAE-a (Lukić i sar., 2001; Miljković i sar., 2006., Marković i sar., 2009). Pokazana je i različita podložnost ovih sojeva infekciji *Trichinella-om spiralis* (Vasilev i sar., 2009). Dosadašnja istraživanja su pokazala da kod ovih sojeva postoje razlike u odgovoru peritonealnih makrofaga na komensalne bakterije creva (produkcija H₂O₂ i NO molekula) (Kovačević-Jovanović i sar., 2009) i na medijatore stresa (produkcija H₂O₂ i fagocitoza) (Stanojević i sar., 2007), kao i razlike u produkciji Th1 i Th17 citokina (Lukić i sar., 2001; Miljković i sar., 2006., Marković i sar., 2009). U literaturi ne postoje podaci koji se odnose na karakteristike kDĆ pacova DA i AO soja i one su predmet izučavanja ove doktorske disertacije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu sve što je prethodno navedeno, profilisala su se dva cilja:

- Prvi, da se ispita uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike konvencionalnih dendritskih ćelija (kDC) pacova, kao i mogući značaj sojnih razlika za nastanak starenjem uslovljenih promena u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama ovih ćelija.
- Drugi, da se utvrdi da li starenjem uslovljene promene kDC pacova koreliraju sa promenom njihove osetljivosti na indukciju organ-specifičnih autoimunskih bolesti.

Da bi se ostvario prvi cilj, izolovane su kDC iz slezine pacova uzrasta 3 meseca (mladi odrasli pacovi) i 26 meseci (stari pacovi) soja Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA), koji pokazuju različit stepen osetljivosti na indukciju eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitis (EAE), prototipa organ specifične autoimunske bolesti posredovne Th1/Th17 limfocitima, i ispitivana je:

1) u populaciji sveže izolovanih kDC:

- zastupljenost osnovnih subpopulacija (CD4+ i CD4-) ovih ćelija;
- nivo ispoljenosti funkcijski važnih molekula, kao što su MHC molekuli II klase i kostimulatorni molekuli (CD80, CD86, CD40), na površini ovih ćelija;
- ekspresija gena za proinflamatorne/imunostimulatorne (TNF- α , IL-6, IL-1 β) i imunomodulatorne/imunosupresivne citokine (IL-10 i TGF- β);
- sposobnost endocitoze dekstrana, a

2) u populaciji kDC, koje su stimulisane *in vitro* lipopolisaharidom (LPS), sposobnost aktivacije/sazrevanja ovih ćelija određivanjem:

- nivoa ispoljenosti MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula na površini ovih ćelija;
- njihovog kapaciteta da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita u ko-kulturi;

- sinteze citokina (TNF- α , IL-12, IL-6, IL-23, IL-10 i TGF- β), koji imaju važnu ulogu u usmeravanju diferencijacije naivnih alogernih CD4+ T limfocita;
- njihovog kapaciteta za usmeravanje diferencijacije alogernih CD4+ T limfocita ka ćelijama koje ispoljavaju citokinski profil karakterističan za Th1, Th2 ili Th17 subpopulaciju ovih ćelija.

Da bi se ostvario drugi cilj, odnosno kako bi se ispitala korelacija između starenjem uslovljenih promena u funkcijskim karakteristikama kDĆ i osetljivosti na indukciju organ-specifičnih autoimunskih bolesti, mladi i stari pacovi AO i DA soja su imunizovani u cilju indukcije EAE-a, i praćeni su neurološki parametri razvoja bolesti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Ova studija je obuhvatila ženke pacova AO i DA srodničkog (*engl.* inbred) soja. Životinje su gajene u providnim polipropilenskim kavezima sa sterilnom piljevinom i pod standardnim laboratorijskim uslovima u vivarijumu Centra za imunološka istraživanja „Branislav Janković” Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak” u Beogradu. Standardni uslovi su podrazumevali konstantnu temperaturu ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), relativnu vlažnost vazduha (50% - 60%), režim smenjivanja svetla i mraka u intervalima od 12 sati i slobodnan pristup vodi i hrani (*ad libitum*).

3.1.1. Eksperimentalne grupe i procedure

U prvom delu studije izvedeni su eksperimenti sa ciljem da se ispita uticaj starenja na slezinske kDC pacova AO i DA soja. Pacovi oba soja su podeljeni u dve grupe: jednu grupu su činile životinje uzrasta 3 meseca (mladi odrasli pacovi, u daljem tekstu mladi pacovi), a drugu životinje uzrasta 26 meseci (stari pacovi). Životinje su žrtvovane postepenim povećanjem doze CO_2 i nakon toga su podvrgnute makroskopskom pregledu unutrašnjih organa. U eksperimente su bile uključene samo životinje koje nisu ispoljavale znake bolesti i kod kojih, na autopsiji, nije detektovano postojanje tumora, uvećanje slezine ili nekog drugog patološkog procesa. Nakon toga, slezine zdravih životinja su pažljivo izvađene, očišćene od okolnog vezivnog i masnog tkiva. Manji deo tkiva slezine je izmeren i zamrznut za analizu ekspresije gena za citokine, dok je ostatak tkiva usitnjen i podvrgnut enzimskoj digestiji. Iz ovako dobijene suspenzije splenocita, flotacijom kroz barijeru niske gustine, dobijena je frakcija ćelija niske gustine koja je obogaćena DC.

Frakcija ćelija niske gustine je korišćena za ispitivanje zastupljenosti osnovnih subpopulacija kDC, njihovih fenotipskih karakteristika i endocitoznog kapaciteta. Kako bi se izdvojila samo populacija kDC, jedan deo frakcije ćelija niske gustine je podvrgnut imunomagnetnom razdvajaju ćelija na osnovu ispoljenosti CD103 (OX62) molekula. Nakon imunomagnetnog razdvajanja deo kDC je ostavljen za analizu ekspresije gena za citokine i TLR4, dok su ostale ćelije stimulisane LPS-om i njihova sposobnost aktivacije/sazrevanja ispitivana je analizom: 1) fenotipskih karakteristika i

2) kapaciteta da sintetišu citokine, stimulišu proliferaciju i usmeravaju diferencijaciju alogenih CD4+ T limfocita.

U drugom delu studije su ženke mladih i starih pacova AO i DA soja imunizovane u cilju indukcije EAE-a, i praćeni su neurološki parametri bolesti.

3.1.2. Dozvola Etičkog komiteta

Etička komisija Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu je odlukom od 19.06.2012. godine, zavedenom pod brojem 6/12, izdala dozvolu za rad sa eksperimentalnim životinjama, a u sklopu istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji

3.2. HEMIKALIJE, ANTITELA I IMUNOKONJUGATI

Za izolovanje frakcije ćelija niske gustine iz slezine korišćeni su: kolagenaza D (Roche Diagnostics, Meylan, Francuska) izolovana iz *Clostridium histolyticum* i komercijalni gustinski gradijenti Optiprep™ i Percoll® (Sigma Aldrich, Oslo, Norveška).

Za imunomagnetno razdvajanje ćelija (*engl.* magnetic activated cell sorting, MACS) korišćene su: mikročestice (microbeads) vezane za antitela protiv DĆ (klon OX62) i protiv CD4 molekula (klon OX38) (Miltenyi Biotec, Gladbach, Nemačka) i MACS pufer. Ovaj pufer je sadržavao PBS (*engl.* phosphate buffered saline) uz dodatak 2 mM etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) i 0.5% goveđeg serum albumina (*engl.* bovine serum albumine, BSA). PBS (pH 7.4) je obezbeđen iz Instituta za virusologiju, vakcine i serume “Torlak” u Beogradu, dok su EDTA i BSA nabavljeni od Fluka AG Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland.

Za gajenje DĆ tokom njihove aktivacije i izvođenja mešane leukocitne reakcije (MLR) korišćen je RPMI 1640 medijum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) kome su dodavani 25 mM N-2-hidroksietilpiperazin N'-2-etansulfonska kiselina HEPES (Sigma-Aldrich), 100 i.j./ml penicilina (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), 1 mM natrijum piruvata (Serva, Heidelberg, Nemačka), L-glutamin (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, SAD) i 100 mg/ml streptomicina (ICN), kao i fetalni teleći serum (*engl.* fetal calf serum, FCS) (Gibco, Grand Island, NY, SAD), prethodno

inaktivisan toplotom u vodenom kupatilu (30 min na 56°C), u koncentraciji od 10%. Takođe, upotrebljavan je i LPS (Sigma Aldrich) koji je prethodno rastvoren pod sterilnim uslovima u RPMI 1640 medijumu i čuvan na -20 °C do upotrebe.

Za obeležavanje membranskih antigena korišćena su sledeća monoklonska antitela (mAt): anti-RT1B antitelo (MHC II; klon OX6) konjugovano fluorescein-izotiocijanatom (FITC), anti-CD11b antitelo (klon WT.5) konjugovano biotinom ili FITC-om, anti-CD4 antitelo (klon OX38) konjugovano FITC-om ili fikoeritriinom (PE), anti-CD3 antitelo (klon 1F4) konjugovano PE-om, anti-CD80 antitelo (klon 3H5) konjugovano biotinom, anti-CD86 antitelo (klon 24F) konjugovano biotinom, anti-CD40 antitelo (klon HM40-3) konjugovano FITC-om, kupljena od BD Bioscience Pharmingen (San Diego, CA, SAD). Zatim, anti- α_{E2} podjedinica integrina (anti-OX62 antitelo; klon OX62) konjugovano PE-om (AbD Serotec, UK) i poliklonsko zečije anti-TLR4 antitelo (Abcam, Cambridge, UK). Streptavidin-peridin hlorofil protein (*engl.* peridin chlorophyll protein, PerCP), kozije anti-zečije antitelo konjugovano FITC-om i odgovarajuće izotipske kontrole su nabavljeni od BD Biosciences Pharmingen. Takođe, prilikom obeležavanja antigena, korišćen je i odgovarajući pufer (FACS pufer) za ispiranje ćelijskih suspenzija, koji je sadržavao PBS uz dodatak 2% FCS i 0.09% NaN_3 .

Za analizu vijabilnosti kDĆ korišćen je 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) (BD Biosciences Pharmingen Mountain View, CA, SAD).

Prilikom analize endocitozne aktivnosti DĆ korišćen je dekstran konjugovan FITC-om (Sigma Aldrich, St Louis, SAD), koji je prethodno rastvaran u destilovanoj vodi.

Za analizu proliferacije alogenih CD4+ T limfocita u MLR korišćen je 5(6)-karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estar (CFSE) (Sigma Aldrich, St Louis, SAD). CFSE je rastvaran u dimetil-sulfoksidu (DMSO) i čuvan na -20 °C do upotrebe. Ova boja tek nakon pasivne difuzije u ćeliju i delovanja intracelularnih esteraza, postaje fluorescentna jer nastaje fluorescentni karboksifluorescein sukcinimidil estar. Ovo novonastalo jedinjenje reaguje sa intracelularnim aminima i formira fluorescentne konjugate koji ostaju u ćeliji. Prilikom deobe ćelije, boja se podjednako raspodeljuje na ćerke ćelije i ne prenosi se na okolne ćelije.

Prilikom analize ekspresije gena upotrebljeni su sledeći reagensi: komercijalni reagensi za izolaciju ukupne RNK u sastavu Total RNA Chemistry Starter Kit (Wash Solution 1 i 2, Elution Solution, Absolute RNA Wash Solution) (Applied Biosystem, Foster City, CA, SAD); komercijalni reagensi za transkripciju RNK u cDNK (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) (Applied Biosystems) (10x RT Buffer, 25x dNTP Mix, 10x RT Random Primers, MultiScribe Reverse Transcriptase i RNase inhibitor); komercijalna TaqMan smeša reagenasa za merenje ekspresije gena (Gene Expression Master Mix) (Applied Biosystems); komercijalni TaqMan eseji za merenje ekspresije iRNK pacova: IL-10 (Rn00563409_m1), TNF- α (Rn99999017_m1), IL-12a (Rn00584538_m1), IL-23a (Rn00590334_g1), IL-6 (Rn99999011_m1), TGF- β 1 (Rn00572010_m1), IL-1 β (Rn99999009_m1), TLR4 (Rn00569848_m1), NOS2 (Rn00561646_m1) i hipoksantin fosforibozil transferaza 1 (HPRT 1; *engl.* hypoxanthine phosphoribosyl transferase) (Rn01527840_m1). Ovi eseji su nabavljeni od Applied Biosystem.

Za određivanje koncentracije citokina u supernatantima kultura ELISA „sendvič“ metodom, korišćeni su komercijalni testovi za pacovske citokine i to za: TNF- α , IL-6 i IL-17A (Biolegend, San Diego, CA, SAD), IL-10 i TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, SAD), IL-12p70 (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, SAD), IL-4 (Bender Medsystems, Vienna, Austria), IL-23 (USCN Life Science Inc. Houston). U ELISA testu za određivanje koncentracije IFN- γ korišćeni su: anti-pacovski IFN- γ (klon DB1), poliklonsko anti-pacovski IFN- γ antitelo konjugovano biotinom i rekombinantni pacovski IFN- γ (eBioscience, Vienna, Austria), kao i ekstravidin-peroksidaza i orto fenil-diamina (OPD) (Sigma Aldrich).

Izvođenje nekih ELISA testova je zahtevalo prethodnu pripremu odgovarajućih pufera. Karbonatni pufer je korišćen za razblaživanje antitela kojim su oblagani bazeni mikrotitracione ploče, kao priprema za izvođenje ELISA testa za određivanje koncentracije IFN- γ . Pufer je pravljen tako što je 0.8403 g NaHCO₃ i 0.3655 g Na₂CO₃ rastvarano u 100 ml destilovane vode. NaHCO₃ i Na₂CO₃ su nabavljeni od Sigma Aldrich. U istom ELISA testu korišćen je i citratni pufer za rastvaranje OPD-a, koji se sastojao od limunske kiseline i Na₂HPO₄ x 2H₂O. Pufer je pravljen tako što su najpre napravljeni rastvori 0.1 M limunske kiseline i 0.2 M Na₂HPO₄ x 2H₂O u destilovanoj vodi i nakon toga, pomešano je 49 ml rastvora limunske kiseline sa 51 ml rastvora

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, da se dobije 100 ml citratnog pufera. Limunska kiselina i $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ su nabavljeni od Sigma Aldrich. Za ispiranje bazenčića mikrotitracione ploče, prilikom izvođenja ELISA testa za određivanje koncentracije IFN- γ , IL-17 i TNF- α , korišćen je pufer koji je sadržavao PBS uz dodatak 0.05% Tween 20 (Sigma Aldrich).

U eksperimentalnom radu su korišćeni i: natrijum azid (NaN_3) i vitalna boja Tripin plavo, nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Nemačka). Takođe, prilikom imunizacije životinja, upotrebljavana je *Bordetella pertussis* vakcina, dobijena od Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, kao i kompletni Freund-ov adjuvans (CFA), koji je sadržavao u 1 ml: 1 mg ubijenih *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177), 0.85 ml parafinskog ulja i 0.15 ml manid monooleata, nabavljen od Sigma-Aldrich Chemie.

3.3. IZDVAJANJE ČELIJA

3.3.1. Izdvajanje i aktivacija kDĆ

3.3.1.1. Dobijanje frakcije ćelija niske gustine

Slezine životinja su usitnjene i podvrgnute enzimskoj digestiji u rastvoru kolagenaze D u PBS-u, finalne koncentracije 2 mg/ml, 30 minuta na 37 °C. Pet minuta pre isteka ovog vremena, u suspenzije je dodavan EDTA (10 mM), da bi se sprečilo formiranje ćelijskih agregata. Ovako dobijena suspenzija splenocita je propuštena kroz čeličnu mrežicu (pore veličine 60 μm) radi uklanjanja delova tkiva i isprana u PBS/2% FCS centrifugiranjem na hladnom.

U cilju dobijanja frakcije ćelija niske gustine splenociti su resuspendovani u RPMI/0,04% EDTA i pomešani sa OptiprepTM-om (3:1 v/v) da bi se dobio 15% rastvor ($\rho=1.085$ g/ml). Zatim je na 4 ml ovako pripremljene suspenzije nasloženo 5 ml 11.5% OptiprepTM-a (komercijalni gradijent je razblažen u fiziološkom rastvoru uz dodatak 1 mM EDTA, 10 mM HEPES-a i 0,5% BSA; pH 7.4; $\rho=1.068$ g/ml) i 2 ml RPMI/0.02% EDTA i ćelije su centrifugirane na 600 x g, 15 minuta na +4 °C, bez kočenja prilikom zaustavljanja centrifuge. Ćelije niske gustine koje su se izdvojile na gornjoj površini 11.5% OptiprepTM-a, tj. između dva gornja sloja, su pažljivo pokupljene, resuspendovane u PBS/2% FCS i dva puta isprane centrifugiranjem.

3.3.1.2. Imunomagnetno izdvajanje kDC

Kako bi se dobila visoko obogaćena populacija kDC iz frakcije ćelija niske gustine urađeno je „pozitivno“ imunomagnetno razdvajanje. Iz podešene suspenzije ćelija niske gustine, 1×10^7 ćelija je resuspendovano u 80 μ l MACS pufera i inkubirano sa 20 μ l MicroBeads mikročestica vezanih za antitela protiv DC pacova (klon OX62) 15 minuta na +4 °C. Ćelije su zatim isprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene na 300 x g i resuspendovane u 500 μ l MACS pufera. Ovako pripremljena ćelijska suspenzija je propuštena kroz LS kolonu (Miltenyi Biotec) koja se nalazila u magnetnom polju Quadro MACS separatora (Miltenyi Biotec). U ovakvom sistemu, prilikom prolaska ćelijske suspenzije kroz kolonu, obeležene ćelije (kDC) ostaju u koloni, dok neobeležene ćelije prolaze i bivaju uklonjene. Nakon ispiranja (tri puta sa po 5 ml MACS pufera), kolona je uklonjena iz magnetnog polja i iz nje su, MACS puferom i uz korišćenje odgovarajućeg klipa, istisnute obeležene kDC.

Čistoća ovako dobijene „pozitivno“ izdvojene ćelijske suspenzije je proveravana obeležavanjem dobijenih ćelija sa anti-CD11b mAb koje je konjugovano FITC-om i preko 88,9% ćelija su bile kDC. Takođe, više od 95% je bilo živo, što je potvrđeno korišćenjem vitalne boje Tripan plavo.

Nakon imunomagnetnog prečišćavanja, kDC su gajene u pločama sa 24 mesta (1×10^6 ćelija/ml) u prisustvu ili odsustvu LPS-a (1 μ g/ml) preko noći (16-18 h) na 37 °C i u atmosferi sa 5% CO₂. Nakon isteka ovog vremena, kDC su pokupljene i korišćene za različite analize, dok su supernatanti čuvani na -70 °C i u njima je određivana koncentracija citokina.

3.3.2. Izdvajanje CD4+ T limfocita iz slezine i obeležavanje CFSE-om

Nakon vađenja, tkivo slezine je macerirano i propuštanost kroz čeličnu mrežicu sa otvorima veličine 60 μ m. Ovako dobijena ćelijska suspenzija je oprana centrifugiranjem u hladnom PBS/2% FCS. Zatim je, na 2 ml gustinskog gradijenta $\rho=1.077$ g/ml, koji je dobijen mešanjem 1.5 M NaCl, Percoll[®]-a i dejonizovane vode u odnosu 1:5.48:3.52, nasloženo 4 ml suspenzije ćelija slezine i ćelije su centrifugirane (700 x g, 20 minuta na hladnom). Mononuklearne ćelije, koje su se izdvojile na spoju dve faze, su sakupljane,

oprane centrifugiranjem u PBS/2% FCS i CD4⁺ T ćelije su izdvajane pomoću MACS tehnologije.

Ukratko, 1×10^7 ćelija je resuspendovano u 80 μ l MACS pufera i inkubirano sa 20 μ l anti-CD4 At konjugovanim sa MicroBeads mikročesticama, 15 minuta na +4 °C. Ćelije su zatim oprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene centrifugiranjem na 300 x g i resuspendovane u 500 μ l MACS pufera. Suspenzija ćelija obeleženih MicroBeads česticama propuššana je kroz LS kolonu smeštenu u magnetnom polju Quadro MACS separatora i CD4⁺ ćelije su dobijene na isti način kao što je već opisano kod izdvajanja kDĆ. Čistoća CD4⁺ ćelija dobijenih iz „pozitivne frakcije“ bila je preko 95%, što je pokazano analizom na protočnom citometru korišćenjem anti-pacovskog CD4 mAt konjugovanog sa PE-om.

Za obeležavanje CD4⁺ ćelija CFSE-om, 1×10^6 ćelija je resuspendovano u 1 ml PBS-a i inkubirano sa CFSE-om (5 μ M) u trajanju od 10 minuta, na temperaturi 37 °C, u mraku. Reakcija je prekidana dodavanjem 5 x veće zapremine ledeno hladnog PBS-a i inkubiranjem još 5 minuta na hladnom. Ćelije su oprane centrifugiranjem i korišćene kao responderi u alogenoj MLR. Kada su u MLR kao stimulatori korišćene kDĆ pacova AO soja CD4⁺ T limfociti su izolovani iz slezine pacova DA soja (alogeni CD4⁺ T limfociti) i obrnuto.

3.4. PROTOČNA CITOFUOROMETRIJA

3.4.1. Priprema uzoraka za analizu ispoljenosti membranskih antigena

Iz podešenih suspenzija ćelija (frakcije niske gustine i kDĆ stimuliranih u prisustvu ili bez LPS-a) u posebne epruvete je izdvojena zapremina u kojoj se nalazi 1×10^5 ćelija i ćelije su istaložene centrifugiranjem (350 x g, 5 minuta, +4 °C) u FACS puferu. Na talog ćelija dodavana su odgovarajuća At direktno obeležena fluorohromom (direktno bojenje) i ćelije su inkubirane 30 minuta u mraku na +4 °C. Ćelije podvrgnute direktnom imunofluorescentnom obeležavanju su 2 x oprane u FACS puferu i jednom rastvorom PBS-a koji sadrži 0.09% NaN₃, a zatim su resuspendovane u 300 μ l PBS/0.09% NaN₃ i analizirane na protočnom citofluorometru (*engl.* Flow cytometry analysis, FCA)

Kada su korišćena neobeležena At ili At konjugovana biotinom (indirektno bojenje) obeležavanje ćelija je rađeno u dva koraka. Posle inkubacije sa neobežeženim At ili At konjugovanim biotinom (30 minuta u mraku na +4 °C), ćelije su oprane 2 x u FACS puferu, a zatim je na talog ćelija dodavan odgovarajući sekundarni reagens (streptavidin konjugovan PerCP-om ili fluorohromom obeleženo odgovarajuće At) i ćelije su ponovo inkubirane 30 minuta u mraku na +4 °C. Nakon inkubacije, ćelije su oprane, resuspendovane i analizirane na isti način kao nakon direktnog bojenja.

Uz svako od korišćenih antitela, upotrebljena su irelevantna antitela odgovarajućeg izotipa (izotipske kontrole), obeležena odgovarajućim fluorohromom, u cilju definisanja eventualno prisutnog nespecifičnog bojenja.

Za fenotipsku karakterizaciju sveže izolovanih kDĆ, u okviru frakcije ćelija niske gustine, korišćene su kombinacije At sledeće specifičnosti:

- CD4/OX62/CD11b
- MHC II/OX62/CD86
- CD40/OX62/ CD80
- TLR4/OX62

Za određivanje preživljavanja kDĆ u kulturi nakon stimulacije LPS-om, kao i za fenotipsku karakterizaciju tih ćelija korišćene su kombinacije At sledeće specifičnosti:

- CD11b/CD4/7-AAD
- MHC II/OX62/CD86
- CD40/OX62/CD80

3.4.2. Analiza uzoraka protočnom citofluorometrijom

Za analizu uzoraka suspenzije različitih ćelija protočnom citofluorometrijskom metodom, korišćen je protočni citometar FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD), sa argonskim jonskim laserom talasne dužine 488 nm. Princip rada protočnog citofluorometra podrazumeva prolazak svake ćelije iz suspenzije kroz fokusirani laserski svetlosni snop, pri čemu dolazi do rasipanja svetlosti i emitovanja fluorescence. Odgovarajući detektori aparata registruju prednje rasipanje svetlosti (*engl.*

forward scatter channel, FSC), odnosno rasipanje svetlosti pod pravim uglom (*engl.* side scatter channel, SSC), čime se dobijaju podaci o relativnoj veličini, odnosno granuliranosti ćelije. Fluorohromi kojima su obeležene ćelije bivaju pobuđeni apsorpcijom energije svetlosnog snopa, da bi, potom, emitovali svetlost veće talasne dužine, koja se naziva fluorescencom. Na osnovu fluorescence koju emituju fluorohromi kojima su obeleženi unutarćelijski ili membranski antigeni i koju registruju odgovarajući detektori, dobijaju se podaci o relativnoj brojnosti ćelija koje ispoljavaju ispitivane antigene u ukupnoj populaciji, dok intenzitet emitovane fluorescence odgovara gustini njihove ekspresije po ćeliji. U eksperimentima su korišćeni fluorohromi čiji ekscitacioni spektar obuhvata talasnu dužinu od 488 nm, a njihovi emisijski spektri su takvi (maksimumi emisije: FITC-530 nm, PE-585 nm, PerCP-650 nm, 7-AAD-647 nm, CFSE-521 nm) da se mogu razdvojiti i istovremeno detektovati, uz minimalni gubitak intenziteta emitovane svetlosti.

Iz svakog uzorka učitavano je 10000 ćelija. Iz analize su isključene mrtve ćelije i njihovi delovi, na osnovu veličine (FSC) i granuliranosti (SSC) ćelija. Procenat pozitivnih ćelija određivan je upotrebom kompjuterskog programa FlowJo software v.7.8 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, SAD).

Analiza ekspresije MHC molekula II klase, CD80, CD86, CD40 i TLR4 na kDĆ i kapaciteta endocitoze dekstrana od strane kDĆ, uključivala je određivanje i srednjeg intenziteta fluorescence (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) za svaki fluorohrom, a koji odražava gustinu ekspresije analiziranog molekula. MFI je određivan upotrebom kompjuterskog programa FlowJo.

3.5. ODREĐIVANJE ENDOCITOZE DEKSTRANA

Endocitozna sposobnost sveže izolovanih kDĆ da preuzimaju antigene određivana je na osnovu sposobnosti ovih ćelija da posredstvom manoznog receptora, preuzimaju dekstran konjugovan FITC-om. Suspenzija ćelija slezine niske gustine (koncentracije 1×10^5 ćelija/100 μ l) je inkubirana sa dekstranom koji je konjugovan FITC-om (1 mg/ml) 90 minuta na 37 °C, dok su kao kontrola korišćene ćelije koje su u isto vreme inkubirane sa dekstran-FITC-om na +4 °C. Preuzimanje dekstrana zaustavljeno je dodavanjem hladnog FACS pufera i ćelije su 2 x oprane u njemu. Nakon

toga, kDC su direktno obojene dodavanjem anti-OX62 mAt koje je konjugovano PE-om, inkubirane, oprane i analizirane na protočnom citofluorometru.

3.6. ODREĐIVANJE PROLIFERACIJE ALOGENIH CD4+ T LIMFOCITA

Sposobnost kDC (stimulatori), koje su kultivisane u prisustvu ili odsustvu LPS-a, da indukuju proliferaciju alogeni CD4+ T limfocita (responderi) obeleženih CFSE-om, je ispitivana u alogenoj MLR. Isti broj CD4+ T limfocita obeleženih CFSE-om (1×10^5) ko-kultivisan je sa različitim brojem kDC (od 2.5×10^3 do 2×10^4 ćelija) tako da je odnos kDC:T limfociti u bazenima bio 1:5, 1:10, 1:20 i 1:40. Ćelije su ko-kultivisane u pločama sa 96 bazena sa ovalnim dnom, na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO₂ u ukupnoj zapremini od 200 µl. Nakon petodnevne ko-kultivacije, ćelije su prebacivane u epruvete i istaložene centrifugiranjem. Pokupljeni su supernatani, koji su čuvani na -70 °C i u njima je određivana koncentracija citokina. Istaložene ćelije su oprane 2 x u FACS puferu i CD4+ T limfociti su direktno bojeni anti-CD3 mAt koje je konjugovano PE-om. Analiza proliferacije CD3+ ćelija rađena je na protočnom citometru. Na osnovu MFI za CFSE moguće je razdvojiti: 1) ćelije koje imaju niži intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje su proliferisale i 2) ćelije koje imaju visok intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje nisu proliferisale. Za izračunavanje indeksa deobe (*engl.* division index) korišćena je platforma za analizu proliferacije kompjuterskog programa FlowJo software v.7.8. Indeks deobe predstavlja prosečan broj deoba svih ćelija iz početne populacije. U literaturi je pokazan visok stepen korelacije između ova dva parametra i merenja proliferacije limfocita korišćenjem radioaktivnog timidina (Pinto i sar., 2011).

3.7. ODREĐIVANJE PREŽIVLJAVANJA kDC U KULTURI

Procenat živih ćelija, nakon prekonoćne kultivacije u prisustvu ili odsustvu LPS-a, određivan je korišćenjem fluorescentne boje 7-AAD koja se velikim velikim afinitetom vezuje za DNK, naročito za regione bogate G-C. Ova boja ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu živih ćelija. Procenat živih ćelija u kulturi kDC određivan je na osnovu vrednosti intenziteta fluorescence 7-AAD i FSC parametra. Naime, 7-AAD omogućava razdvajanje živih ćelija, koje imaju normalnu morfologiju, očuvan integritet membrane i ne vezuju 7-AAD (7-AAD-) i apoptotičnih ćelija, koje imaju

izmenjenu morfologiju (manje su po veličini i imaju manji FSC), gube integritet membrane i vezuju 7-AAD (7-AAD+) (Lecoeur i sar., 1997).

Nakon kultivacije, kDĆ su direktno obojene dodavanjem anti-CD11b mAt konjugovanog FITC-om i anti-CD4 mAt konjugovanog PE-om. Zatim je u suspenzije ćelija dodavano 5 μ l 7-AAD, ćelije su inkubirane u mraku 20 minuta, na 4 °C i analizirane na protočnom citofluorometru.

3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA CITOKINE I TLR4

3.8.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva slezine i kDĆ

Tkivo slezine (20 mg) je neposredno nakon merenja zamrzavano u 2 x koncentrovanom puferu za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Nucleic acid purification lysis solution) (Applied Biosystems) i do analize čuvano na -70 °C u cilju sprečavanja degradacije molekula RNK. Neposredno pred izolaciju tkivo je odmrzavano i homogenizovano u razblaženom puferu za prečišćavanje. Homogenat tkiva slezine (150 μ l) je filtriran radi uklanjanja grubljih nečistoća, a zatim je obavljeno prečišćavanje ukupne tkivne RNK. Obe procedure su obavljene upotrebom ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation, poluautomatizovanog sistema za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Applied Biosystems) i komercijalnih reagenasa (Total RNA chemistry starter kit) prema uputstvu proizvođača.

Nakon imunomagnetnog izdvajanja ili prekonocne kultivacije kDĆ (1×10^5 ćelija) su istaložene i lizirane u 2 x razblaženom puferu za prečišćavanje nukleinskih kiselina. Lizati ćelija su zamrzavani i do analize čuvani na -70 °C. Izolovanje ukupne RNK iz lizata kDĆ obavljeno je isti način kao i iz tkiva slezine upotrebom ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation sistema i komercijalnih reagenasa prema uputstvu proizvođača.

Izolovana RNK iz tkiva slezine i kDĆ je prečišćena od proteina, nukleaza i drugih nečistoća.

3.8.2. Prevođenje ukupne RNK u komplementarnu DNK

Prevođene ukupne RNK u komplementarnu DNK (*engl.* complementary DNA, cDNK) reverznom transkripcijom je obavljeno upotrebom reagenasa iz High-capacity

cDNA reverse transcription kompleta na aparatu Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) prema uputstvu proizvođača. Svaka reakciona smeša u kojoj je rađena reverzna transkripcija sadržavala je: 10 µl prečišćene RNK (uzorak), 2 µl 10x koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (RT Buffer), 0.8 µl mešavine nukleotida (25x dNTP Mix) (100 mM), 2 µl nasumičnih prajmera (10x RT Random Primers), 1 µl reverzne transkriptaze (MultiScribe Reverse Transcriptase), 1 µl inhibitora RNaze (RNase inhibitor) i 3.2 µl vode koja ne sadrži nukleaze. Reverzna transkripcija se odvijala pod standardnim uslovima, koji su uključivali inkubacije od 10 minuta na temperaturi od 25 °C, zatim od 120 minuta na 37 °C i konačno, 5 sekundi na 85 °C. Posle transkripcije RNK u cDNK, sintetisana cDNK je korišćena za kvantifikaciju gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl.* real time polymerase chain reaction, RT-PCR).

3.8.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

RT-PCR metoda uključuje klasično umnožavanje PCR metodom i fluorometriju specifične probe obeležene fluorescentnom bojom. Generalno, gensko-specifične probe koje se koriste u RT-PCR metodi su obeležene, na jednom kraju, fluorescentnom bojom koja se naziva donor, i na drugom kraju bojom koja se naziva akceptor. Nakon osvetljavanja donora svetlošću diode, pobuđena fluorescentna boja emituje fluorescentni signal, koji u potpunosti apsorbuje akceptor. Kako *Taq* polimeraza (polimeraza izolovana iz *Thermophilus aquaticus-a*) pokazuje i 5' egzonukleaznu aktivnost, u fazi elongacije produkta PCR reakcije dolazi do isecanja proba, odnosno do odvajanja donora i akceptora, što detektor registruje kao povećanje fluorescence donora (Cikota i sar., 2002).

Sve RT-PCR reakcije su rađene u triplikatu, pod standardnim uslovima definisanim za Applied Biosystems 7500 aparat, koji su uključivali: inkubacije od 2 minuta na 50 °C, zatim od 10 minuta na 95 °C, 40 ciklusa od po 15 sekundi na 95 °C i konačno, inkubaciju u trajanju od jednog minuta na 60 °C. Svaka od reakcija se odvijala u ukupnoj zapremini od 25 µl, i sadržavala je 5 µl cDNK, 12.5 µl smeše ragenasa za merenje ekspresije gena (TaqMan Gene expression master mix, Applied Biosystems), 1.25 µl eseja specifičnog za gensku sekvencu od interesa (TaqMan Gene expression assay, Applied Biosystems) i 6.25 µl vode. U uzorcima tkiva slezine analizirana je

ekspresija gena za citokine TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β 1, kod sveže izolovanih kDĆ, pored prethodno navedenih citokina analizirana je još i ekspresija gena za IL-1 β i TLR4, dok je u kDĆ iz kultura analizirana ekspresija gena za: TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1, IL-12a, IL-23a, IL-1 β i NOS2. HPRT je služio kao unutrašnji standard, u cilju normalizacije varijacija u polaznoj količini cDNK.

Relativna kvantifikacija ekspresije gena vršena je na osnovu ciklusa u kojem se detektuje porast intenziteta fluorescentnog signala iznad nivoa šuma (*engl.* threshold cycle, Ct), tokom eksponencijalne faze reakcije. Promene u ekspresiji ispitivanih iRNK su izražavane u odnosu na tzv. „kalibrator“, odnosno referentni uzorak. U svim merenjima, uzorci dobijeni iz mladih životinja su objedinjavani i korišćeni kao kalibrator. Analiza dobijenih rezultata vršena je upotrebom kompjuterskog programa SDS software v.1.4.0. (Applied Biosystems), a konačan rezultat je izražavan u arbitrarnim jedinicama, kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator (normalizovan prema HPRT), prema formuli:

$$N_{\text{uzorka}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

pri čemu je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{uzorka}} - \Delta Ct_{\text{kalibratora}}$$

$$\Delta Ct_{\text{uzorka}} = Ct_{\text{ciljnog transkripta}} - Ct_{\text{HPRT}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibratora}} = Ct_{\text{ciljnog transkripta}} - Ct_{\text{HPRT}}$$

3.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CITOKINA ENZIMSKIM IMUNOLOŠKIM METODAMA

Koncentracije citokina (TNF- α , IL-10, IL-12p70, IL-6, IL-23 i TGF- β) su određivane u supernatantima kultura kDĆ koje su kultivisane u prisustvu ili odsustvu LPS-a, i u supernatantima ko-kultura kDĆ i CD4+ T limfocita posle petodnevne MLR (IFN- γ , IL-17A, IL-4) korišćenjem enzimskih imunoloških metoda (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

3.9.1. TNF- α

Koncentracija TNF- α je određivana komercijalnim ELISA MAXTM Deluxe Set-om za pacovski TNF- α , prema uputstvu proizvođača. Kit je sadržao: mikrotitracione ploče sa 96 bazena (Nunc MaxisorpTM), jedno At specifično za pacovski TNF- α za oblaganje ploče i drugo At specifično za pacovski TNF- α konjugovano biotinom, avidin konjugovan peroksidazom rena (avidin-HRP), komponente A i B za pravljenje rastvora tetrametil benzidin (TMB) supstrata, pacovski TNF- α poznate koncentracije (standard), puferovani rastvor za oblaganje ploče i komercijalni rastvarač za standard i uzorke (puferovani rastvor proteina).

Pre izvođenja testa (16-18 h) bazeni ploče su obloženi anti-TNF- α At (100 μ L 1:200 razblaženog At) i ploča je inkubirana na +4 °C preko noći. Sledećeg dana, bazeni su najpre ispirani četiri puta sa po 300 μ L pufera za ispiranje (PBS/0.05% Tween 20), a zatim je u bazene sipano 200 μ L komercijalnog rastvarača za standard i uzorke i ploča je inkubirana, uz mešanje, na sobnoj temperaturu 1 h. Nakon inkucije, bazeni su isprani na isti način kao što je prethodno opisano i u svaki bazen je dodavano 50 μ L komercijalnog rastvarača za standard i uzorke i 50 μ L standarda ili uzorka po unapred napravljenj šemi. Standardi/uzorci su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi uz neprekidno mešanje. Po isteku inkubacije i ispiranja bazena, u svaki bazen je dodavano 100 μ L anti-TNF- α At obeleženog biotinom (razblaženje 1:200). Ploča je inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi uz mešanje i po isteku tog vremena bazeni su ispirani i naliveno je 100 μ L avidin-HRP razblazenog 1:1000 i inkubacija je nastavljena narednih 30 minuta. Posle ispiranja, u bazene je dodavano po 100 μ L sveže napravljenog rastvora supstrata i posle 15 minuta inkubacije u mraku reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 μ L 2N H₂SO₄ i intenzitet razvijene boje je meren na spektrofotometru na 450 nm. Koncentracija citokina je izračunavana na osnovu standardne krive. Standardi su korišćeni u sedam različitih, dvostruko opadajućih koncentracija počev od 1000 pg/ml, dok je kao nula korišćen komercijalni rastvarač za standard i uzorke. Uzorci standarda i supernatanta kultura su rađeni u triplikatu. Prosečna minimalna koncentracija TNF- α koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 2 pg/ml.

3.9.2. IL-10

Koncentracija IL-10 je određivana komercijalnim ELISA kitom sledeći uputstva proizvođača. Kit je sadržavao: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena obloženu mAt specifičnim za pacovski IL-10, poliklonsko At specifično za pacovski IL-10 konjugovano peroksidazom rena, H₂O₂ i TMB (supstrat), rekombinantni pacovski IL-10 (standard), rastvor hlorovodonične kiseline za zaustavljanje reakcije, puferovani rastvor proteina (*engl.* assay diluent), komercijalni rastvarač za standard i uzorke (puferovani rastvor proteina) i puferovani rastvor za ispiranje.

U bazene mikrotitracione ploče dodavano je najpre po 50 µL komercijalnog rastvarača eseja i 50 µL standarda ili supernatanta i inkubirano na sobnoj temperaturi. Posle 2 sata, bazeni su ispirani pet puta sa 400 µL puferovanog rastvora za ispiranje i dodavano je po 100 µL poliklonskog anti-IL-10 At konjugovanog peroksidazom rena u svaki bazen. Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, bazeni su ispirani (kako je prethodno opisano) i dodavano je po 100 µL supstrata. Inkubacija je nastavljena 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodavanjem rastvora hlorovodonične kiseline i intenzitet boje je izmeren na spektrofotometru na 450 nm. Standardna kriva je konstruisana pomoću standarda (najveća koncentracija standarda je bila 2000 pg/ml) na isti način kao što je prethodno opisano i na osnovu ove krive je izračunavana koncentracija citokina u supernatantima. Minimalna koncentracija IL-10 koja se može izmeriti ovim testom je manja od 10 pg/ml.

3.9.3. IL-12p70

Koncentracija IL-12p70 je određivana komercijalnim ELISA kitom prema uputstvu proizvođača. Komercijalni komplet je sadržao sledeće komponente: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena koji su obloženi mAt specifičnim za subjedinicu p35 IL-12 pacova, mAt specifično za subjedinicu p40 IL-12 pacova koje je konjugovano biotinom, peroksidazu rena konjugovanu streptavidinom, H₂O₂ i TMB (supstrat), rekombinantni pacovski IL-12p70 (standard), komercijalni rastvarač standarda, rastvor za zaustavljanje reakcije, pufer za inkubaciju i puferovani rastvor za ispiranje.

U bazene ploče sa 96 bazena dodavano je po 100 µL standarda ili supernatanta i po 50 µL komercijalnog rastvarača standarda (u bazene koji su sadržavali supernatante) tj. po 50 µL pufera za inkubaciju (u bazene koji su sadržavali standarde) i ploča je

inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, bazeni su ispirani četiri puta sa po 400 μL puferovanog rastvora za ispiranje i dodavano je po 100 μL anti-IL-12p70 At konjugovanog biotinom. Nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi, bazeni su ispirani (na prethodno opisan način) i dodavano je po 100 μL peroksidaze konjugovane streptavidinom i inkubacija je nastavljena još 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije i ispiranja nastavljena je inkubacija u prisustvu 100 μL supstrata još 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, a nakon toga reakcija je zaustavljena dodavanjem po 100 μL rastvora za zaustavljanje reakcije i intenzitet boje je izmeren na spektrofotometru na 450 nm. Konstruisanje standardne krive i izračunavanje koncentracije citokina u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano, uz napomenu da je najveća koncentracija standarda od koje su pravljena dvostruka opadajuća razblaženja bila 500 pg/ml. Minimalna koncentracija IL-12p70 koja se može detektovati ovim testom je manja od 2.5 pg/ml.

3.9.4. IL-6

Za određivanje koncentracije IL-6 korišćen je komercijalni Legend maxTM rat IL-6 ELISA Kit prema uputstvu proizvođača. Kit je sadržavao: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena obloženih At specifičnim za pacovski IL-6, At specifično za pacovski IL-6 konjugovano biotinom, avidin-HRP, rastvor supstrata, pacovski IL-6 poznate koncentracije koji je korišćen kao standard, rastvor za zaustavljanje reakcije, komercijalni rastvarač za standard i uzorke i puferovani rastvor za ispiranje bazena.

Pre nanošenja uzoraka i standarda, bazeni ploče su najpre isprani četiri puta sa po 300 μL pufera za ispiranje i nakon toga u njih dodavano po 50 μL rastvarača za standard i uzorke i ista zapremina uzorka ili standarda po unapred pripremljenoj šemi. Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, bazeni su isprani kao i u prvom koraku i dodavano je po 100 μL anti-IL-6 At obeleženog biotinom. Nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi uz mešanje, bazeni su ponovo na isti način isprani i uzorci i standardi su inkubirani sa po 100 μL avidin-HRP-a. Posle 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi i ponovnog ispiranja, dodavano je po 100 μL rastvora supstrata i posle 10 minuta inkubacije u mraku, reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 μL rastvora za zaustavljanje reakcije. Intenzitet boje je meren na spektrofotometru na 450 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije IL-6 u uzorcima je rađeno

na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljena opadajuća dvostruka razblaženja bila je 1200 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-6 koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 5.3 pg/ml.

3.9.5. IL-23

Koncentracija IL-23 je određivana komercijalnim ELISA kitom, prema uputstvu proizvođača. Kit se sastojao od: mikrotitracione ploče sa 96 bazena koji su obloženi At specifičnim za pacovski IL-23, At specifičnog za pacovski IL-23 konjugovanog biotinom (reagens za detekciju A), avidina konjugovanog peroksidazom rena (reagens za detekciju B), H₂O₂ i TMB supstrata, standarda (rekombinantni IL-23), komercijalnog rastvarača za rekonstituisanje standarda, rastvora za zaustavljanje reakcije, komercijalnog rastvarača eseja A, komercijalnog rastvarača eseja B (*engl.* Assay Diluent) i puferovanog rastvora za ispiranje.

U bazene mikrotitracione ploče dodavano je 100 µL standarda ili supernatanta, koji su inkubirani 2 h na 37 °C. Nakon isteka inkubacije, uklonjen je sadržaj bazena i u njih je dodavano po 100 µL reagensa za detekciju A (razblaženog 1:1000) i nastavljena je inkubacija na 37 °C u trajanju od 1 h. Nakon toga, bazeni su ispirani tri puta sa po 350 µL puferovanog rastvora za ispiranje i dodavano je po 100 µL reagensa za detekciju B (razblaženog 1:1000). Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, bazeni su ispirani pet puta na prethodno opisan način i dodavano je po 90 µL rastvora supstrata. Inkubacija je nastavljena na istoj temperaturi u mraku i trajala je od 15 do 25 minuta. Razvoj boje je zaustavljan dodavanjem 50 µL rastvor za zaustavljanje reakcije i intenzitet je meren na spektrofotometru na 450 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije IL-23 u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljena opadajuća dvostruka razblaženja bila je 1000 pg/ml, dok je minimalna koncentracija IL-23 koja se može detektovati ovim testom manja od 6.2 pg/ml.

3.9.6. TGF-β1

Za određivanje koncentracije TGF-β1 korišćen je komercijalni Quantikine[®] ELISA kit za mišiji/pacovski/svinjski/mačiji TGF-β1, a prema uputstvu proizvođača. Kit je sadržao: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena obloženih mAt specifičnim za TGF-

$\beta 1$, poliklonsko At specifično za TGF- $\beta 1$ konjugovano peroksidazom rena, komercijalni rastvarači (assay diluent i calibrator diluent), rekombinantni TGF- $\beta 1$ poznate koncentracije koji je korišćen kao standard, komponenta supstrata A (*engl.* Color Reagent A), komponenta supstrata B (*engl.* Color Reagent B), rastvor za zaustavljanje reakcije i puferovani rastvor za ispiranje.

Pre izvođenja testa, da bi se latentni TGF- $\beta 1$ preveo u imunoaktivni oblik 100 μL uzorka je pomešano sa 20 μL 1N HCl i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su neutralisani dodavanjem 20 μL 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES i dalje korišćeni u testu za određivanje koncentracije TGF- $\beta 1$. Standardi nisu prolazili proceduru aktivacije.

U bazene mikrotitracione ploče dodavano je prvo po 50 μL komercijalnog rastvarača i po 50 μL standarda ili supernatanta. Nakon 2 h inkubacije, bazeni su ispirani četiri puta sa po 400 μL puferovanog rastvora za ispiranje i dodavano je po 100 μL anti-TGF- $\beta 1$ At konjugovanog enzima. Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi, zatim su bazeni ispirani kao što je prethodno opisano i dodavano je 100 μL rastvora supstrata koji je dobijen mešanjem komponente supstrata A i B u jednakim zapreminama. Inkubacija sa supstratom je trajala 30 min na sobnoj temperaturi i u mraku i po isteku tog vremena, reakcija je zaustavljena i intenzitet boje je meren na spektrofotometru na 450 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije TGF- $\beta 1$ u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljeni opadajuća dvostruka razblaženja bila je 1000 pg/ml. Minimalna koncentracija TGF- $\beta 1$ koja se može detektovati ovim testom je 4.6 pg/ml.

3.9.7. IFN- γ

ELISA test za određivanje koncentracije IFN- γ nije bio komercijalni već su sve komponente kupljene pojedinačno. U ELISA su korišćeni: At specifično za pacovski IFN- γ (klon DB1), poliklonsko At specifično za pacovski IFN- γ konjugovano biotinom, rekombinantni pacovski IFN- γ , ekstravidin-peroksidaza i OPD.

Bazeni mikrotitracione ploče (Nunc MaxisorpTM) su oblagani sa 50 μL anti-IFN- γ At (koncentracije 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jedan dan ranije pre izvođenja ELISA testa. Ploča je pokrivena adhezivnim filmom i ostavljena preko noći na +4 °C. Nakon prekonocne

inkubacije, sadržaj bazena je odlivan, i u svaki bazen je dodavano po 200 μL rastvora PBS koji je sadržao 1% BSA i nastavljena je inkubacija u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije, bazeni su ispirani tri puta sa po 200 μL PBS/0.05% Tween 20 i dodavano je po 50 μL standarda ili uzorka. Standardi i uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim su bazeni ispirani kao što je prethodno opisano. Nakon toga, dodavano je po 50 μL anti-IFN γ At konjugovanog biotinom (koncentracije 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i ploče su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi. Posle još jednog ciklusa ispiranja bazena dodavano je po 50 μL ekstravidin peroksidaze razblažene 1:1000 u PBS/1% BSA. Posle 1 sata i ispiranja, inkubacija sa supstratom (50 μL H $_2$ O $_2$ + OPD) je trajala oko 15 minuta što je dovoljno da se razvije boja. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem 4 N H $_2$ SO $_4$ i intenzitet boje je meren na 492 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije IFN γ u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljeni opadajuća dvostruka razblaženja bila je 1000 pg/ml. Srednja minimalna koncentracija IFN- γ koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 5.6 pg/ml.

3.9.8. IL-17A

Za određivanje koncentracije IL-17A korišćen je komercijalni kit prema uputstvu proizvođača. Kit je sadržao: mikrotitracione ploče sa 96 bazena (Nunc MaxisorpTM), jedno At za oblaganje ploče specifično za pacovski IL-17A i drugo At specifično za pacovski IL-17A za detekciju antigena konjugovano biotinom, avidin-HRP, rastvor supstrata (TMB), pacovski IL-17A poznate koncentracije koji korišćen kao standard, puferovani rastvor za oblaganje ploče i komercijalni rastvarač za standard i uzorke.

Oblaganje bazena ploče specifičnim At je obavljano 16-18 h pre izvođenja testa i to tako što je po 100 μL razblaženog anti-IL-17A At (razblaženog 1:200) naliveno u bazene mikrotitracione ploče, koja je pokrivena adhezivnim filmom i ostavljena preko noći na +4 °C. Sledećeg dana bazeni su ispirani četiri puta sa po 300 μL pufera za ispiranje (PBS/0.05% Tween 20), dodavano je po 200 μL komercijalnog rastvarača za standard i nastavljena je inkubacija 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon ispiranja, u bazene je dodavano po 100 μL standarda ili supernatanta i nastavljena je inkubacija 2 h, a posle isteka ovog vremena i ispiranja bazena nastavljena je još jedna

inkubacija od 1 sat sa anti-IL-17A At konjugovano biotinom (100 μ L, 1:200 razblaženo). Po isteku tog vremena bazeni su ispirani i u njih je dodavano po 100 μ L avidin-HRP (razblaženog 1:1000). Inkubacija sa avidin-HRP je trajala 30 minuta, a posle ispiranja, u bazene je dodavan supstrat i razvijanje boje je trajalo 15 minuta u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem po 100 μ L 2 N H₂SO₄ i intenzitet boje je meren na spektrofotometru na 450 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije IFN γ u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljena opadajuća dvostruka razblaženja bila je 1000 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-17A koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 8 pg/ml.

3.9.9. IL-4

Koncentracija IL-4 je određivana komercijalnim ELISA kitom, prema uputstvu proizvođača. Kit je sadržao: jedno mAt specifično za pacovski IL-4 za oblaganje ploče (koncentracija 100 μ g/ml) i drugo mAt specifično za pacovski IL-4 za detekciju antigena konjugovano biotinom, streptavidin-HRP, pacovski IL-4 poznate koncentracije koji je korišćen kao standard, komercijalni rastvarač za standard i uzorke.

Oblaganje bazena mikrotitracione ploče (Nunc MaxisoprTM) specifičnim At je obavljano dan pre izvođenja testa. U bazene ploče je nalivano po 100 μ L odgovarajućeg mAt (koncentracije 1 μ g/ml), ploča je pokrivena adhezivnim filmom i inkubirana na +4 °C preko noći. Sledećeg dana, bazeni su ispirani jednom sa 400 μ L pufera za ispiranje (PBS/0.05% Tween 20), a zatim je dodavano po 250 μ L Assay Buffer-a (PBS/0.5% BSA/0.05% Tween 20) u bazene i ploča je inkubirana još 2 h na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, bazeni su isprani dva puta sa 400 μ L pufera za ispiranje i u bazene je dodavano po 100 μ L standarda i po 100 μ L supernatanta koji je duplo razblažen u rastvaraču za uzorke. U sve bazene je dodavano i po 50 μ L anti-IL-4 mAt konjugovanog biotinom (razblaženo 1:1000 u Assay Buffer-u) i sve je inkubirano 2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Po isteku inkubacije, bazeni su isprani tri puta sa 400 μ L pufera za ispiranje i u bazene je dodavano 100 μ L streptavidin-HRP (razblažen 1:10000 u Assay Buffer-u). Posle inkubacije (1 sat, na sobnoj temperaturi uz mešanje) i ispiranja (tri puta sa 400 μ L pufera za ispiranje), dodavano je 100 μ L rastvora supstrata (H₂O₂ + OPD) i inkubacija je nastavljena još 10 minuta u mraku. Reakcija je zaustavljena

dodavanjem 100 μL 2 N H_2SO_4 i intenzitet boje je meren na spektrofotometru na 492 nm. Pravljenje standardne krive i izračunavanje koncentracije IL-4 u uzorcima je rađeno na isti način kao što je već prethodno opisano. Najveća koncentracija standarda od koje su pravljena opadajuća dvostruka razblaženja bila je 100 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-4 koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 0.2 pg/ml.

3.10. INDUKCIJA I RAZVOJ EKSPREMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA

3.10.1. Indukcija EAE-a

U cilju indukcije EAE-a pacovi oba uzrasta AO i DA soja su imunizovani pastom dobijenom mešanjem homogenata kičmene moždine pacova i CFA. Kičmena moždina (1g) je najpre usitnjena i homogenizovana u 2.5 ml fiziološkog rastova u homogenizeru. Nakon toga je od homogenata kičmene moždine i jednake količine CFA pravljena pasta odgovarajuće gustine. Životinjama je u zadnju desnu šapicu plantarno, intradermalno ubrizgavano 100 μL paste, a dorzalno, subkutano 250 μL rastvora u kome se nalazilo 5×10^8 *Bordetella-e pertussis*.

3.10.2. Razvoj EAE-a

Životinje su pregledane svakog dana, počev od sedmog dana nakon imunizacije i razvoj bolesti je procenjivan na osnovu promene telesne težine životinja i težine kliničke slike. Klinička slika je procenjivana ocenjivanjem (skorovanjem), na sledeći način: 0, odsustvo znakova bolesti; 0.5, delimični gubitak tonusa repa; 1, gubitak tonusa repa; 2, slabost (pareza) zadnjih ekstremiteta; 3, oduzetost (paraliza) zadnjih ekstremiteta; 4, paraliza zadnjih i prednjih ekstremiteta (kvadriplegija), praćena inkontinencijom i defekacijom.

3.11. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška (*engl.* standard error of the mean, S.E.M.). Statistička značajnost starošću uslovljenih promena u zastupljenosti subpopulacija i 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 uz pomoć statističkog kompjuterskog programa SPSS for Windows 16.0. i GraphPad Prism v 5.0. P vrednost <0.05 je smatrana statistički značajnom.

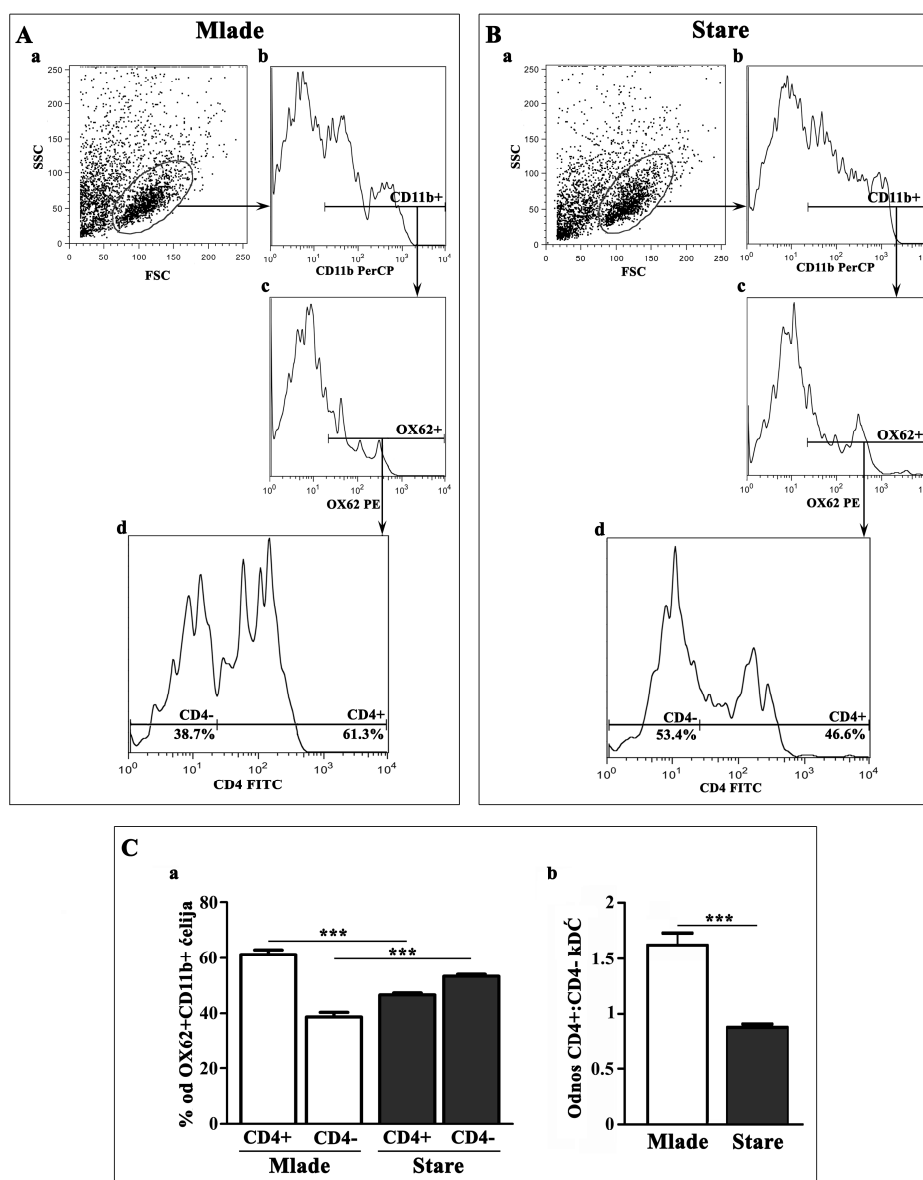
4. REZULTATI

4.1. UTICAJ STARENJA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE SVEŽE IZOLOVANIH SLEZINSKIH kDĆ PACOVA AO I DA SOJA

4.1.1. Uticaj starenja na zastupljenost različitih subpopulacija kDĆ

Prema podacima iz dostupne literature, populacija kDĆ (OX62+CD11b+MHC II+) je heterogena i obuhvata bar dve morfološki, fenotipski i funkcijski različite subpopulacije, koje se u pacova mogu identifikovati na osnovu prisustva tj. odsustva površinskog CD4 molekula (CD4+ i CD4- kDĆ) (Voisine i sar., 2002; Yrlid i Macpherson, 2003; Hubert i sar., 2004). Zastupljenost CD4+ i CD4- subpopulacija kDĆ određivana je u frakciji sveže izolovanih ćelija slezine niske gustine. Usled tehničkih ograničenja protočnog citometra nije bilo moguće uraditi četvorokolorno bojenje ćelija (OX62/CD11b/MHC II/CD4), a imajući u vidu da je pokazano da preko 98% sveže izolovanih OX62+ ćelija ispoljava MHC molekule II klase, ispoljenost CD4 molekula u cilju razdvajanja dve glavne subpopulacije kDĆ je određivana na OX62+CD11b+ ćelijama.

Kod mladih pacova **AO soja** nađena je veća zastupljenost CD4+ subpopulacije u okviru sveže izolovanih slezinskih kDĆ, dok je sa starenjem došlo do promene odnosa ove dve subpopulacije unutar kDĆ. Naime, u starih životinja nađeno je značajno povećanje ($p < 0.001$) relativne zastupljenosti CD4- ćelija i smanjenje ($p < 0.001$) CD4+ ćelija u okviru populacije kDĆ u poređenju sa mladim životinjama (Slika 1). Rezultat ovakvih promena je smanjen ($p < 0.001$) CD4+/CD4- odnos subpopulacija u okviru kDĆ kod starih u poređenju sa mladim životinjama (Slika 1).

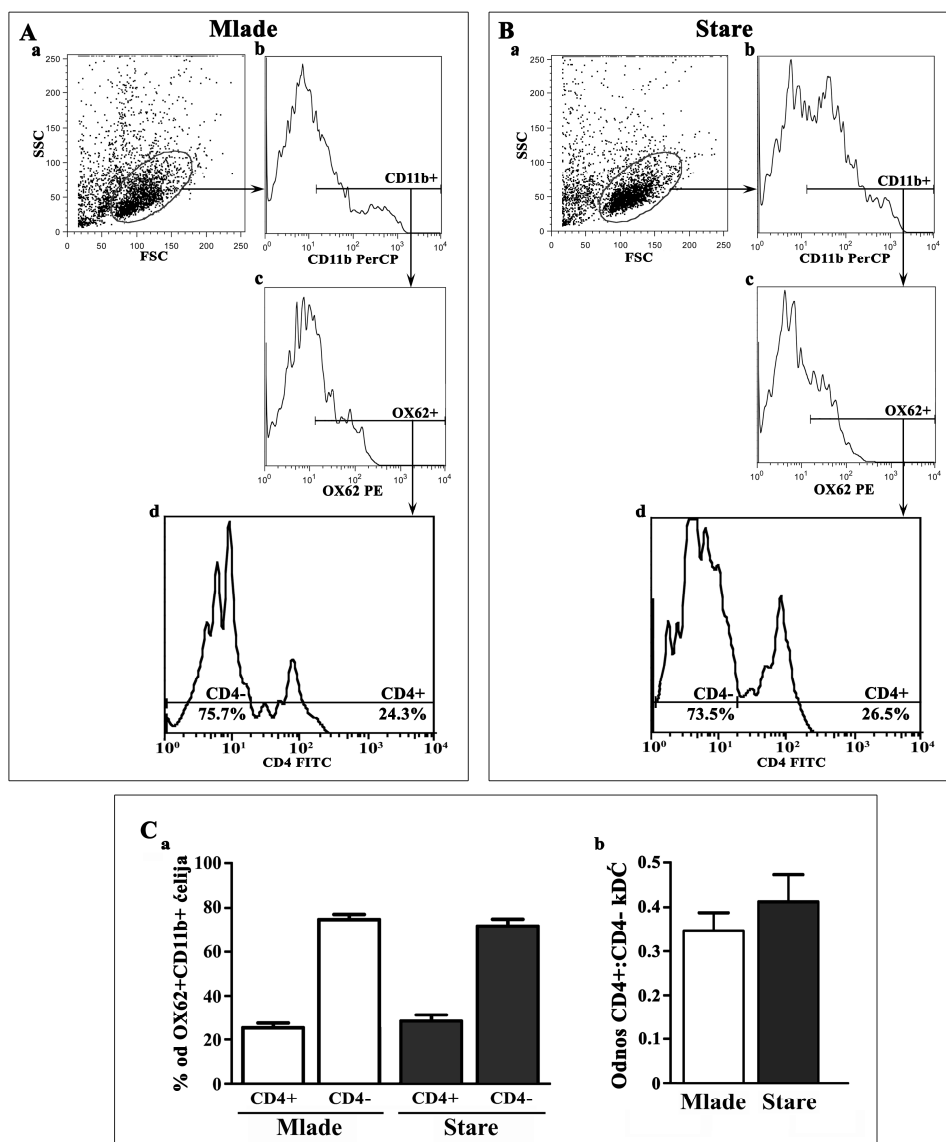


Slika 1. Uticaj starenja na zastupljenost CD4+ i CD4- subpopulacija u okviru sveže izolovanih slezinskih kDČ pacova AO soja.

Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ispoljenost (d) CD4 molekula na OX62+CD11b+ DČ izdvojenim iz frakcije ćelija slezine niske gustine (A) mladih i (B) starih pacova. Obogaćena populacija DČ izdvojena je iz (a) frakcije ćelija slezine niske gustine na osnovu veličine (FSC) i granularnosti (SSC) ćelija, kao što je prikazano na tačkastom protočno-citofluorometrijskom profilu, a potom su ćelije koje ispoljavaju (b) CD11b i (c) OX62 molekule izdvajane kao što je pokazano na protočno-citofluorometrijskim histogramima.

(C) Stubičasti histogrami predstavljaju (a) procenat i (b) odnos CD4+ i CD4- ćelija u populaciji slezinskih CD11b+OX62+ DČ mladih i starih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); *** $p < 0.001$.

Kod oba ispitivana uzrasta pacova **DA soja**, CD4⁻ subpopulacija ćelija je bila dominantna unutar populacije slezinskih kDĆ, tako da starenje kod ovog soja nije uticalo na odnos CD4⁺ i CD4⁻ subpopulacije u okviru sveže izolovanih slezinskih kDĆ (Slika 2).



Slika 2. Uticaj starenja na zastupljenost CD4+ i CD4- subpopulacija u okviru sveže izolovanih slezinskih kDĆ pacova DA soja.

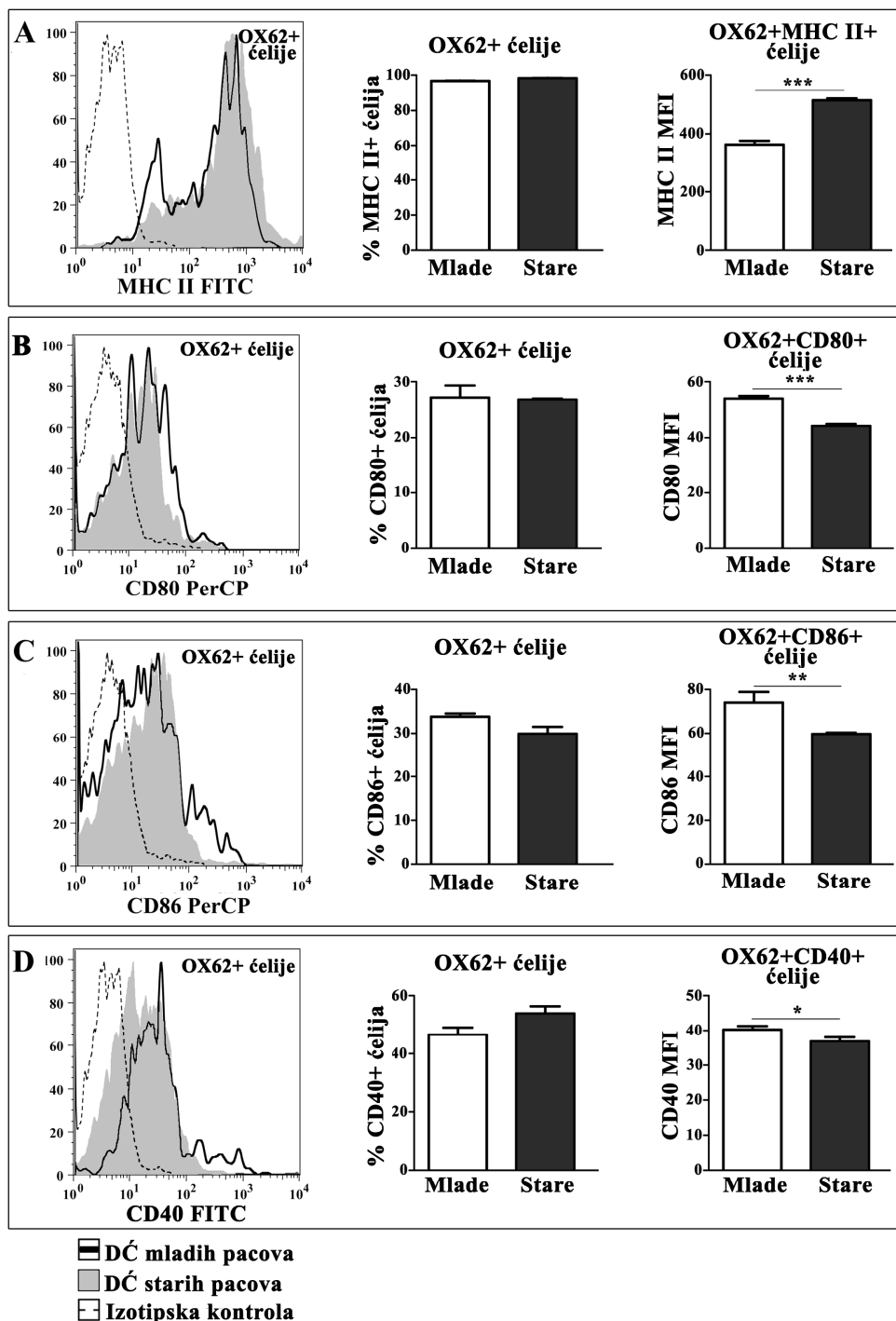
Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ispoljenost (d) CD4 molekula na OX62+CD11b+ DĆ izdvojenim iz frakcije ćelija slezine niske gustine (A) mladih i (B) starih pacova. Obogaćena populacija DĆ izdvojena je iz (a) frakcije ćelija slezine niske gustine na osnovu veličine (FSC) i granularnosti (SSC) ćelija, kao što je prikazano na tačkastom protočno-citofluorometrijskom profilu, a potom su ćelije koje ispoljavaju (b) CD11b i (c) OX62 molekule izdvajane kao što je pokazano na protočno-citofluorometrijskim histogramima.

(C) Stubičasti histogrami predstavljaju (a) procenat i (b) odnos CD4+ i CD4- ćelija u populaciji slezinskih CD11b+OX62+ DĆ mladih i starih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$).

4.1.2. Uticaj starenja na ispoljenost antigen-prezentujućih i kostimulatornih molekula

U daljem radu, na sveže izolovanim slezinskim kDĆ mladih i starih pacova AO i DA soja, analizirana je ispoljenost površinskih molekula koji su važni markeri aktivaciono/maturacionog statusa ovih ćelija (Tan i O'Neill, 2005). Metodom protočne citofluorometrije ispitivana je ispoljenost antigen-prezentujućih (MHC II klase) i kostimulatornih (CD80, CD86 i CD40) molekula.

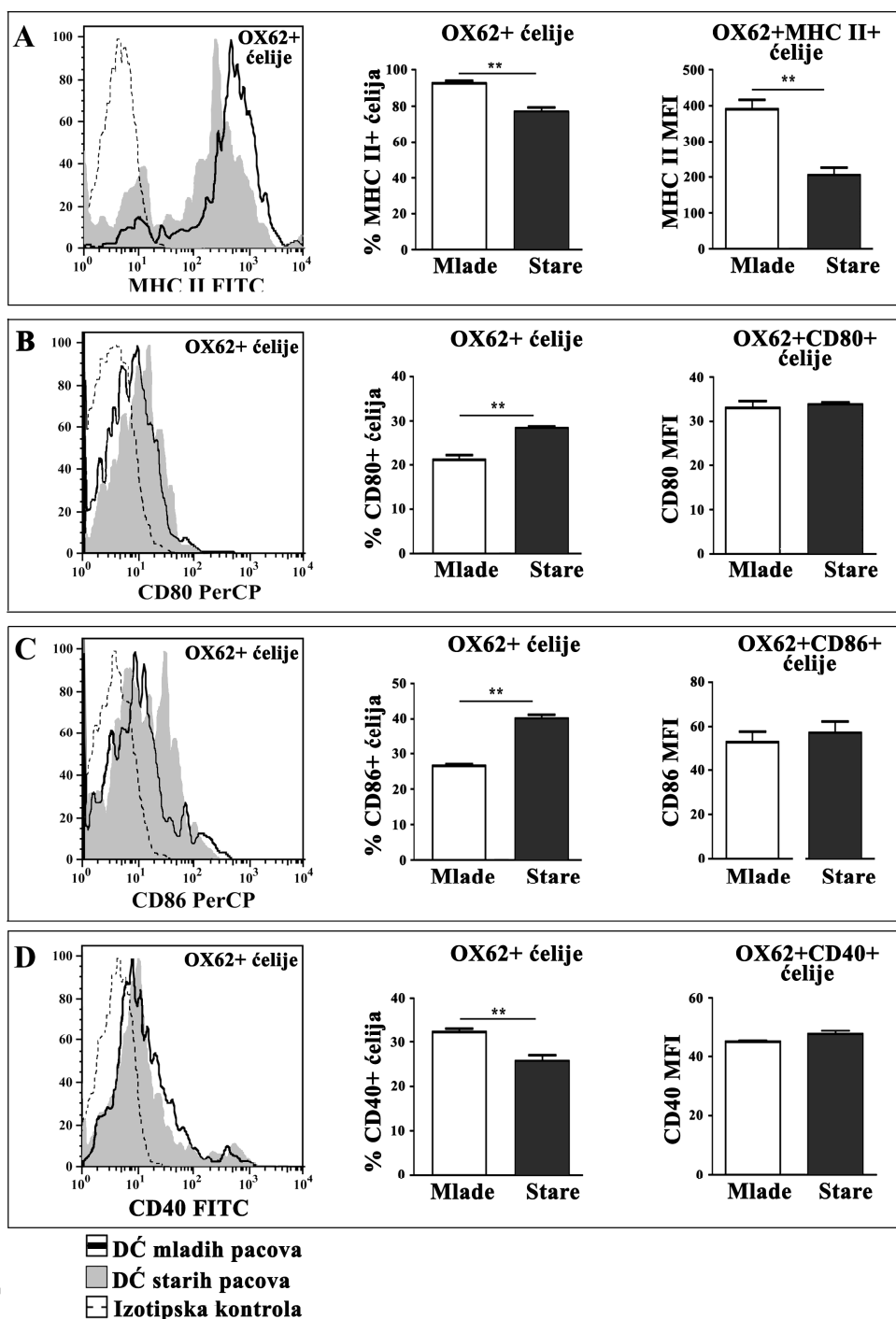
Rezultati pokazuju da su skoro sve (>98%) sveže izolovane kDĆ mladih životinja **AO soja** ispoljavale MHC molekule II klase, dok je oko 30% - 40% ćelija ispoljavalo kostimulatorne molekule (Slika 3). Sa starenjem nisu nađene razlike u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju MHC II i kostimulatorne molekule (Slika 3). Međutim, na kDĆ starih pacova nađena je značajno viša ($p < 0.001$) srednja površinska gustina MHC II molekula, dok je gustina ispoljenosti kostimulatornih molekula bila niža u poređenju sa ćelijama mladih životinja (Slika 3).



Slika 3. Uticaj starenja na ispoljenost antigen-prezentujućih i kostimulacionih molekula na sveže izolovanim slezinskim kDC pacova AO soja.

Preklopljeni reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ekspresiju (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na OX62+ DĆ u suspenziji ćelija slezine niske gustine mladih i starih pacova. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija u okviru populacije OX62+ DĆ i (desno) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DĆ mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Rezultati fenotipske analize ispoljenosti MHC II i kostimulatornih molekula na sveže izolovanih kDĆ mladih pacova **DA soja** pokazali su da preko 90% ćelija ispoljava antigen-prezentujuće i oko 30% ćelija kostimulatorne molekule (Slika 4). Kod DA pacova starenje je smanjilo ($p < 0.01$) procenat MHC II+ i CD40+ ćelija unutar populacije kDĆ u poređenju sa sveže izolovanim istim ćelijama mladih životinja. Takođe, MFI za MHC II je bio manji ($p < 0.01$) na MHC II+ kDĆ starih DA životinja u poređenju sa istim ćelijama mladih pacova. Sa druge strane, u okviru populacije sveže izolovanih kDĆ, starenje je dovelo do porasta ($p < 0.01$) procenta ćelija koje ispoljavaju CD80 i CD86 molekule (Slika 4).



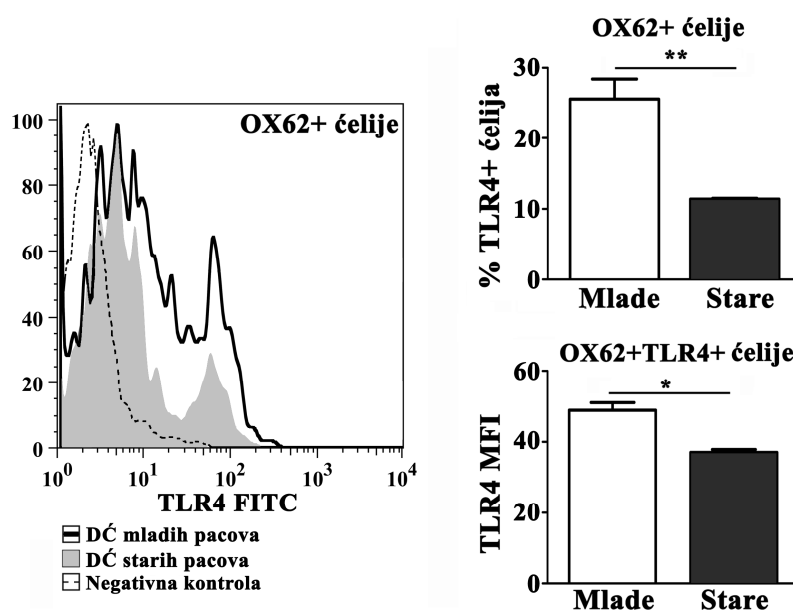
Slika 4. Uticaj starenja na ispoljenost antigen-prezentujućih i kostimulatornih molekula na sveže izolovanim slezinskim kDC pacova DA soja.

Preklapljeni reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ekspresiju (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na OX62+ DC u suspenziji ćelija slezine niske gustine mladih i starih pacova. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija u okviru populacije OX62+ DC i (desno) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DC mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); ** $p < 0.01$.

4.1.3. Uticaj starenja na ispoljenost TLR4 molekula

Na sveže izolovanim kDC mladih i starih pacova AO i DA soja određivana je i ispoljenost TLR4 molekula. Ovaj receptor vezuje LPS Gram-negativnih bakterija kao i neke endogene ligande oslobođene iz oštećenih ćelija i tkiva (Eissler i sar., 2011).

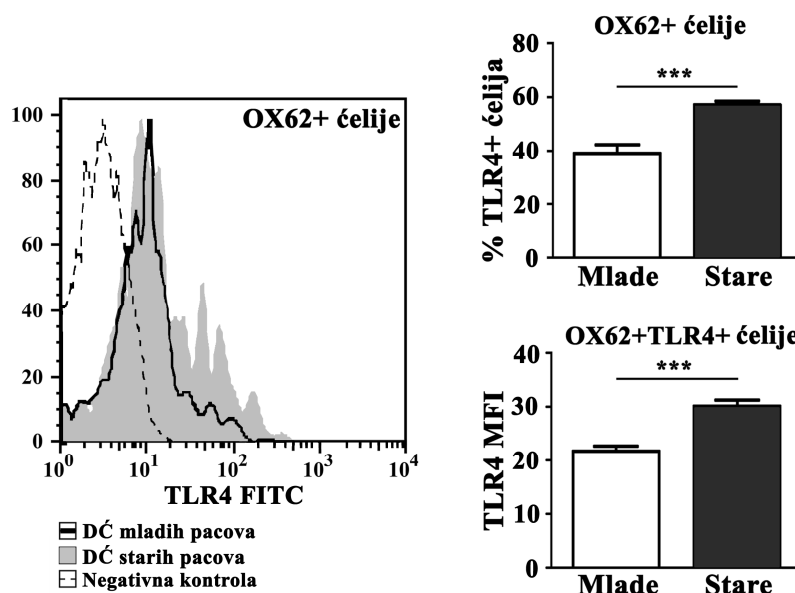
Analiza na protočnom citofluorometru pokazala je značajno smanjenje ($p < 0.01$) procentualne zastupljenosti sveže izolovanih kDC koje na svojoj površini ispoljavaju TLR4 kod starih pacova **AO soja** u poređenju sa istom populacijom kod mladih životinja. Pored procenta, starenje je smanjilo ($p < 0.05$) i površinsku gustinu TLR4 na istoj populaciji ćelija (Slika 5).



Slika 5. Uticaj starenja na ispoljenost TLR4 molekula na sveže izolovanim slezinskim kDC pacova AO soja.

Preklapljeni reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ekspresiju TLR4 molekula na OX62+ DČ u suspenziji ćelija slezine niske gustine mladih i starih pacova. Stubičasti histogrami prikazuju (gore) procenat TLR4+ ćelija u okviru populacije OX62+ DČ i (dole) srednji intenzitet fluorescencije (MFI) za TLR4 na TLR4+ slezinskim OX62+ DČ mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Za razliku od AO pacova, kod pacova **DA soja** sa starenjem raste ($p < 0.001$) i procenat kDĆ koje ispoljavaju TLR4, kao i MFI za TLR4 na tim ćelijama (Slika 6).



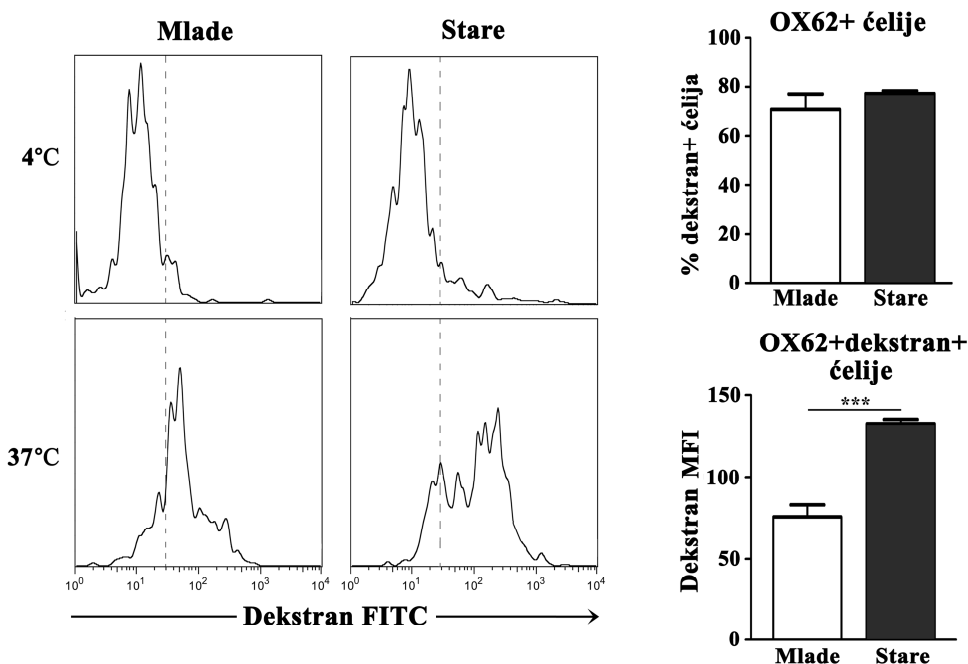
Slika 6. Uticaj starenja na ispoljenost TLR4 molekula na sveže izolovanim slezinskim kDĆ pacova DA soja.

Preklopljeni reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ekspresiju TLR4 molekula na OX62+ DĆ u suspenziji ćelija slezine niske gustine mladih i starih pacova. Stubičasti histogrami prikazuju (gore) procenat TLR4+ ćelija u okviru populacije OX62+ DĆ i (dole) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za TLR4 na TLR4+ slezinskim OX62+ DĆ mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); *** $p < 0.001$.

4.1.4. Uticaj starenja na endocitozni kapacitet

Endocitoza je, pored makropinocitoze i fagocitoze, jedan od procesa kojim DC preuzimaju antigene iz svoje okoline (Banchereau i Steinman, 1998). Ova funkcionalna osobina kDC je procenjivana na osnovu sposobnosti ovih ćelija da preuzimaju dekstran obeležen FITC-om upotrebom protočne citofluorometrije.

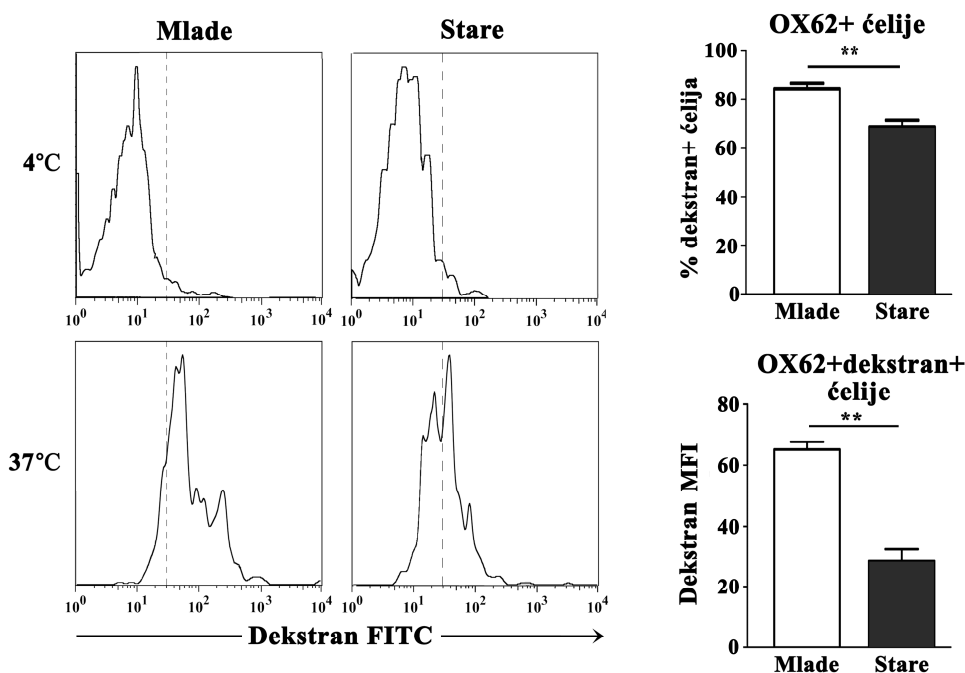
Konvencionalne DC starih životinja **AO soja** su pokazale veći kapacitet preuzimanja dekstrana u poređenju sa istim ćelijama mladih životinja. Naime, iako se procenat dekstran+ ćelija nije statistički značajno razlikovao, količina obeleženog dekstrana koju su endocitozom internalizovale kDC starih životinja, a što je procenjeno na osnovu MFI za dekstran u dekstran+ ćelijama, je bila značajno veća ($p < 0.001$) u poređenju sa ćelijama mladih životinja (Slika 7).



Slika 7. Uticaj starenja na endocitozu dekstrana od strane sveže izolovanih slezinskih kDC pacova AO soja.

(A) Preuzimanje dekstrana od strane OX62+ DC iz suspenzije ćelija slezine niske gustine (levo) mladih i (desno) starih pacova na (gore) +4 °C i (dole) +37 °C je prikazano na reprezentativnim protočnicitofluorometrijskim histogramima. (B) Stubičasti histogrami prikazuju (gore) procenat dekstran+ ćelija u okviru populacije OX62+ DC i (dole) srednji intenzitet fluorescencije (MFI) za dekstran u dekstran+ slezinskim OX62+ DC mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); *** $p < 0.001$.

Za razliku od AO pacova, kDĆ starih životinja **DA soja**, su pokazale smanjenu sposobnost preuzimanja dekstrana u odnosu na iste ćelije mladih životinja (Slika 8). Ovo je procenjeno na osnovu značajno manje ($p < 0.01$) i procentualne zastupljenosti dekstran+ kDĆ kod starih životinja i manjeg ($p < 0.05$) MFI za dekstran u dekstran+ ćelijama u odnosu na kDĆ mladih životinja istog soja (Slika 8).



Slika 8. Uticaj starenja na endocitozu dekstrana od strane sveže izolovanih slezinskih kDĆ pacova DA soja.

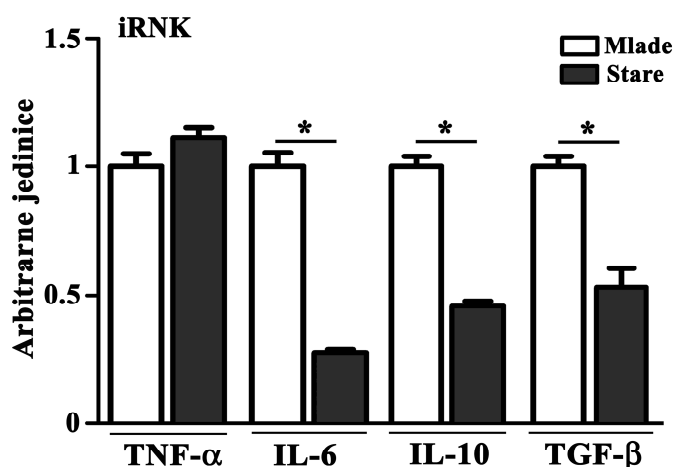
(A) Preuzimanje dekstrana od strane OX62+ DĆ iz suspenzije ćelija slezine niske gustine (levo) mladih i (desno) starih pacova na (gore) +4 °C i (dole) +37 °C je prikazano na reprezentativnim protočnocitofluorometrijskim histogramima. (B) Stubičasti histogrami prikazuju (gore) procenat dekstran+ ćelija u okviru populacije OX62+ DĆ i (dole) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za dekstran u dekstran+ slezinskim OX62+ DĆ mladih i starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); ** $p < 0.01$.

4.1.5. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine i TLR4

4.1.5.1. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u slezini

U cilju što boljeg sagledavanja citokinskog okruženja u kome se kDĆ starih pacova nalaze, a koje može da utiče na njihovu diferencijaciju i aktivaciju/sazrevanje, u slezini je analizovana ekspresija iRNK za TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β .

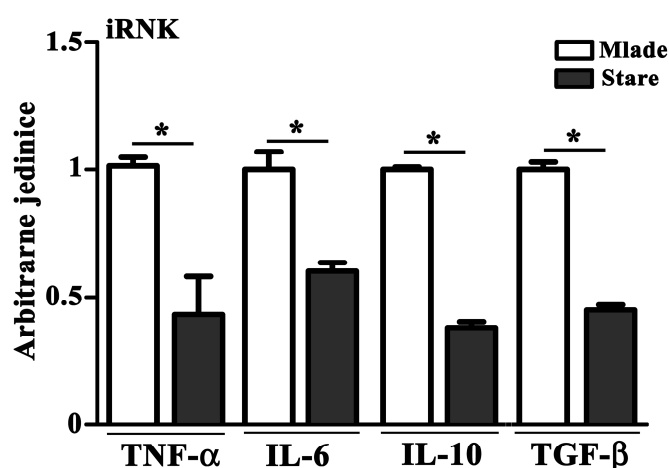
U slezini starih **AO pacova**, ekspresija iRNK za IL-6 je bila manja ($p < 0.05$), dok je ekspresija iRNK za TNF- α bila nepromenjena u poređenju sa slezinama mladih životinja (Slika 9). Takođe, starenje je uticalo i na značajno smanjenje ekspresije gena za IL-10 ($p < 0.05$) i TGF- β ($p < 0.05$) u slezinama AO pacova (Slika 9).



Slika 9. Uticaj starenja na ekspresiju gena za TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β u tkivu slezine AO pacova.

Histogram prikazuje promenu nivoa ekspresije iRNK za TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β u tkivu slezine starih pacova u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u tkivu slezine mladih pacova. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$.

Slično je dobijeno i analizom ekspresije gena za ove citokine u slezinama starih **DA pacova**. Naime, kod ovog soja je u slezinama starih životinja detektovano značajno sniženje iRNK i za $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0.05$), tako da je ekspresija iRNK za sve ispitivane citokine bila manja ($p < 0.05$) u slezini starih DA pacova nego mladih DA životinja (Slika 10).



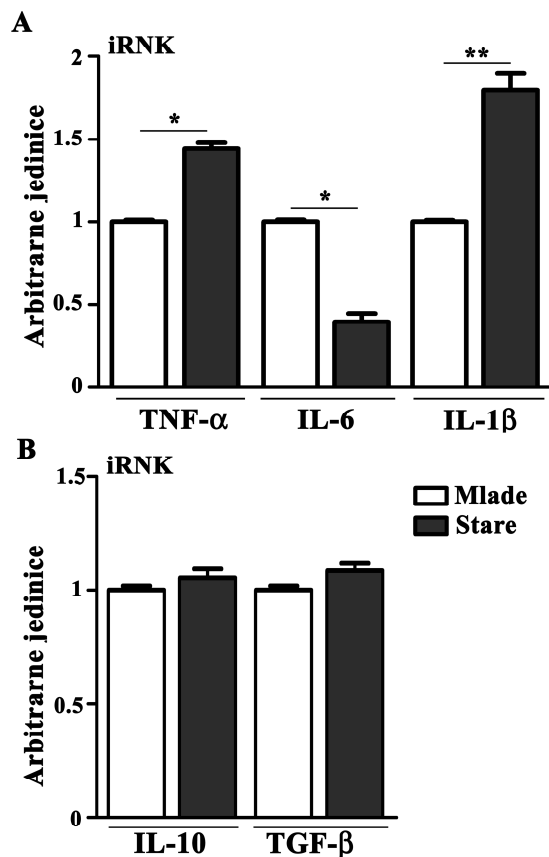
Slika 10. Uticaj starenja na ekspresiju gena za $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-10 i TGF- β u tkivu slezine DA pacova.

Histogram prikazuje promenu nivoa ekspresije iRNK za $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-10 i TGF- β u tkivu slezine starih pacova u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u tkivu slezine mladih pacova. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$

4.1.4.2. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine i TLR4 u kDĆ

Sveže izolovane kDĆ su, u normalnim fiziološkim uslovima, fenotipski i funkcijski nezrele i učestvuju u održavanju periferne tolerancije. Da bi se ispitalo da li starenje utiče na ovu važnu funkciju kDĆ određivana je ekspresija gena za glavne proinflamatorne/imunostimulatorne (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) i imunomodulatorne/imunosupresivne (IL-10 i TGF- β) citokine u imunomagnetno izdvojenim kDĆ.

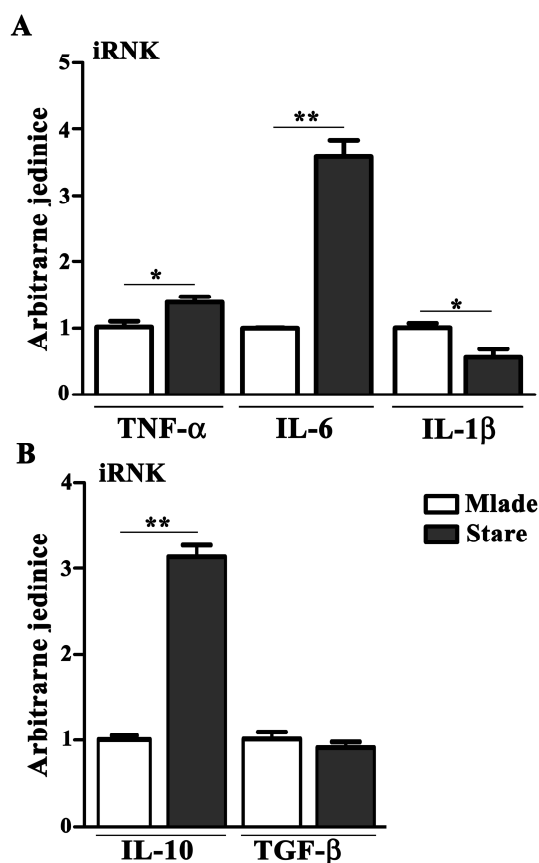
Kod kDĆ starih AO pacova nađena je veća ekspresija iRNK za TNF- α ($p < 0.05$) i IL-1 β ($p < 0.01$), a manja ($p < 0.05$) ekspresija iRNK za IL-6 u odnosu na kDĆ mladih životinja istog soja. Za razliku od ekspresije proinflamatornih citokina, starenje nije uticalo na ekspresiju gena za IL-10 i TGF- β u kDĆ starih u poređenju sa istim ćelijama mladih pacova (Slika 11).



Slika 11. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u sveže izolovanim slezinskim kDĆ AO pacova.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za (A) TNF- α , IL-6 i IL-1 β i (B) IL-10 i TGF- β u OX62+ DĆ starih pacova izolovanih primenom metode magnetnog razdvajanja u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u OX62+ DĆ mladih pacova dobijenih na isti način. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

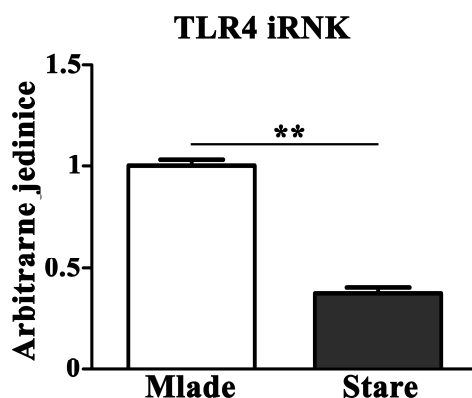
Starenje dovodi do promena u ekspresiji iRNK za citokine kod pacova **DA soja**, s tim što su te promene suprotne kada je u pitanju iRNK za IL-6 i IL-1 β . Starenje povećava ($p < 0.01$) ekspresiju iRNK za IL-6, a smanjuje ($p < 0.05$) ekspresiju iRNK za IL-1 β kod DA pacova. Analiza ekspresije gena za imunosupresivne citokine je pokazala da kDĆ starih životinja, u odnosu na iste ćelije mladih životinja, ekspimiraju značajno više ($p < 0.01$) iRNK za IL-10. Kao i kod AO pacova, ekspresija iRNK za TNF- α ($p < 0.05$) je bila veća, dok se ekspresija iRNK za TGF- β nije menjala u kDĆ starih u odnosu na kDĆ mladih pacova istog soja (Slika 12).



Slika 12. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u sveže izolovanim slezinskim kDĆ DA pacova.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za (A) TNF- α , IL-6 i IL-1 β i (B) IL-10 i TGF- β u OX62+ DĆ starih pacova izolovanih primenom metode magnetnog razdvajanja u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u OX62+ DĆ mladih pacova dobijenih na isti način. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola, Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Količina iRNK za TLR4 u kDC 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 kDC starih AO pacova (Slika 13), a povećalo je ($p < 0.01$) u istim ćelijama DA pacova (Slika 14).

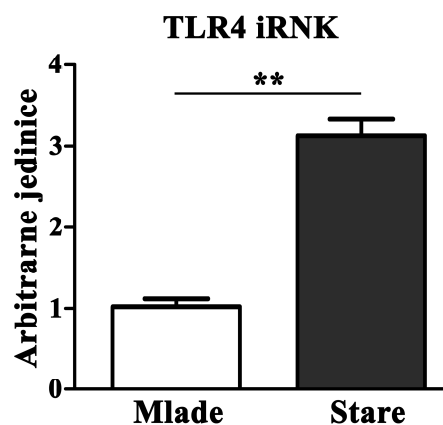


Slika 13. Uticaj starenja na ekspresiju gena za TLR4 u sveže izolovanim slezinskim kDC AO pacova.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za TLR4 u OX62+ DC starih pacova izolovanih primenom metode magnetnog razdvajanja u odnosu na ekspresiju iRNK za TLR4 u OX62+ DC mladih pacova. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola, Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); $**p < 0.01$.

Slika 14. Uticaj starenja na ekspresiju gena za TLR4 u sveže izolovanim slezinskim kDC DA pacova.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za TLR4 u OX62+ DC starih pacova izolovanih primenom metode magnetnog razdvajanja u odnosu na ekspresiju iRNK za TLR4 u OX62+ DC mladih pacova. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola, Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); $**p < 0.01$.



4.2. UTICAJ STARENJA NA SPOSOBNOST AKTIVACIJE/SAZREVANJA SLEZINSKIH kDĆ PACOVA AO I DA SOJA U KULTURI NAKON STIMULACIJE LPS-OM

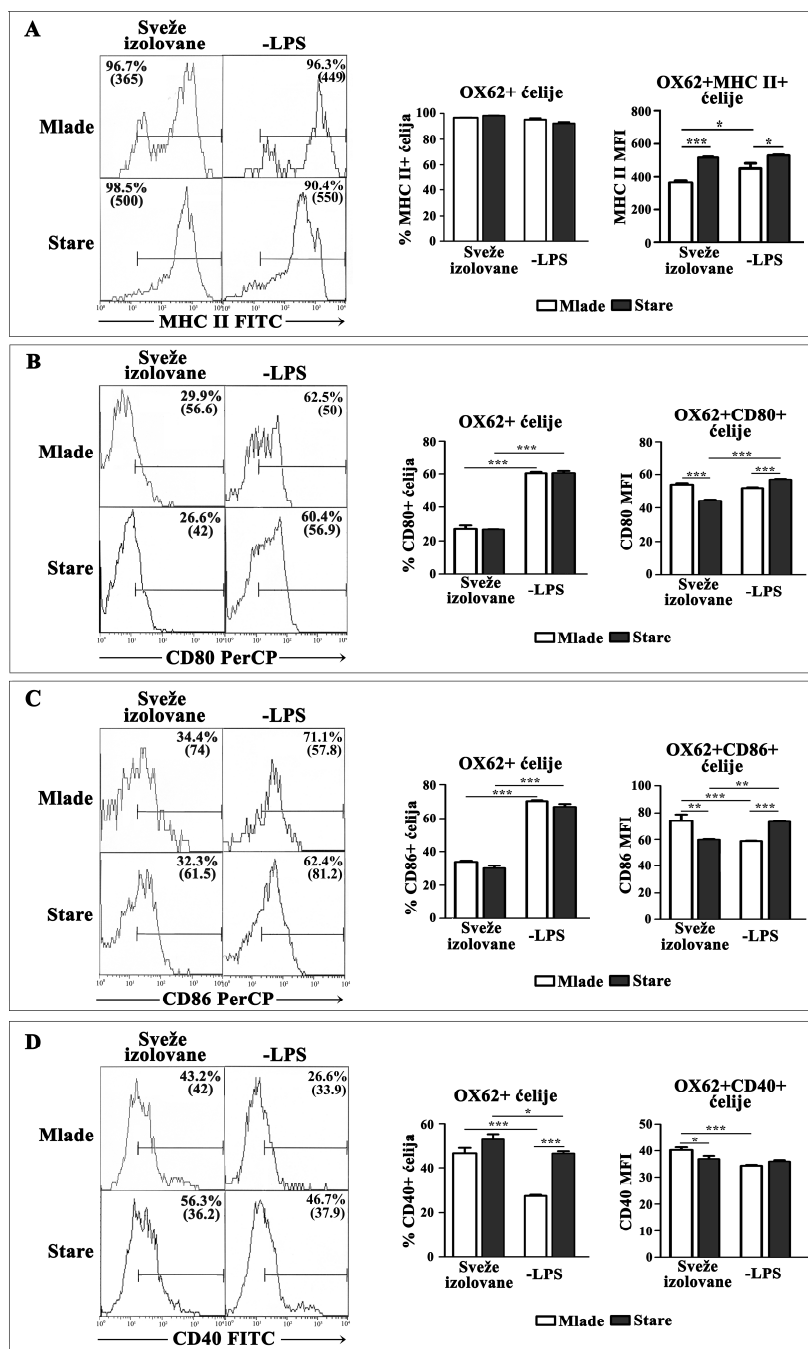
4.2.1. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDĆ iz kulture

4.2.1.1. „Spontana“ aktivacija u medijumu

Starenje nije uticalo na preživljavanje kDĆ AO pacova u kulturi. Nakon prekonodne kultivacije ovih ćelija u kompletnom medijumu u odsustvu LPS-a, u suspenziji kDĆ mladih pacova nađeno je $30.25\% \pm 1.05\%$ živih ćelija, a u suspenziji kDĆ starih pacova istog soja $31.01\% \pm 0.4\%$.

Prekonodna kultivacija sveže izolovanih kDĆ mladih i starih pacova **AO soja**, samo u kompletnom medijumu, dovela je do promene ispoljenosti antigenprezentujućih i kostimulatornih molekula na ovim ćelijama (Slika 15). Preciznije, nakon kultivacije u medijumu, procentualna zastupljenost kDĆ koje ispoljavaju CD86 i CD80 molekule je bila veća ($p < 0.001$) u obe starosne grupe u poređenju sa kontrolnim sveže izolovanim kDĆ pacova odgovarajuće starosti. Tokom kultivacije kDĆ mladih životinja, došlo je do smanjenja ($p < 0.001$) gustine CD86 molekula na CD86+ ćelijama, dok se gustina CD80 molekula nije menjala. Za razliku od kDĆ mladih pacova, kod kDĆ starih životinja, kultivacija je povećala gustinu ispoljenosti CD80 ($p < 0.001$) i CD86 ($p < 0.01$) molekula na ovim ćelijama u odnosu na sveže izolovane ćelije pacova istog uzrasta. Starenje i kultivacija su uticali i na procenat CD40+ kDĆ i na gustinu CD40 molekula na CD40+ ćelijama. Kod mladih životinja nađeno je smanjenje ($p < 0.001$) i procenta CD40+ kDĆ i gustine CD40 molekula, dok je kod kDĆ starih životinja detektovano samo smanjenje ($p < 0.05$) procenta ćelija koje ispoljavaju CD40 molekul u poređenju sa sveže izolovanim ćelijama istog uzrasta. Prekonodna kultivacija je uticala na povećanje ($p < 0.05$) MFI za MHC II na kDĆ samo mladih životinja. Međutim, ovo povećanje gustine ispoljenosti na ćelijama mladih životinja nije bio dovoljno da dosegne nivo ispoljenosti ovih molekula na ćelijama starih životinja, tako da je MFI za MHC II bio veći ($p < 0.05$) na kultivisanim kDĆ starih životinja u odnosu na isto tretirane ćelije mladih životinja. Poređenjem ekspresije i gustine kostimulatornih molekula na kDĆ oba uzrasta nakon kultivacije u medijumu nađena je veća ($p < 0.001$)

gustina ispoljenosti CD80 i CD86 markera na kDĆ, kao i veća ($p < 0.001$) procentualna zastupljenost CD40+ kDĆ u kulturama starih pacova u poređenju sa kulturama mladih životinja (Slika 15).



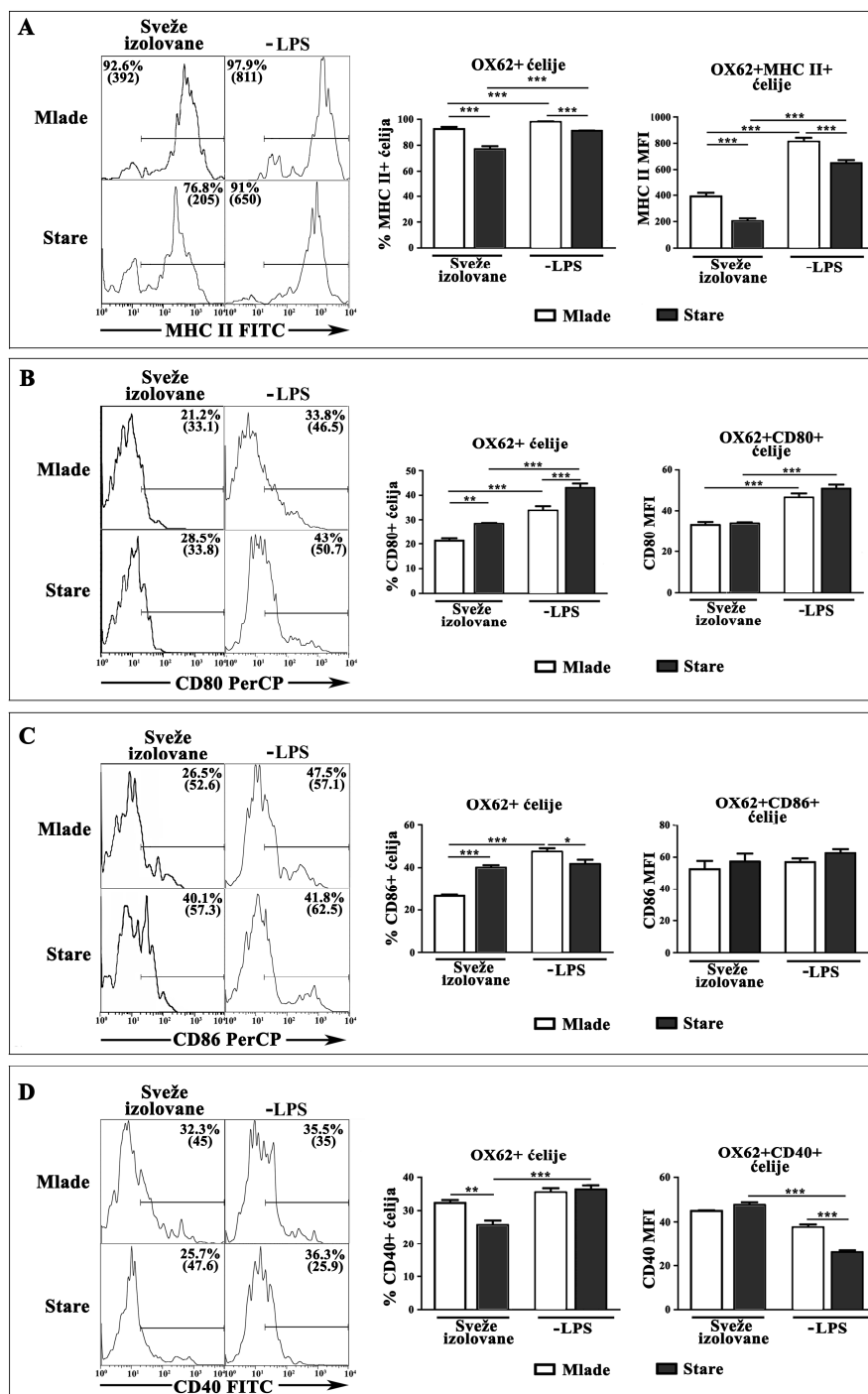
Slika 15. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDC AO pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS-a.

Reprezentativni protočno-citofluorometrijski prikazi ekspresije (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na slezinskim OX62+ DC (gore) mladih i (dole) starih pacova (levo) sveže izolovanim i (desno) gajenim u medijumu u odsustvu LPS-a (-LPS). Odgovarajuće vrednosti procenta pozitivnih ćelija i (u zagradi) srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) su prikazane u uglu svakog histograma. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija i (desno) srednji intenzitet fluorescencije (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DC mladim i starih pacova sveže izolovanim i gajenim u medijumu u odsustvu LPS-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Kao i kod AO pacova, starenje nije menjalo procentualnu zastupljenost živih ćelija u prekonoćnim kulturama kDĆ DA pacova gajenih u odsustvu LPS-a ($32.55\% \pm 1.95\%$ živih ćelija kod mladih u odnosu na $30.60\% \pm 1.70\%$ kod starih DA pacova).

Prekonoćna kultivacija kDĆ izolovanih iz slezina pacova **DA soja** povećala ($p < 0.001$) je i procentualnu zastupljenost MHC II+ i CD80+ ćelija kao i MFI za ove molekule na odgovarajućim pozitivnim ćelijama kod obe starosne grupe u odnosu na sveže izolovane ćelije životinja odgovarajeg uzrasta (Slika 16). Analizom ekspresije CD86 molekula nađen je povećan ($p < 0.001$) procenat CD86+ ćelija u okviru kDĆ mladih životinja gajenih u medijumu, dok se ekspresija ovog molekula na kDĆ starih životinja nije menjala, ako se poređenje vrši u odnosu na sveže izolovane ćelije životinja iste starosti. Sa druge strane, prekonoćna kultivacija nije imala uticaja na ispoljenost CD40 molekula na kDĆ mladih životinja, dok je kod kDĆ starih životinja došlo do povećanja ($p < 0.001$) procentualne zastupljenosti CD40+ ćelija, a smanjenja ($p < 0.001$) MFI za CD40, u odnosu na sveže izolovane ćelije istog uzrasta (Slika 16).

Poređenje fenotipskih karakteristika kDĆ mladih i starih pacova nakon kultivacije u medijumu pokazalo je nižu ($p < 0.05$) ekspresiju MHC II i CD86 molekula i manju ($p < 0.001$) gustinu ispoljenosti MHC II i CD40 molekula na kDĆ starih pacova u poređenju sa kultivisanim ćelijama mladih životinja. Od svih ispitivanih markera, jedino je ekspresija CD80 molekula bila veća ($p < 0.001$) na kultivisanim kDĆ starih životinja u odnosu na kultivisane ćelije mladih (Slika 16).



Slika 16. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDC DA pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS-a.

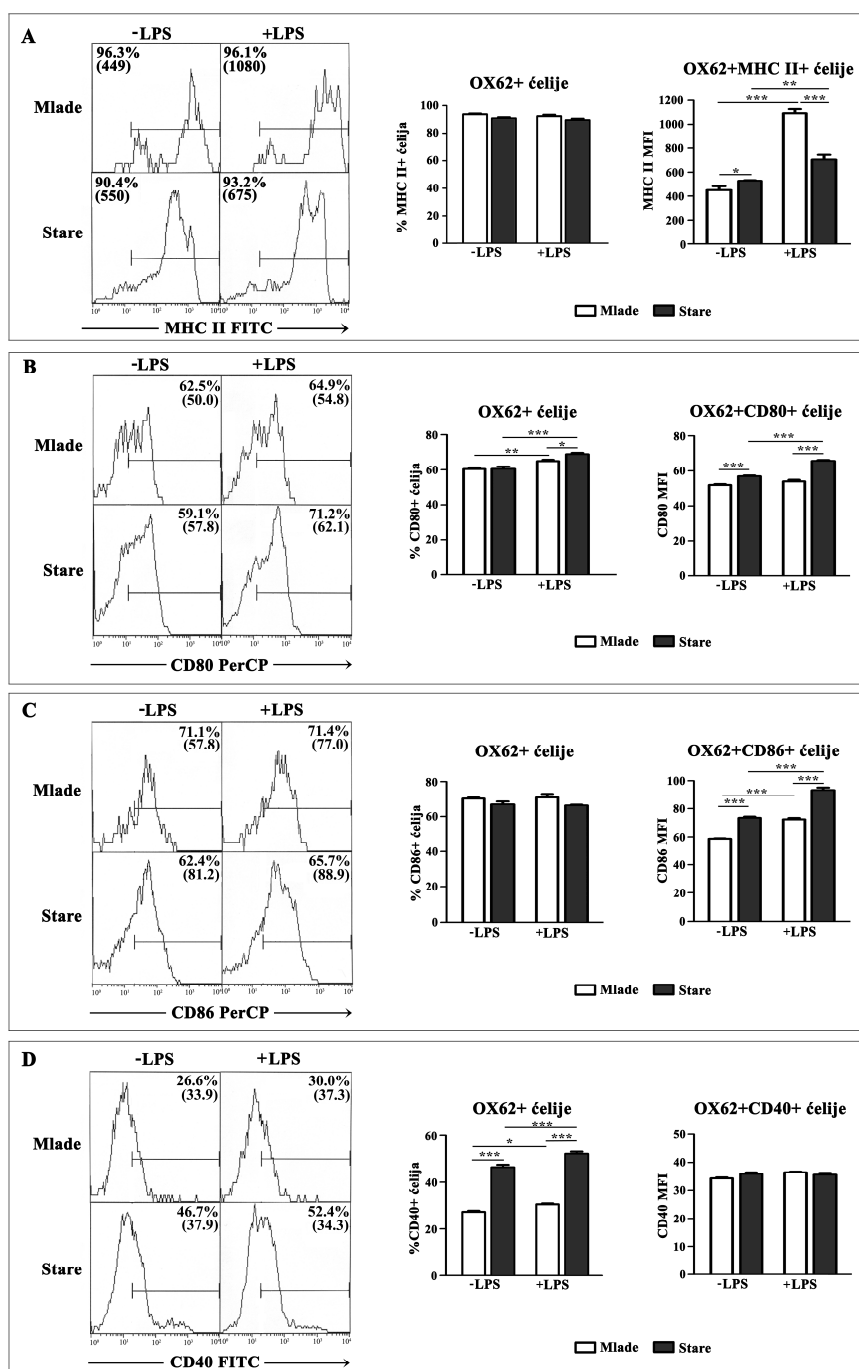
Reprezentativni protočno-citofluorometrijski prikazi ekspresije (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na slezinskim OX62+ DC (gore) mladih i (dole) starih pacova (levo) sveže izolovanim i (desno) gajenim u medijumu u odsustvu LPS-a (-LPS). Odgovarajuće vrednosti procenta pozitivnih ćelija i (u zagradi) srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) su prikazane u gornjem uglu svakog histograma. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija i (desno) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DC mladih i starih pacova sveže izolovanim i gajenim u medijumu u odsustvu LPS-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2.1.2. Aktivacija LPS-om

Prisustvo LPS-a u kulturama kDĆ AO pacova nije uticalo na preživljavanje ovih ćelija ($31.65\% \pm 0.38\%$ živih ćelija kod mladih u odnosu na $33.05\% \pm 0.5\%$ kod starih AO pacova). U okviru populacije živih kDĆ iz kulture odnos CD4+:CD4- subpopulacija je bio manji kod starih AO pacova ($0.53\% \pm 0.08\%$) u odnosu na odgovarajuću populaciju kod mladih životinja ($0.90\% \pm 0.1\%$). Naime, kao i kod sveže izolovanih, i u populaciji kultivisanih kDĆ starih AO pacova stimulisanih LPS-om zastupljenija je bila CD4- subpopulacija u odnosu na odgovarajuće ćelije mladih AO životinja.

Analiza fenotipskih karakteristika kDĆ mladih i starih **AO pacova** stimulisanih LPS-om, pokazala je statistički značajno povećanje procentualne zastupljenosti i/ili površinske gustine svih ispitivanih markera (MHC II, CD80, CD86 i CD40) u poređenju sa ćelijama iste uzrasne grupe koje su gajene u odsustvu ovog faktora aktivacije/sazrevanja (Slika 17). Preciznije, prisustvo LPS-a povećalo ($p < 0.01$) je procenat CD80+ ćelija u kulturama kDĆ i mladih i starih pacova u odnosu na kulture kDĆ u odsustvu LPS-a pacova odgovarajućeg uzrasta, dok je CD 80 MFI bio povećan samo na kDĆ starih pacova. Takođe, u prisustvu LPS-a, MFI za CD86 je bio povećan ($p < 0.001$) na kDĆ pacova oba uzrasta (Slika 17). Aktivacija LPS-om povećala je procentualnu zastupljenost i CD40+ ćelija u kDĆ kulturama pacova oba uzrasta u odnosu na kontrolne kDĆ kulture pacova odgovarajućeg uzrasta, dok nije menjala MFI za CD40. Značno povećanje gustine MHC molekula II klase na kDĆ nakon aktivacije LPS-om detektovano je u kulturama kDĆ oba uzrasta, ali je naročito bilo izraženo na kDĆ mladih pacova (Slika 17).

Poređenjem fenotipskih karakteristika kDĆ mladih i starih AO pacova nakon stimulacije LPS-om, nađena je manja ($p < 0.001$) površinska gustina MHC II i veća kostimulatornih molekula na kDĆ starih životinja u poređenju sa stimulisanim ćelijama mladih životinja (Slika 17).



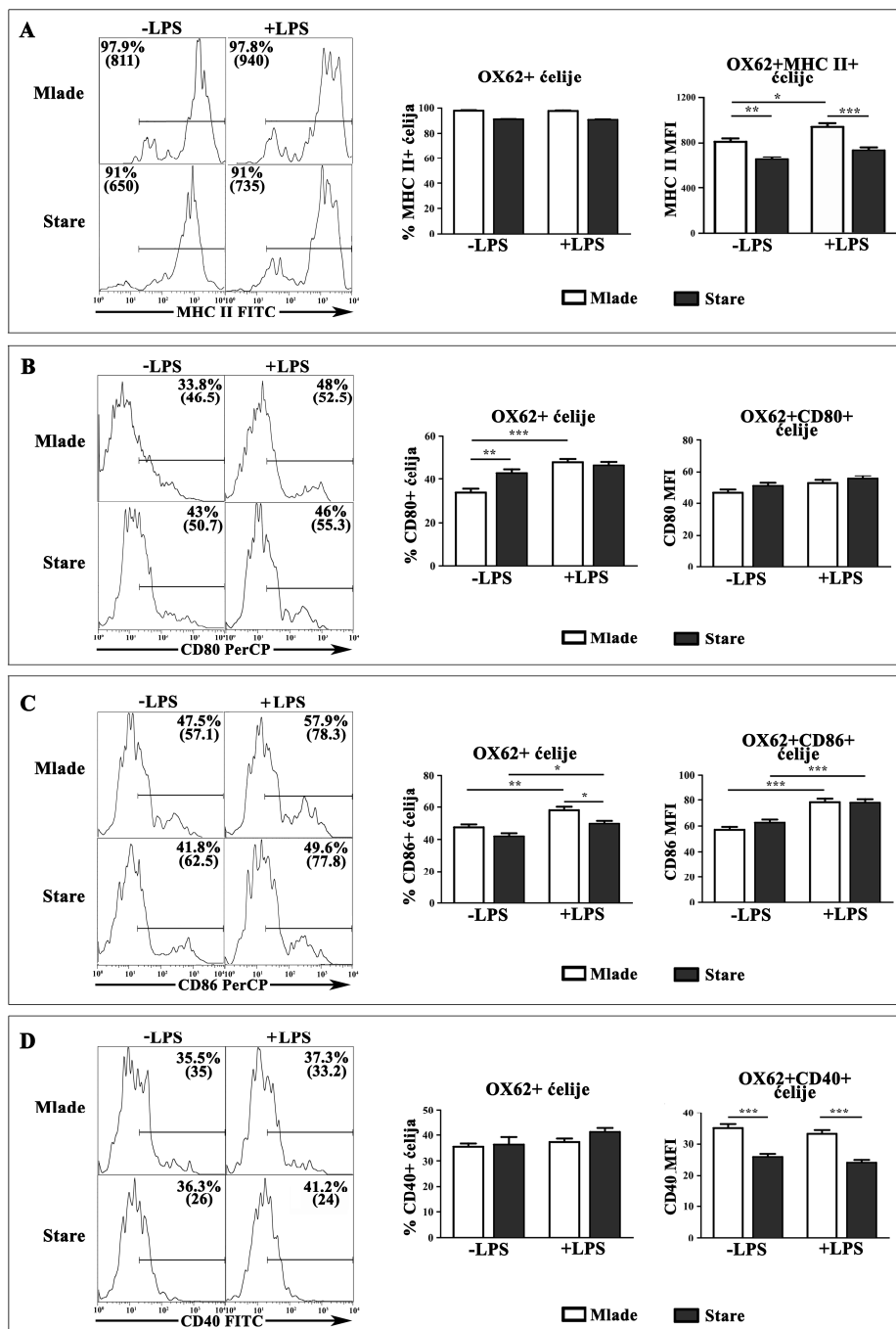
Slika 17. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDĆ AO pacova gajenih u medijumu u prisustvu LPS-a.

Reprezentativni protočno-citofluorometrijski prikazi ekspresije (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na slezinskim OX62+ DĆ (gore) mladih i (dole) starih pacova gajenih u medijumu u (levo) odsustvu (-LPS) i (desno) prisustvu LPS-a (+LPS). Odgovarajuće vrednosti procenta pozitivnih ćelija i (u zagradi) srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) su prikazane u gornjem uglu svakog histograma. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija i (desno) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu i prisustvu LPS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Prisustvo LPS-a ni u kulturama kDĆ DA pacova nije uticalo na preživljavanje ovih ćelija ($29.85 \pm 1.65\%$ živih ćelija kod mladih u odnosu na $32.85 \pm 2.15\%$ kod starih DA pacova). U populaciji živih kDĆ u kulturama oba uzrasta životinja ovog soja CD4⁻ subpopulacija je bila dominantna, a odnos CD4⁺:CD4⁻ subpopulacija se nije menjao i bio je sličan odnosu koji je nađen kod sveže izolovanih kDĆ ($0.34\% \pm 0.08\%$ kod starih u odnosu na $0.52\% \pm 0.13\%$ kod mladih).

Analiza uticaja LPS-a na fenotipske karakteristike kDĆ mladih **DA pacova** je pokazala povećanje ekspresije svih ispitivanih markera, osim CD40. U kultura kDĆ mladih pacova u prisustvu LPS-a nađena je veća ($p < 0.01$) procentualna zastupljenost CD80⁺ i CD86⁺ ćelija i veća ($p < 0.05$) gustina ispoljenosti CD86 i MHC II molekula na CD80⁺ i MHC II⁺ ćelijama u poređenju sa kulturama nestimulisanih kDĆ mladih životinja. 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 (Slika 18).

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 stimulisane LPS-om, u poređenju sa odgovarajućim kDĆ mladih životinja (Slika 18).



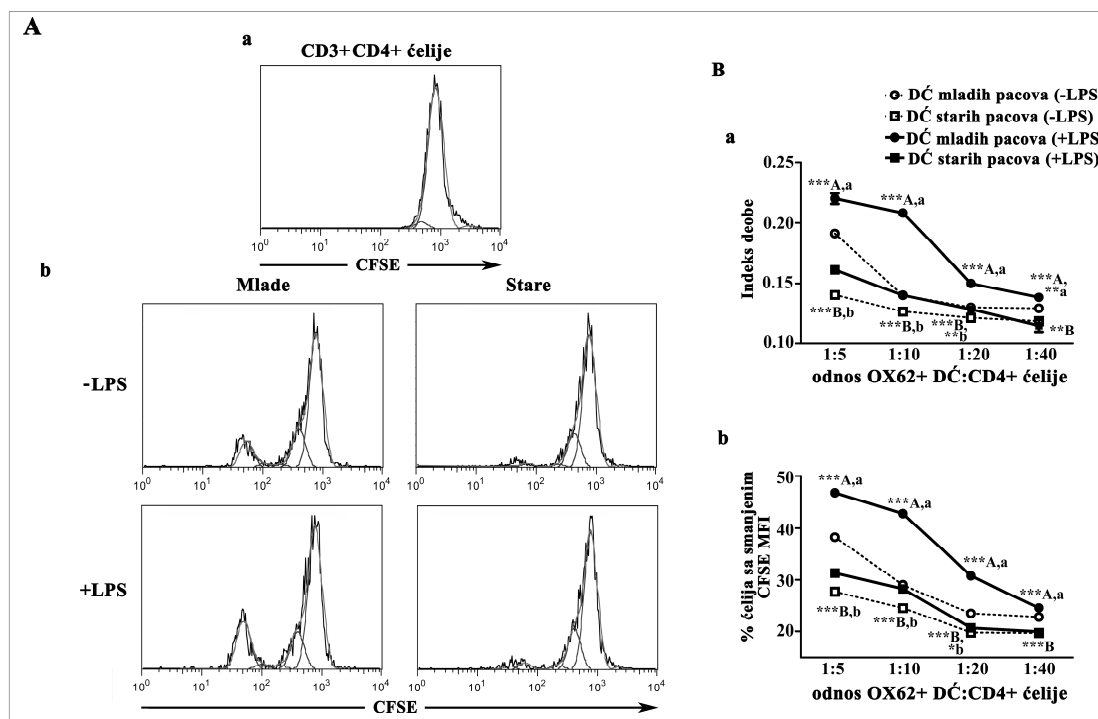
Slika 18. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDĆ DA pacova gajenih u medijumu u prisustvu LPS-a.

Reprezentativni protočno-citofluorometrijski prikazi ekspresije (A) MHC II, (B) CD80, (C) CD86 i (D) CD40 molekula na slezinskim OX62+ DĆ (gore) mladih i (dole) starih pacova gajenih u medijumu u (levo) odsustvu (-LPS) i (desno) prisustvu LPS-a (+LPS). Odgovarajuće vrednosti procenta pozitivnih ćelija i (u zagradi) srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) su prikazane u gornjem uglu svakog histograma. Stubičasti histogrami prikazuju (levo) procenat (A) MHC II+, (B) CD80+, (C) CD86+ i (D) CD40+ ćelija i (desno) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za (A) MHC II na MHC II+, (B) CD80 na CD80+, (C) CD86 na CD86+ i (D) CD40 na CD40+ slezinskim OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu i prisustvu LPS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2.2. Uticaj starenja na funkcijske karakteristike kDĆ iz kulture

4.2.2.1. Starenje smanjuje kapacitet kDĆ da indukuju proliferaciju alogenih CD4+ T limfocita

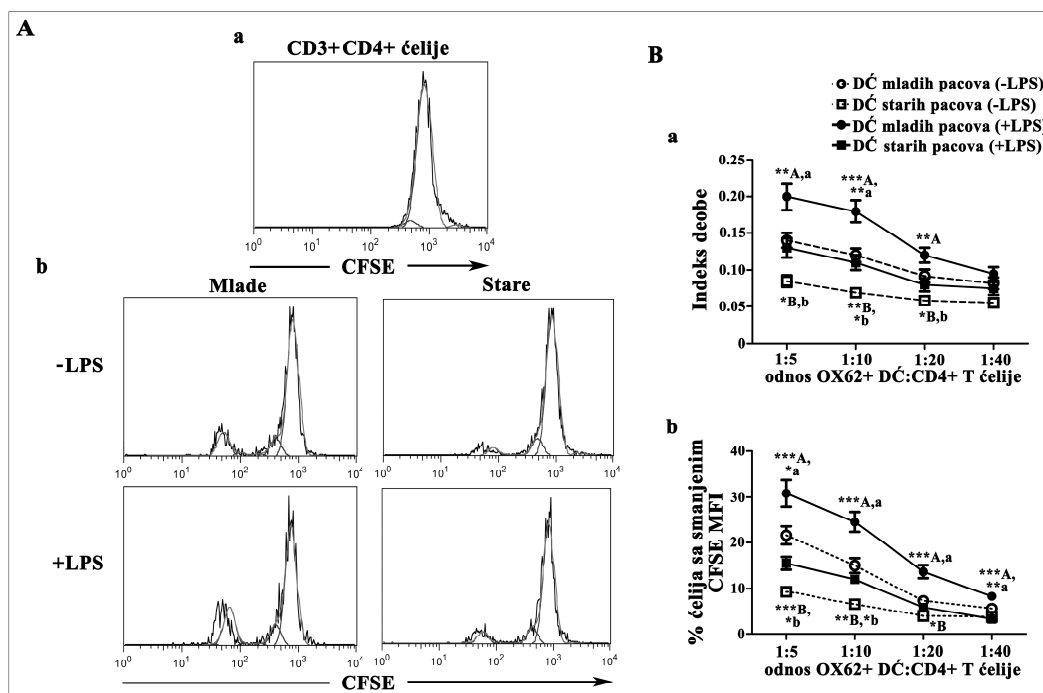
Analiza alostimulatorne sposobnosti kDĆ je pokazala da su nestimulisane kDĆ, bez obzira na soj i uzrast životinja iz kojih su izolovane, indukovale proliferaciju alogenih CD4+ T limfocita, ali su bile manje efikasne u poređenju sa kDĆ stimulisanim LPS-om (Slika 19 i 20). Pored toga, LPS-om stimulisane kDĆ starih životinja su pokazale, u svim testiranim odnosima, manju sposobnost indukovanja proliferacije alogenih CD4+ T limfocita u odnosu na LPS-om stimulisane ćelije mladih životinja istog soja. Takođe, nezavisno od uzrasta životinja iz koji su poticale kDĆ, kao i od prisustva LPS-a, intenzitet proliferativnog odgovora je bio najveći pri odnosu kDĆ i CD4+ T limfocita 1:5 (Slika 19 i 20).



Slika 19. Starenje smanjuje alostimulatorni kapacitet kDĆ pacova AO soja.

(A) Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami dobijeni korišćenjem platforme za analizu proliferacije kompjuterskog programa FlowJo prikazuju CFSE bojenje CD3+CD4+ T limfocita (a) nestimuliranih i (b) stimuliranih u MLR sa OX62+ DĆ (levo) mladih i (desno) starih pacova gajenih u (gore) odsustvu (-LPS) i (dole) prisustvu LPS-a (+LPS) pri odnosu 1:5. Na osnovu MFI za CFSE moguće je razdvojiti: 1) ćelije koje imaju niži intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje su proliferisale i 2) ćelije koje imaju visok intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje nisu proliferisale.

(B) Linijski dijagrami predstavljaju (a) indeks deobe i (b) procenat CD3+CD4+ T ćelija sa nižim intenzitetom fluorescence CFSE boje koje su ko-kultivisane u MLR sa OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u odsustvu ili prisustvu LPS-a pri različitim odnosima. Indeks deobe je izračunat korišćenjem platforme za analizu proliferacije FlowJo kompjuterskog programa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); ^ADĆ mladih pacova (+LPS) vs DĆ starih pacova (+LPS); ^aDĆ mladih pacova (+LPS) vs DĆ mladih pacova (-LPS); ^BDĆ starih pacova (-LPS) vs DĆ mladih pacova (-LPS); ^bDĆ starih pacova (-LPS) vs DĆ starih pacova (+LPS); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Slika 20. Starenje smanjuje alostimulacioni kapacitet kDC pacova DA soja.

(A) Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami dobijeni korišćenjem platforme za analizu proliferacije kompjuterskog programa FlowJo prikazuju CFSE bojenje CD3+CD4+ T limfocita (a) nestimuliranih i (b) stimuliranih u MLR sa OX62+ DĆ (levo) mladih i (desno) starih pacova gajenih u (gore) odsustvu (-LPS) i (dole) prisustvu LPS-a (+LPS) pri odnosu 1:5. Na osnovu MFI za CFSE moguće je razdvojiti: 1) ćelije koje imaju niži intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje su proliferisale i 2) ćelije koje imaju visok intenzitet fluorescence i odgovaraju ćelijama koje nisu proliferisale.

(B) Linijski dijagrami predstavljaju (a) indeks deobe i (b) procenat CD3+CD4+ T ćelija sa nižim intenzitetom fluorescence CFSE boje koje su ko-kultivirane u MLR sa OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u odsustvu ili prisustvu LPS-a pri različitim odnosima. Indeks deobe je izračunat korišćenjem platforme za proliferaciju FlowJo kompjuterskog programa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); ^ADĆ mladih pacova (+LPS) vs DĆ starih pacova (+LPS); ^aDĆ mladih pacova (+LPS) vs DĆ mladih pacova (-LPS); ^BDĆ starih pacova (-LPS) vs DĆ mladih pacova (-LPS); ^bDĆ starih pacova (-LPS) vs DĆ starih pacova (+LPS); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2.2.2. Uticaj starenja na sintezu i sekreciju citokina od strane kDC' iz kulture

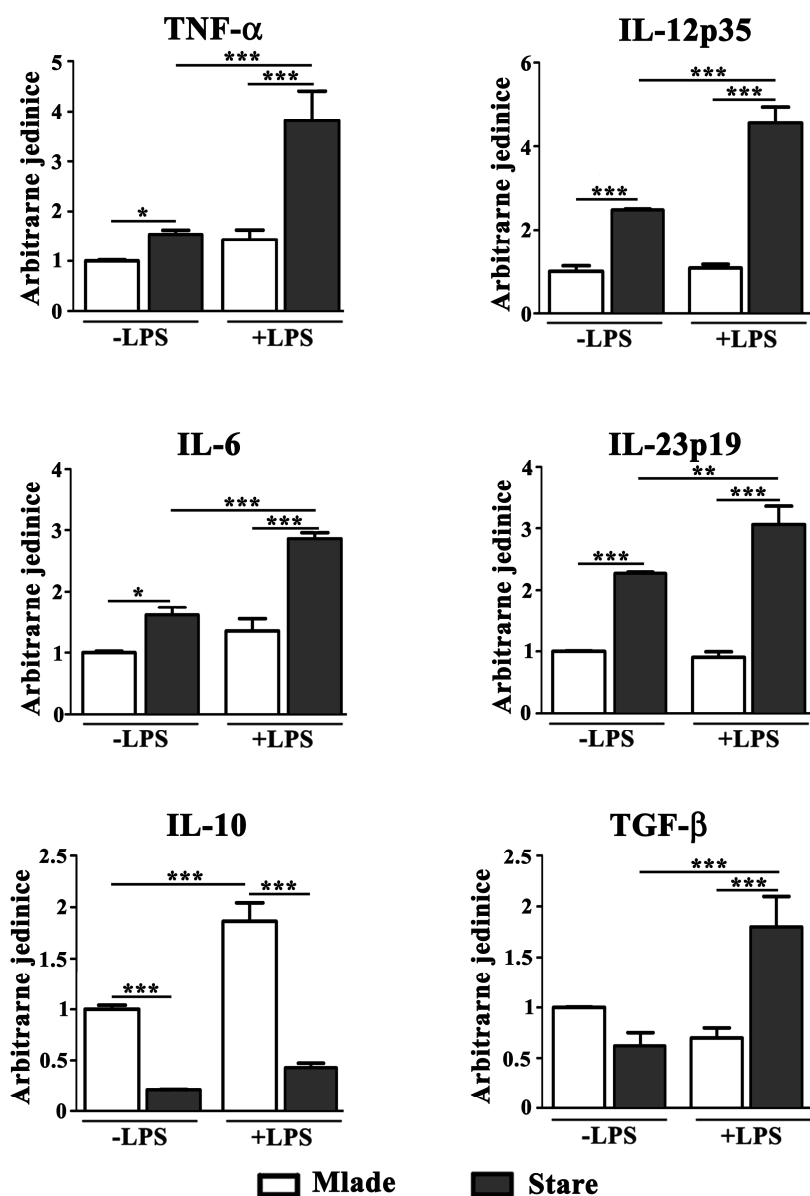
4.2.2.2.1. Ekspresija gena za citokine u kDC'

Aktivisane/zrele DC' sintetišu citokine koji, sa jedne strane, obezbeđuju optimalno funkcionisanje i regulaciju urođenog imuniteta, a sa druge strane neophodni su za usmeravanje diferencijacije T limfocita i funkcionisanje specifičnog imuniteta (Banchereau i Steinman, 1998; Kapsenberg, 2003; Walsh i Mills, 2013).

Analiza ekspresije gena za citokine u kDC' iz kulture je pokazala da su kDC' starih životinja **AO soja**, koje su gajene kompletnom medijumu u odsustvu LPS-a, 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. Starenje nije uticalo na bazalnu ekspresiju iRNK za TGF- β u kDC' mladih i starih životinja (Slika 21).

Pod uticajem LPS-a, kDC' mladih životinja su značajno povećale ($p < 0.001$) ekspresiju samo iRNK za IL-10 u poređenju sa nestimulisanim 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 nestimulisanim kDC' životinja iste starosti (Slika 21).

U celini posmatrano, kDC' starih pacova posle stimulacije LPS-om ekspimiraju značajno više ($p < 0.001$) iRNK za: TNF- α , IL-12p35, IL-23p19, IL-6 i TGF- β i manje ($p < 0.001$) za IL-10, nego na isti način tretirane ćelije mladih pacova.



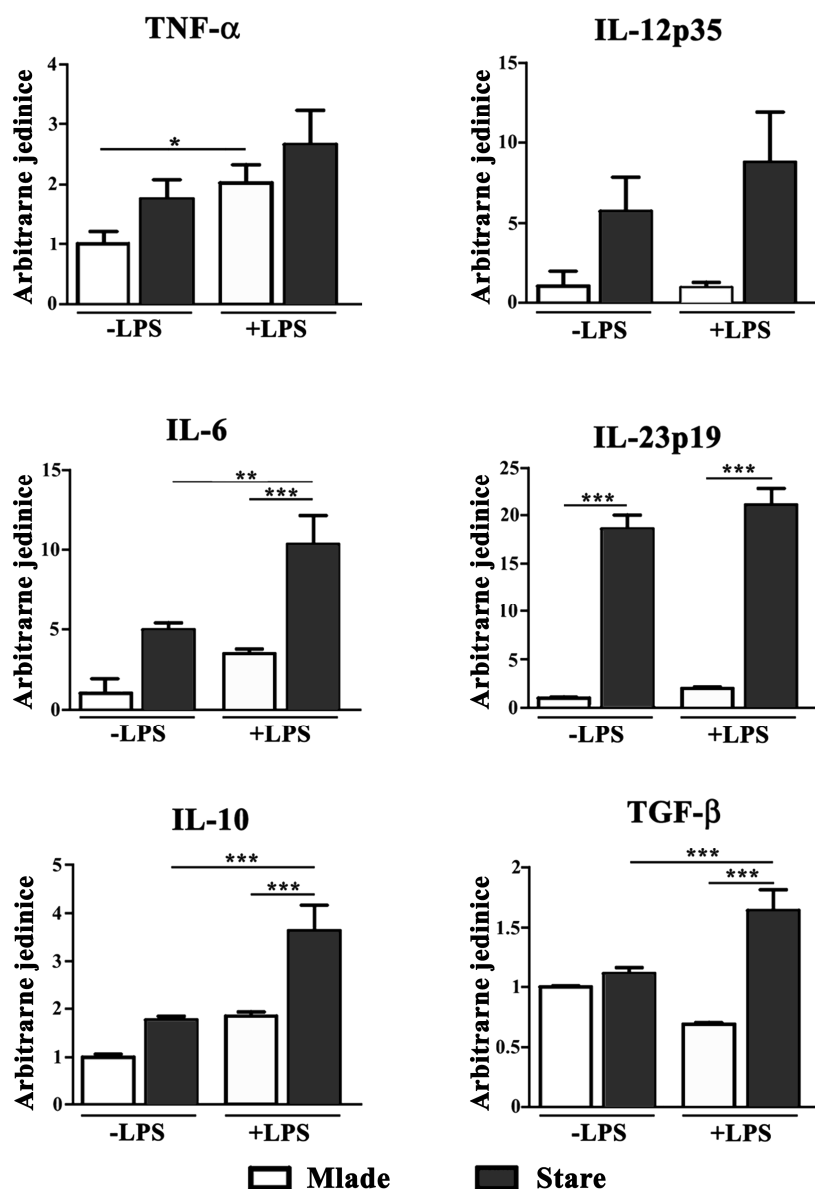
Slika 21. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u kDĆ AO pacova iz kulture.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za TNF- α , IL-12p35, IL-23p19, IL-6, IL-10 i TGF- β u OX62+ DĆ starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS (-LPS) i u OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u prisustvu LPS (+LPS) u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u OX62+ DĆ mladih pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS. Budući da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Analiza bazalne ekspresije **iRNK** u nestimulisanim kDĆ 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 (Slika 22).

Nakon aktivacije pod uticajem LPS-a, kDĆ 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, nestimulisanim, 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 kDĆ starih životinja u odnosu na nestimulisane kDĆ pacova istog uzrasta (Slika 22).

Poređenjem uticaja LPS-a na kDĆ mladih i starih životinja je pokazano da ove ćelije starih životinja ispoljavaju značajno veće ($p < 0.001$) količine iRNK za IL-6, IL-23p19, IL-10 i TGF- β nego LPS-om stimulisane ćelije mladih životinja (Slika 22).



Slika 22. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u kDĆ DA pacova iz kulture.

Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNK za TNF- α , IL-12p35, IL-23p19, IL-6, IL-10 i TGF- β u OX62+ DĆ starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS (-LPS) i u OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u prisustvu LPS (+LPS) u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine u OX62+ DĆ mladih pacova gajenih u medijumu u odsustvu LPS. Budući da je pokazano da je ekspresija gena za HPRT u našem eksperimentalnom sistemu bila stabilna, iRNK za HPRT je korišćena kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n \geq 6); *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

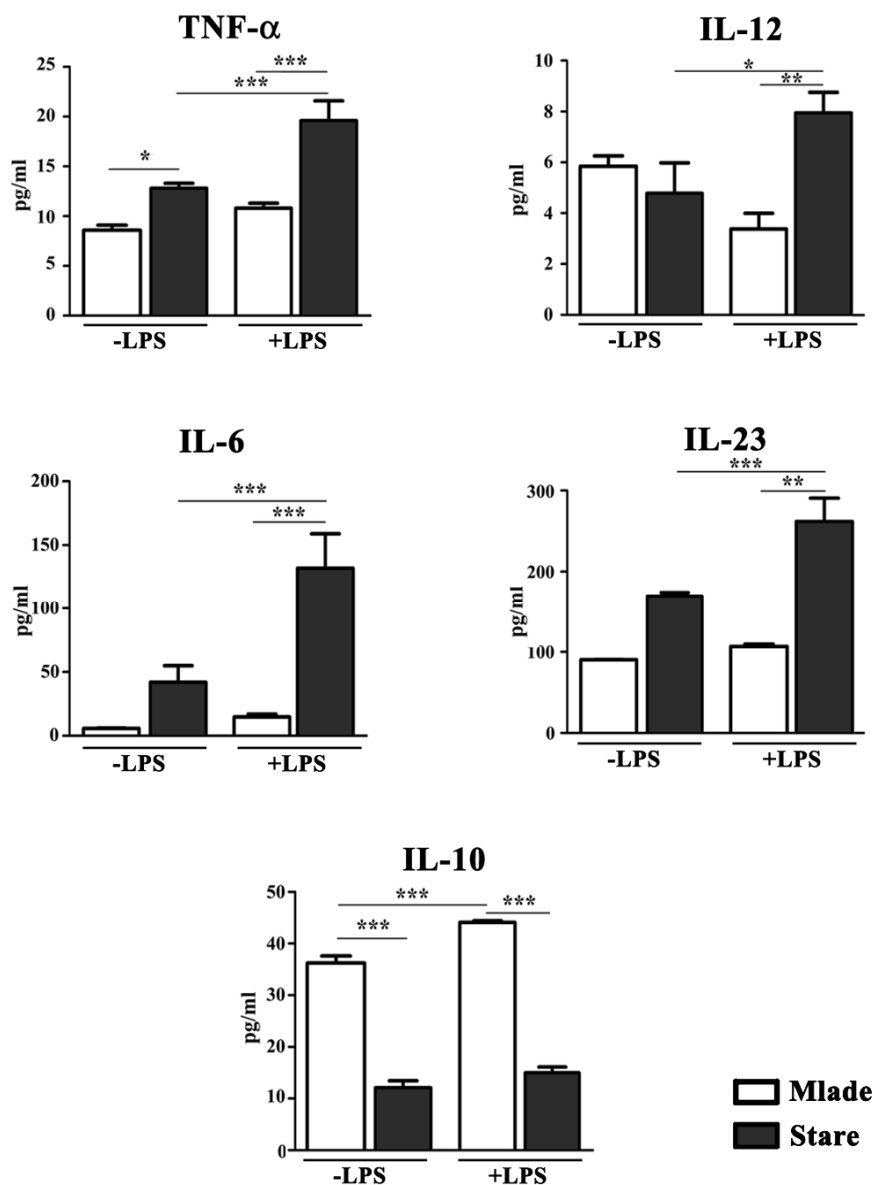
4.2.2.2.2. *Koncentracija citokina u supernatantima kultura kDC*

Analiza sekrecije citokina u supernatantima kultura nestimuliranih kDC mladih i starih pacova **AO soja** pokazala je delimično poklapanje sa prethodno iznetim rezultatima ekspresije gena za te citokine (Slika 23). Naime, bazalna produkcija TNF- α je bila veća ($p < 0.05$), dok se koncentracije IL-12 nisu značajnije razlikovale u kulturama nestimuliranih kDC starih u odnosu na nestimulirane ćelije mladih životinja. Takođe, iako su koncentracije IL-6 i IL-23 bile veće u supernatantima kultura nestimuliranih kDC starih u poređenju sa supernatantima kultura na isti način tretiranih kDC mladih životinja, razlike u koncentracijama nisu dostigle statističku značajnost. Nestimulirane kDC starih životinja su proizvele manje ($p < 0.001$) IL-10 u poređenju sa nestimuliranim ćelijama mladih pacova (Slika 23).

Aktivacija LPS-om povećala ($p < 0.001$) je samo produkciju IL-10 u supernatantima kultura kDC mladih životinja. Suprotno, veće koncentracije svih ispitivanih citokina (TNF- α , $p < 0.001$; IL-12, $p < 0.05$; IL-6, $p < 0.001$ i IL-23, $p < 0.001$), osim IL-10, izmerene su u supernatantima kultura LPS-om stimuliranih kDC starih pacova u poređenju sa nestimuliranim kDC pacova istog uzrasta (Slika 23).

Poređenjem koncentracija citokina u supernatantima kultura LPS-om stimuliranih kDC mladih i starih životinja, veće koncentracije svih citokina, osim IL-10, izmerene su u supernatantima kultura kDC starih pacova (Slika 23).

Treba napomenuti da, nezavisno od uzrasta i soja, u supernatantima kultura kDC stimuliranih LPS-om i kontrolnih nije detektovan TGF- β . Ovo bi se moglo objasniti primenom neodgovarajućeg ELISA testa za kvantifikaciju aktivnog oblika ovog citokina (Grainger i sar., 2000) ili izuzetno složenom regulacijom sinteze, oslobađanja i delovanja TGF- β (Worthington i sar., 2012).



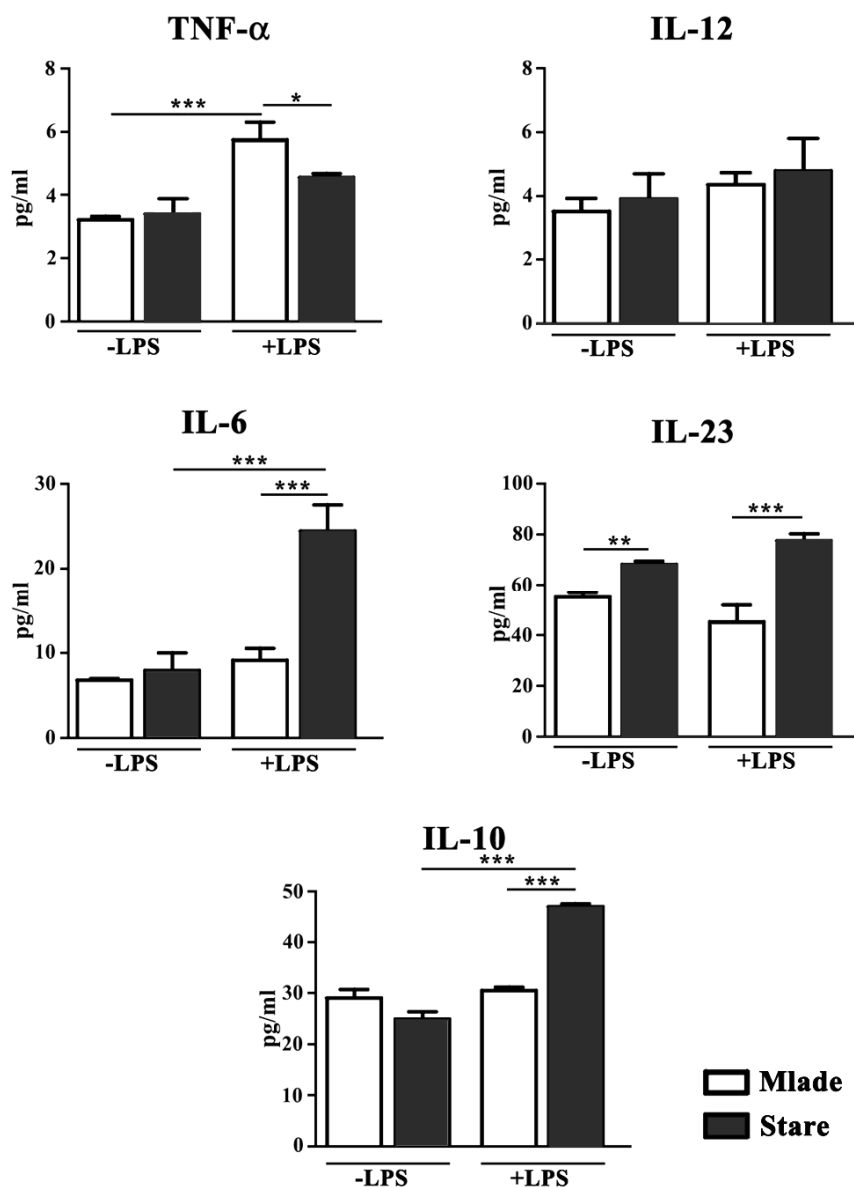
Slika 23. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u supernatantima kultura kDĆ AO pacova.

Histogrami prikazuju koncentracije TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6 i IL-10 u supernatantima kultura OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu (-LPS) ili prisustvu LPS (+LPS). Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Kod **DA pacova** bazalne koncentracije ispitivanih citokina se nisu razlikovale u supernatantima kultura kDĆ mladih i starih životinja, osim koncentracije IL-23, koja je bila značajno viša ($p < 0.01$) u supernatantima kultura nestimuliranih kDĆ starih životinja (Slika 24).

U supernatantima kultura, u kojima su kDĆ mladih životinja gajene u prisustvu LPS-a, izmerene su značajno veće koncentracije TNF- α ($p < 0.001$), dok se koncentracije ostalih ispitivanih citokina nisu značajnije razlikovale u poređenju sa kontrolnim, nestimuliranim kDĆ životinja istog uzrasta. Kod starih životinja, u supernatantima kulturama kDĆ nakon aktivacije LPS-om, izmerene su veće ($p < 0.001$) koncentracije IL-6 i IL-10, a koncentracije drugih ispitivanih citokina se nisu razlikovale u poređenju sa nestimuliranim ćelijama životinja istog uzrasta (Slika 24).

LPS-om stimulirane kDĆ starih pacova, u poređenju sa LPS-om stimuliranim ćelijama mladih životinja, sekretovale su više IL-6 ($p < 0.001$), IL-23 ($p < 0.001$) i IL-10 ($p < 0.001$), a manje TNF- α ($p < 0.05$), dok se produkcija IL-12 nije menjala (Slika 24).



Slika 24. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u supernatantima kultura kDĆ DA pacova.

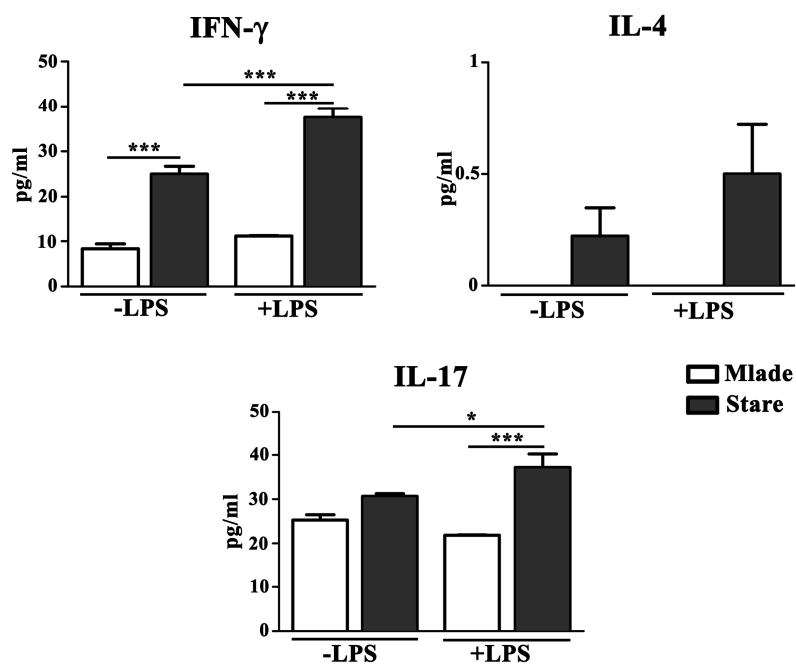
Histogrami prikazuju koncentracije TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6 i IL-10 u supernatantima kultura OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu (-LPS) ili prisustvu LPS (+LPS). Podaci su prikazanih kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2.2.3. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u ko-kulturama kDC i alogenih CD4+ T limfocita

Imajući u vidu promenjenu sekreciju citokina od strane kDC starih životinja, kao i njihov promenjen alostimulatorni kapacitet, u supernatantima ko-kultura kDC i alogenih CD4+ T limfocita određivanje su koncentracije IFN- γ , IL-4 i IL-17, citokina koji karakterišu Th1, Th2 odnosno Th17 ćelije.

U supernatantima ko-kultura kDC mladih **AO pacova** stimulisanih LPS-om i CD4+ T limfocita, u poređenju sa supernatantima ko-kultura CD4+ T ćelija i kDC životinja istog uzrasta gajenih u odsustvu LPS-a, koncentracije IFN- γ i IL-17 se nisu značajno razlikovale. Suprotno, veća koncentracija IFN- γ ($p < 0.001$) i IL-17 ($p < 0.05$) izmerena je u supernatantima ko-kultura kDC stimulisanih LPS-om starih životinja i CD4+ ćelija u odnosu na supernatante ko-kultura CD4+ T ćelija i nestimuliranih kDC životinja iste starosti. Konačno, poređenjem koncentracija citokina u supernatantima ko-kultura kDC starih životinja stimuliranih 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 (Slika 25).

Nisu nađene razlike u koncentracijama IL-4 u supernatantima kokultura CD4+ T limfocita i različito tretiranih kDC mladih i starih životinja (Slika 25).

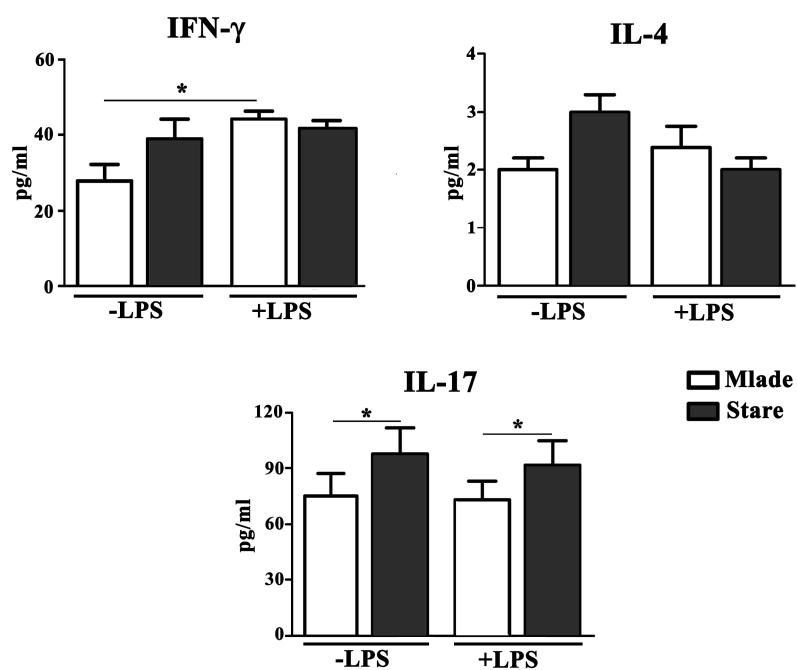


Slika 25. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u ko-kulturama kDĆ AO pacova i alogernih CD4⁺ T limfocita

Histogrami prikazuju koncentracije IFN- γ , IL-4 i IL-17 u supernatantima ko-kultura OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu (-LPS) ili prisustvu LPS (+LPS) i alogernih CD4⁺ T limfocita. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Kod mladih **DA pacova** u supernatantima ko-kultura kDC⁺ stimulisanih LPS-om i CD4⁺ T limfocita izmerene su veće ($p < 0.05$) koncentracije IFN- γ u poređenju sa supernatantima ko-kultura sa nestimulisanim kDC⁺ mladih pacova. Zatim, značajno veće ($p < 0.05$) koncentracije IL-17 izmerene su u supernatantima ko-kultura, kako nestimulisanih tako i stimulisanih kDC⁺ starih životinja i CD4⁺ ćelija, u poređenju sa supernatantima odgovarajućih ko-kultura mladih životinja (Slika 26).

Ni aktivacija LPS-om ni starenje nije uticalo na sekreciju IL-4 u ko-kulturama kDC⁺ DA pacova i CD4⁺ T ćelija (Slika 26).



Slika 26. Uticaj starenja na koncentraciju citokina u ko-kulturama kDĆ DA pacova i alogenih CD4⁺ T limfocita

Histogrami prikazuju koncentracije IFN- γ , IL-4 i IL-17 u supernatantima ko-kultura OX62+ DĆ mladih i starih pacova gajenih u medijumu u odsustvu (-LPS) ili prisustvu LPS (+LPS) i alogenih CD4⁺ T limfocita. Podaci su prikazanih kao srednja vrednost \pm S.E.M. ($n \geq 6$); * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

4.3. UTICAJ STARENJA NA INDUKCIJU I RAZVOJ EAE-a

Imajući u vidu značaj DĆ u održavanju tolerancije tj. ulogu u patogenezi autoimunskih bolesti (Drakesmith i sar., 2000) i do sada opisane promene kDĆ pacova oba soja tokom starenja, mladi i stari pacovi oba soja su imunizovani u cilju indukcije EAE-a.

Kod starih pacova **AO soja**, koji su relativno rezistentni na indukciju EAE-a u ranom adultnom uzrastu, došlo je do povećanja incidence obolevanja (0% kod mladih u odnosu na 60% kod starih). 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 (Tabela 1).

Suprotno, kod starih pacova **DA soja**, koji su u adultnom uzrastu osetljivi na indukciju EAE-a, incidenca obolevanja je smanjena (100% kod mladih u odnosu na 27.3% kod starih). Kod ovog soja nije bilo razlike u danu početka bolesti između mladih i starih životinja (11.67 ± 0.41 mlade i 11.33 ± 0.41 stare), ali su stare životinje imale blažu kliničku sliku bolesti, što je procenjeno na osnovu maksimalnog kliničkog znaka koji je bio 4 (tetraplegija tj. moribundno stanje) kod mladih i 2 kod starih životinja (Tabela 1).

Tabela 1. Uticaj starenja na indukciju i razvoj EAE-a kod pacova AO i DA soja

		Incidenca EAE^a	Dan početka (srednja vrednost \pm SEM)^b	Maksimalni klinički znak^c
AO	Mlade	0/14 (0%)	-	0
	Stare	6/10 (60%)	10.3 ± 1.36	2
DA	Mlade	9/9 (100%)	11.67 ± 0.41	4
	Stare	3/11 (27.3%)	11.33 ± 0.41	2

^abroj životinja koje su imale kliničke znake EAE-a/ukupan broj imunizovanih životinja u grupi; u zagradi je prikazan procenat obolelih životinja u grupi; ^bsrednja vrednost broja dana nakon imunizacije kada se pojavio prvi klinički znak kod obolelih pacova u grupi; ^cnajveći klinički znak zabeležen u grupi.

5. DISKUSIJA

5.1. UTICAJ STARENJA NA SVEŽE IZOLOVANE SLEZINSKE kDĆ PACOVA AO I DA SOJA

5.1.1. Uticaj starenja na zastupljenost različitih subpopulacija kDĆ

U okviru kDĆ, kao i u okviru drugih populacija ćelija imunskog sistema (T limfocita, B limfocita, NK ćelija, makrofaga), identifikovane su subpopulacije za koje se smatra da predstavljaju jedan vid specijalizacije ovih ćelija sa ciljem „podele rada“ i pokretanja što adekvatnijeg imunskog odgovora nakon aktivacije različitim egzogenim i endogenim stimulusima (Naik, 2008). Dostupni literaturni podaci ukazuju na to da se u okviru kDĆ pacova mogu razlikovati bar dve morfološki, fenotipski i funkcijski različite subpopulacije, koje se mogu identifikovati na osnovu ispoljenosti CD4 molekula na površini ovih ćelija (Liu i sar., 1998; Turnbull i MacPherson, 2001; Trinite i sar., 2000; Voisine i sar., 2002). I pored toga što je ovaj molekul važan marker za identifikaciju i razdvajanje kDĆ na subpopulacije, njegova funkcija na ovim ćelijama još uvek nije dovoljno razjašnjena. Jedna od pretpostavki je da se tokom prezentacije antigena T limfocitima ovaj molekul vezuje za MHC molekule II klase na aktivisanim CD4+ T limfocitima, i u prilog tome govori i činjenica da su CD4+ kDĆ efikasnije APC u poređenju sa kDĆ koje ne ispoljavaju ovaj molekul (Liu i sar., 1998).

U slezinama mladih pacova AO soja nađena je veća zastupljenost CD4+ subpopulacije, dok je kod pacova DA soja istog uzrasta, CD4- subpopulacija ćelija bila dominantna unutar populacije sveže izolovanih slezinskih kDĆ. Ovi rezultati su u skladu sa podacima koji pokazuju da je relativna zastupljenost različitih subpopulacija kDĆ u slezinama mladih pacova sojno zavisna (Hubert i sar., 2006). Imajući u vidu da subpopulacije kDĆ imaju različite funkcijske karakteristike, pretpostavka je da bi njihova relativna zastupljenost mogla da se poveže sa sklonošću za razvoj autoimunskih bolesti (Fournie i sar., 2001; Hubert i sar., 2006). Preciznije, predominacija CD4+ subpopulacije kDĆ, koju karakteriše produkcija male količine IL-12 i odsustvo produkcije TNF- α , kod mladih životinja AO soja, može biti objašnjenje za relativnu rezistenciju ovog soja na indukciju Th1/Th17 posredovanih autoimunskih bolesti (Fournie i sar., 2001; Marković i sar., 2009). Suprotno ovome, kod mladih pacova DA soja koji su osetljiviji na indukciju autoimunskih bolesti posredovanih Th1/Th17 ćelijskim odgovorom (Lukić i sar., 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006;

Miljković i sar., 2006), nađena je dominacija CD4- subpopulacije kDĆ koju odlikuje produkcija velikih količina proinflammatoryh citokina, IL-12 i TNF- α (Voisine i sar., 2002; Hubert i sar., 2006).

Starenje dovodi do veće zastupljenosti CD4- ćelija u populaciji sveže izolovanih slezinskih kDĆ starih pacova AO soja, a ne utiče na zastupljenost subpopulacija kDĆ sa različitom ekspresijom CD4 molekula kod pacova DA soja, tako da je i kod starih pacova ovog soja u slezini dominantna CD4- subpopulacija kDĆ. Dobijeni rezultati pokazuju da se kod pacova promena odnosa subpopulacija kDĆ u slezini ne dešava nužno tokom starenja i da je sojno zavisna. Promena odnosa subpopulacija slezinskih kDĆ sa starenjem opisana je i kod miševa C57BL/6 soja (Wong i sar., 2010).

Budući da u dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju starenja na DĆ pacova, a i da je, u celini gledano, veoma malo podataka o razvojnom putu DĆ i njihovih subpopulacija (Naik, 2008), teško je dati odgovor na pitanje zašto sa starenjem dolazi do promene odnosa subpopulacija DĆ. Poznato je da DĆ nastaju od pluripotentne matične ćelije u kostnoj srži (Liu i Nussenzweig, 2010) i da je ispoljenost Flt3 na ranim prekursorima od ključnog značaja za diferencijaciju u pravcu DĆ (D'Amico i Wu, 2003; Shortman i Naik, 2007). Pored toga, slezina poseduje endogeni pul prekursora DĆ koji mogu diferencirati u zrelije oblike *in situ* (Shortman i Naik, 2007). Kada je u pitanju razvojni put pojedinačnih subpopulacija, nije poznato da li je populacija prekursorskih pro-DĆ u kostnoj srži heterogena i da li se ćelije još na tom nivou opredeljuju u pravcu koje subpopulacije će diferencirati ili se opredeljivanje dešava u ciljnom organu pod uticajem promena unutar samih ćelija i/ili signala koji potiču od ćelija iz okruženja (Naik, 2008).

Ukoliko se opredeljivanje za diferencijaciju u pravcu određene subpopulacije dešava u kostnoj srži, tada se može pretpostaviti da promena mikrosredine koja se dešava sa starenjem u tom organu (Geiger i Rudolph, 2009) može doprineti promeni odnosa supopulacija. Takođe, promena migratorne sposobnosti ovih ćelija mogla bi da utiče na njihovu različitu zastupljenost u ciljnom organu (Dimmeler i sar., 2003).

Ukoliko se diferencijacija ka subpopulacijama dešava u ciljnom organu, u ovom slučaju slezini, starenjem uslovljena promena okruženja u kome se DĆ nalaze, bilo da se radi o promenama relativnih odnosa drugih ćelija ili koncentraciji solubilnih faktora

(GM-CSF i Flt3L) (Pulendran, 2004) mogla bi uticati na brojnost određene subpopulacije. Pored faktora mikrosredine, ne mogu se isključiti ni intrinzični faktori. U prilog ove pretpostavke govore rezultati dobijeni u eksperimentima na slezinskim DC starih miševa, koji pokazuju da defekti u signalnom putu u koji su uključeni STAT molekuli (*engl.* signal transducer and activator of transcription, STAT), a koji je značajan za proces diferencijacije DC, mogu biti odgovorni za promenu odnosa subpopulacija DC (Wong i sar., 2010).

U daljem toku istraživanja ispitivan je uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike sveže izolovanih kDC pacova oba soja sa ciljem da se proceni stepen njihove aktivacije/zrelosti u *in vivo* uslovima. Analizirana je površinska ispoljenost najvažnijih molekula koji učestvuju u prezentaciji antigena i stimulaciji T limfocita (MHC molekuli II klase i kostimulatorni molekuli), kao i endocitozna sposobnost i ekspresija gena za citokine. Neophodno je napomenuti da procedure koje su korišćene za izolaciju kDC (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode) ne utiču na nivo površinske ekspresije markera aktivacije DC, odnosno ne aktivišu ove ćelije (Vremec i sar., 2011).

5.1.2. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike

Opšte je prihvaćeno da DC u uslovima bez infekcije/inflamacije i u zavisnosti od lokalizacije, ispoljavaju nezreo fenotip sa niskom ispoljenošću kostimulatornih molekula i malom sposobnošću stimulacije T limfocita i pripisuje im se uloga u održavanju periferne tolerancije (Banchereau i Steinman, 1998). U skladu sa podacima dobijenim kod miša (Iwasaki i Kelsall, 1999; Wilson i sar., 2003) i sveže izolovane slezinske kDC mladih pacova oba soja pokazuju karakteristike nezrelih ćelija što je procenjeno na osnovu niske ispoljenosti aktivacionih markera (CD80, CD86 i CD40). Starenje menja fenotipske karakteristike slezinskih kDC i većina tih promena je sojno zavisna. U poređenju sa sveže izolovanim kDC mladih AO pacova, niža ispoljenost CD86, CD80 i CD40 je pokazana na sveže izolovanim kDC starih pacova istog soja. Iz navedenih rezultata moguće je pretpostaviti da su kDC starih AO pacova bile manje zrele, odnosno da su imale nezreliji fenotip u poređenju sa ćelijama mladih pacova AO soja. Suprotno, starenje je povećalo ekspresiju CD80 i CD86 molekula na kDC starih

životinja DA soja, što bi ukazivalo na to da su ove ćelije fenotipski zrelije od kDC mladih pacova istog soja.

5.1.3. Uticaj starenja na ekspresiju gena za citokine u kDC i tkivu slezine

Prethodno navedeni nalazi ukazuju da starenje na sojno-zavisian način menja stepen zrelosti sveže izolovanih slezinskih kDC pacova oba ispitivana soja. Budući da je pokazano da citokinski „milje“ u kome se DC nalaze može da utiče na njihovu diferencijaciju i aktivaciju/sazrevanje, može se pretpostaviti da je starenje uticalo i na raspoloživost citokina, bilo da su produkovani od strane samih DC ili ćelija koje se nalaze u njihovom okruženju, neophodnih za razvoj i sazrevanje DC. Kako bi se bar delimično sagledao uticaj starenja na produkciju citokina analizirana je ekspresija iRNK za glavne proinflatorne/imunostimulatorne i imunomodulatorne/imunosupresivne citokine kako u samim kDC, tako i u tkivu slezine.

Starenje je dovelo do promena u ekspresiji iRNK za citokine kod pacova oba soja. Naime, starenje je povećalo ekspresiju iRNK za TNF- α kod oba soja pacova, a nije uticalo na ekspresiju TGF- β . Kada je u pitanju ekspresija iRNK za IL-6 i IL-1 β , starenje je smanjilo ekspresiju iRNK za IL-6, a povećalo ekspresiju iRNK za IL-1 β kod AO pacova, dok je efekat na ekspresiju gena za ove citokine bio suprotan kod DA pacova. Porast ekspresije iRNK za IL-10 je nađen kod starih DA pacova, a ekspresija ovog citokina kod AO pacova nije se menjala sa starenjem.

U kDC starih životinja oba soja su nađene veće količine iRNK za TNF- α u poređenju sa istim ćelijama mladih životinja odgovarajućeg soja. Ovakav nalaz govori u prilog hroničnog sistemskog proinflatornog stanja opisanog kod starih ljudi i životinja različitih vrsta (Brüünsgaard i Pedersen, 2003; Gómez i sar., 2006; Vasto i sar., 2007; Wong i sar., 2013) i ukazuje na DC kao jedan od mogućih izvora TNF- α koji doprinosi održavanju ovog patološkog stanja. Povećani bazalni nivoi ovog citokina se povezuju sa povećanim bazalnim nivoom aktivisanog nuklearnog faktora kB (*engl.* nuclear factor kB, NF-kB) (Agrawal i sar., 2009; Panda 2010; Gupta i sar., 2013). Razmatrajući lokalno autokrino/parakrino delovanje ovog proinflatornog citokina, podaci da on povećava ekspresiju kostimulatornih molekula i time ostvaruje stimulatorni efekat na aktivaciju/sazrevanje DC u potpunosti podržavaju zreliji fenotip kDC opisan kod starih DA pacova (Stockwin i sar., 2000). Sa druge strane, uprkos

povećanoj ekspresiji iRNK za TNF- α u kDĆ starih AO pacova, ovaj citokin nije stimulisao aktivaciju/sazrevanje ovih ćelija pa su one imale nezreliji fenotip u odnosu na kDĆ mladih pacova istog soja. Pretpostavka da bi imunosupresivni/immunomodulatorni citokini (IL-10, IL-6 i TGF- β), za koje je pokazano da inhibiraju proces aktivacije DĆ, mogli biti odgovorni za manje zreo fenotip kDĆ starih AO pacova je malo verovatna, s obzirom da su nađeni niži (IL-6) ili nepromenjeni (IL-10 i TGF- β) nivoi ekspresije iRNK za ove citokine u tim ćelijama. Prema tome, može se pretpostaviti da sa starenjem neki drugi ekstrinzični i/ili intrinzični faktori, a koji nisu ispitivani u ovoj studiji, utiču na sazrevanja kDĆ starih AO pacova *in vivo*. Treba napomenuti da, iako je izostao stimulatorni efekat TNF- α na ekspresiju markera aktivacije na kDĆ starih AO pacova, njegov porast sa starenjem bi mogao da se poveže sa povećanom gustinom MHC molekula II klase na ovim ćelijama, budući da je pokazano da ovaj citokin utiče na translokaciju intracelularnih MHC molekula na površinu ćelije (Summers de Luca i Gommerman, 2012).

Kao što je već ranije navedeno, ekspresija iRNK za IL-6 u kDĆ starih AO pacova je bila manja, dok je u kDĆ starih DA pacova bila veća, u poređenju sa ćelijama mladih životinja istog soja. Na prvi pogled, porast ekspresije gena za IL-6 u kDĆ starih DA pacova bi se mogao povezati sa njihovim zrelijim fenotipom. Međutim, podaci da ovaj prevažodno proinflamatorni citokin, može da ima i antiinflamatorna/immunomodulatorna svojstva, ne govore u prilog ovoj pretpostavci (Xing i sar., 1998; Scheller i sar., 2011). Preciznije, podaci dobijeni kod miša ukazuju da IL-6 sprečava aktivaciju/sazrevanje slezinskih DĆ i time reguliše njihov aktivacioni status u stanju bez infekcije/inflamacije (Park i sar., 2004). Može se pretpostaviti da efekat IL-6 na kDĆ, najverovatnije nije samo posledica izmenjene ekspresije gena za ovaj citokin, već i promena na nivou ekspresije receptora za IL-6 i prenosa signala posredstvom njega, a koje su opisane sa starenjem (Fulop i sar., 2006).

Povećana ekspresija iRNK za IL-10 u kDĆ starih DA pacova u odnosu na mlade, na prvi pogled deluje neočekivano u kontekstu povećane ekspresije kostimulatornih molekula (CD80 i CD86) i gena za TNF- α i IL-6 i generalno zrelijeg fenotipa ovih ćelija. (McBride i sar., 2002; Wallet i sar., 2005). Međutim, podaci da DĆ izolovane iz pluća, Pajerovih ploča i prednje očne komore ispoljavaju zreo fenotip,

produkuju IL-10 i indukuju nastanak T reg (Rutella i sar., 2006), ne samo da podržavaju gore navedene rezultate, nego ukazuju i na mogućnost da bi kDC starih DA pacova mogle da imaju tolerogenu funkciju. U prilog tome su i podaci da tolerogena funkcija DC ne zavisi od njihovog fenotipa, već je za ispoljavanje ove funkcije od većeg značaja povećana produkcija IL-10 (Smits i sar., 2005). Osim toga, IL-10 indukuje ispoljavanje drugih molekula na površini DC, kao što su inhibitorni transkript sličan imunoglobulinu (*engl.* inhibitory immunoglobulin-like transcript, ILT) 3 i 4 koji učestvuju u ostvarivanju tolerogene funkcije ovih ćelija (Manavalan i sar., 2003).

Konačno, analizom ekspresije gena za TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β u tkivu slezine starih pacova oba soja nađeno je smanjenje nivoa iRNK za IL-6, IL-10 i TGF- β , dok je nivo iRNK za TNF- α bio smanjen kod DA, a nepromenjen kod AO starih pacova. Iako je teško povezati ove gotovo identične promene citokina u slezinama starih AO i DA pacova za različitim stepenom zrelosti i različitom funkcijom njihovih slezinskih kDC, treba istaći da su ovi nalazi potvrđeni i od drugih istraživača. Naime, i u slezinama starih pacova Lewis soja nađeno je sniženje ekspresije gena za IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ i TGF- β (Pachowka i sar., 2011).

5.1.4. Uticaj starenja na endocitozni kapacitet kDC

Ključna karakteristika nezrelih DC je sposobnost preuzimanja antigena i ona je od velikog značaja za prezentovanje antigena T limfocitima (Banchereau i sar., 2000; Tan i O'Neill, 2005). Tokom sazrevanja, obim ovog procesa se smanjuje čime se obezbeđuje prezentovanje samo antigena koji potiču sa mesta inflamacije (Hubo i sar., 2013). Preciznije rečeno, neposredno nakon delovanja aktivacionog stimulusa, dolazi do kratkotrajnog povećanja preuzimanja antigena, da bi posle toga ova ćelijska aktivnost opala (Guermontprez i sar., 2002; Dubsky i sar., 2005; Reis e Sousa 2006).

Starenje dovodi do promene endocitoznog kapaciteta slezinskih kDC pacova oba soja i ove promene su bile u korelaciji sa stepenom njihove zrelosti. Naime, endocitozni kapacitet kDC je bio povećan kod starih AO pacova, što je bilo u skladu sa njihovim nezreljim fenotipom u odnosu na kDC mladih pacova istog soja. Suprotno, zreliji fenotip slezinskih kDC starih DA pacova bio je praćen smanjenim kapacitetom ovih ćelija da preuzimaju dekstran.

Nalaz smanjenja endocitoze sa starenjem je saglasan sa podacima dobijenim kod ljudi, koji ukazuju na smanjenu funkciju makropinocitoze, endocitoze i fagocitoze MoDC starih osoba (Agrawal i sar., 2007a). Iako postoje podaci o smanjenju ekspresije receptora za preuzimanje antigena od strane DC starih miševa (Grolleau-Julius i sar., 2006), ovi nalazi nisu potvrđeni kod ljudi, već se smanjeno preuzimanje antigena od strane DC starih osoba pripisuje promenama u prenosu signala u okviru fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K)/protein kinaza B (AKT) signalnog puta (Agrawal i sar., 2007a).

Poremećaj u prenosu signala u okviru PI3K/AKT signalnog puta u DC može biti razlog povećane ekspresije proinflammatoryh citokina u tim ćelijama, što je i detektovano kod starih miševa i ljudi (Agrawal i sar., 2007a, Agrawal i sar., 2007b, Panda i sar., 2010). Naime, pokazano je da ovaj signalni put funkcioniše po principu negativne povratne sprege i da služi da ograniči produkciju proinflammatoryh citokina u odgovoru na opasne/oštećujuće stimulse. Takođe, pokazano je da PI3K/AKT signalni put sprečava prekomernu ekspresiju proinflammatoryh medijatora od strane monocita koji su stimulisani LPS-om (Guha i Mackman, 2002). U svetlu ovih nalaza, ranije pomenuta povećana ekspresija iRNK za TNF- α i IL-6 u kDC starih DA pacova je u saglasnosti sa njihovom smanjenom endocitoznom funkcijom, dok bi suprotan uticaj starenja na endocitozni kapacitet kDC starih AO pacova mogao biti povezan sa sniženim nivoom iRNK za IL-6 u njima, a u osnovi ovih promena bi mogao biti poremećaj u prenosu signala u okviru PI3K/AKT signalnog puta. Na osnovu svih prethodno iznetih podataka može se zaključiti da starenje menja fenotipske i funkcijske karakteristike sveže izolovanih kDC pacova i te promene su sojno specifične. Preciznije, starenje dovodi do: 1) veće zastupljenosti CD4- ćelija u populaciji kDC starih pacova AO soja (za razliku od mladih životinja kod kojih je brojnija CD4+ subpopulacija), a ne utiče na zastupljenost subpopulacija kDC sa različitom ekspresijom CD4 molekula kod pacova DA soja, tako da je kod njih u oba uzrasta dominantna CD4-subpopulacija; 2) promene fenotipskih karakteristika kDC ćelija, tako da ove ćelije starih pacova AO soja pokazuju nezreliji fenotip, a starih pacova DA soja zreliji fenotip, u odnosu na ove ćelije koje su izolovane iz mladih životinja odgovarajućeg soja; 3) promena u ekspresiji iRNK za citokine kod pacova oba soja, s tim što su te promene suprotne kada je u pitanju iRNK za IL-6 i IL-1 β (starenje smanjuje ekspresiju iRNK za

IL-6, a povećava ekspresiju iRNK za IL-1 β kod AO pacova), različite (iRNK za IL-10 raste kod DA, a ne menja se kod AO pacova) ili slične (ekspresija TNF- α se povećava kod oba soja pacova, a iRNK za TGF- β se značajno ne menja) i 4) promene endocitoznog kapaciteta kDĆ (merene preuzimanjem dekstrana), tako da se on povećava kod pacova AO soja, a smanjuje se kod pacova DA soja.

5.2. UTICAJ STARENJA NA SPOSOBNOST AKTIVACIJE/SAZREVANJA SLEZINSKIH kDĆ PACOVA AO I DA SOJA U KULTURI NAKON STIMULACIJE LPS-OM

5.2.1. Uticaj starenja na „spontanu“ aktivaciju kDĆ

Analiza ekspresije glavnih aktivacionih markera (CD80, CD86 i CD40) i MHC molekula II klase u suspenziji kDĆ mladih i starih pacova oba soja, posle gajenja u kompletnom medijumu bez prisustva LPS-a, je pokazala da su one u određenom stepenu aktivisane/zrele u poređenju sa odgovarajućim sveže izolovanim kDĆ. Ovaj nalaz nije bio iznenađujući, s obzirom da je opisan u literaturi i poznat kao fenomen „spontane aktivacije/sazrevanja“ (Montoya i sar., 2002; Schlecht i sar., 2006, Vremec i sar., 2011). Istraživanjima kod miša pokazano je da slezinske DĆ gajene u medijumu bez prisustva stimulatora imaju karakteristike aktivisanih/zrelih DĆ, a što je procenjeno na osnovu povećane površinske ekspresije MHC II i kostimuatornih molekula, smanjene endocitozne sposobnosti, produkcije IL-12 i TNF- α i sposobnosti polarizacije imunskog odgovora u pravcu Th1 (Montoya i sar., 2002; Schlecht i sar., 2006, Vremec i sar., 2011). Sa ciljem da objasne ovaj fenomen, Vremec i saradnici (Vremec i sar., 2011) su ispitivali više potencijalnih faktora, i ukazali na postojanje solubilnog faktora, za sada još uvek nepoznatog, koji nastaje usled međusobnih interakcija DĆ u kulturama sa velikom gustinom ovih ćelija (5×10^6 ćelija/ml). Pretpostavka ovih autora je da *in vivo* u slezini, DĆ ne dolaze u blizak međusobni kontakt jer su „razdvojene“ okolnim ćelijama slezine pa zato imaju nezreli fenotip. Nasuprot tome, *in vitro*, u suspenziji koja sadrži visoko prečišćenu i homogenu populaciju samo DĆ, one više nisu izložene inhibitornom uticaju drugih ćelija slezine i u međusobnim kontaktima se aktivišu i sazrevaju (Vremec i sar., 2011). Pored toga, autokrino produkovan IFN- α/β (Montoya i sar., 2002), procedure koje se koriste za izolaciju DĆ, ali ne tretman kolagenazom i imunomagnetno razdvajanje (Schlecht i sar., 2006) i deplecija T reg prilikom izolacije

DĆ, koje inače drže pod kontrolom aktivacioni status DĆ *in vivo* (Probst i sar., 2014), se navode kao faktori koji bi mogli da indukuju ovaj fenomen.

Analizom ispoljenosti antigen-prezentujućih i kostimulatornih molekula u populaciji kDC mladih pacova oba soja, gajenih u kompletnom medijumu u odsustvu LPS-a, nađena je veća procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju CD80 i CD86 molekule kao i veća gustina MHC molekula II klase na ovim ćelijama što je i ukazivalo na „spontanu“ aktivaciju ovih ćelija mladih AO i DA pacova. Starenje je, u zavisnosti od soja, različito uticalo na „spontanu“ sazrevanje kDC. Analiza ispoljenosti aktivacionih i MHC II molekula je pokazala veći stepen „spontane“ aktivacije kDC starih AO pacova, a manji starih pacova DA soja u odnosu na ćelije mladih pacova odgovarajućeg soja. Podaci da endogeno produkovani TNF- α povećava ekspresiju kostimulatornih molekula na DĆ (Slobodin i sar., 2009), a IL-10 deluje suprotno, s jedne strane, i veće koncentracije TNF- α i manje IL-10 izmerene u supernatantima kultura nestimuliranih kDC starih AO pacova gajenih u kompletnom medijumu bez stimulacije u poređenju sa odgovarajućim supernatantima mladih pacova istog soja, s druge strane, u saglasnosti su sa izraženijom „spontanom“ aktivacijom kDC starih AO pacova. Imajući u vidu da se koncentracije TNF- α i IL-10 nisu razlikovale u supernatantima kultura nestimuliranih kDC mladih i starih DA pacova, slabije „spontano“ sazrevanje kDC starih DA pacova je verovatno posledica dejstva nekih drugih faktora iz kulture ili iz slezinske mikrosredine kojima su ove ćelije bile izložene.

5.2.2. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike kDC stimuliranih LPS-om

Aktivacija/sazrevanje kDC je indukovano dodavanjem LPS-a, koji je sastavni deo ćelijskog zida Gram negativnih bakterija i jedan od najvažnijih faktora virulencije. Vezivanje LPS za TLR4 na različitim ćelijama, uključujući i DĆ, dovodi do niza promena karakterističnih za njihovu aktivaciju/sazrevanje i zbog toga se LPS često koristi za indukciju sazrevanja DĆ, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima (De Smedt i sar., 1996; Granucci et al. 1999; Kaisho i sar., 2001; Wang i sar., 2009).

Imajući u vidu da je pokazano da obe subpopulacije pacovskih kDC ekspimiraju iRNK za TLR4 (Hubert i sar., 2006), u sveže izolovanim slezinskim kDC pacova AO i DA soja oba uzrasta određivana je ekspresija gena za TLR4 i ispoljenost ovog molekula na kDC. Pokazano je da je starenje, u zavisnosti od soja, različito uticalo

na promenu ekspresije TLR4. Preciznije, kod kDC⁺ starih AO pacova nađena je manja, dok je kod istih ćelija pacova DA soja nađena veća ekspresija ovog molekula u odnosu na kDC⁺ mladih životinja odgovarajućeg soja. Treba istaći da podaci koji se odnose na promenu ekspresije TLR4 kod starih životinja nisu konzistentni. Tako je pokazana niža ekspresija ovog molekula kod slezinskih i peritonealnih makrofaga starih miševa (Renshaw i sar., 2002), povećana na mononuklearnim ćelijama periferne krvi starih rhesus majmuna (Asquith i sar., 2012) i nepromenjena na limfocitima, makrofagama i peritonealnim makrofagama starih miševa (Boehmer i sar., 2004; Sun i sar., 2012). Takođe, ni mehanizmi koji regulišu ekspresiju TLR4 nisu dovoljno poznati. Nedavno objavljeni podaci pokazuju da mikroRNK imaju ulogu u regulaciji TLR genske ekspresije na post-transkripcionom nivou i modulaciji intracelularnog prenosa signala koji potiče od TLR. Ovi nalazi ukazuju da bi promene u ekspresiji ovih regulatornih molekula, koje su moguće kod „starih“ ćelija, mogle da imaju uticaj i na ekspresiju TLR (Olivieri i sar., 2012).

Stimulacija LPS-om povećala je ispoljenost MHC II i kostimulatornih molekula na kDC⁺ mladih i starih pacova AO soja, s tim što je taj efekat bio izraženiji kod starih AO pacova. Kao rezultat opisanih promena, nakon stimulacije LPS-om, kDC⁺ starih AO pacova su imale zreliji fenotip u odnosu na iste ćelije mladih životinja AO soja. Ovaj nalaz saglasan je sa većom procentualnom zastupljenošću CD4⁻ subpopulacije kDC⁺ u kulturi starih AO pacova, budući da je pokazano da LPS u mnogo većoj meri povećava ekspresiju CD80 i CD86 molekula na CD4⁻ kDC⁺, za razliku od CD4⁺ kDC⁺ gde je njegov efekat na ekspresiju CD86 molekula bio neznatan (Hubert i sar., 2006). Pored toga, veća zastupljenost CD4⁻ subpopulacije kDC⁺ može se povezati i sa većom produkcijom TNF- α od strane kDC⁺ starih AO pacova, jer je pokazano da ovaj citokin uglavnom produkuje CD4⁻ subpopulacija kDC⁺ (Hubert i sar., 2006; Voisine i sar., 2002). Takođe, zreliji fenotip kDC⁺ starih AO pacova u korelaciji je i sa većom produkcijom TNF- α i manjom IL-10 koja je nađena u supernatantima kultura ovih ćelija nakon stimulacije LPS-om, budući da TNF- α , kao što je već prethodno navedeno povećava ekspresiju kostimulatornih molekula na DC⁺

Međutim, u svetlu podataka koji pokazuju sniženu ekspresiju TLR4 molekula na kDC⁺ starih AO životinja, njihov snažniji odgovor na stimulaciju LPS-om deluje neočekivano. Jedno od mogućih objašnjenja za ovaj nalaz bi mogli da budu podaci koji

pokazuju da se odgovor ćelije na stimulaciju LPS-om ne ostvaruje samo posredstvom vezivanja LPS za TLR već su i drugi molekuli uključeni u ovu interakciju. Pre svega, aktivacija TLR4 zahteva prethodno vezivanje LPS-a za LBP (*engl.* LPS-binding protein), a zatim za CD14 molekul. Ovako nagrađen kompleks se transportuje do TLR4 gde im se pridružuje i MD2 molekul (Triantafilou i Triantafilou, 2002; Renshaw i sar., 2002). Pokazano je da aktivacija ćelija LPS-om ne zahteva uvek postojanje membranskog CD14 molekula, već je dovoljno i prisustvo solubilne forme ovog molekula (sCD14) (Frey i sar., 1992; Yang i sar., 1996). U FCS-u, koji ulazi u sastav kompletnog medijuma za gajenje ćelija, pokazano je prisustvo LBP i sCD14 (Yang i sar., 1996). Angažovanjem TLR4, pokreće se intracelularni prenos signala koji dovodi do aktivacije određenih transkripcionih faktora i transkripcije gena za brojne molekule čija ekspresija dovodi do promene fenotipskih i funkcijskih karakteristika DC i aktivacije/sazrevanja ovih ćelija (Granucci i sar., 1999; Lu i sar., 2008). Na osnovu prethodno iznetih podataka, jasno je da odgovor ćelije na LPS zavisi od prisustva TLR4, ali i od brojnih drugih molekula čije prisustvo je neophodno za generisanje i prenos intracelularnog signala, a čija promena je moguća sa starenjem (Renshaw i sar., 2002; Jaekal i sar., 2007). Osim toga, starenjem uslovljene promene brojnih drugih regulatornih molekula, čiji zadatak je da spreče prekomerni inflamatorni odgovor ćelije nakon stimulacije LPS-om, bi mogle da utiču na prekomernu aktivaciju DC i pri nižoj ekspresiji TLR4 (Kondo i sar., 2012; Anwar i sar., 2013).

Analiza fenotipskog profila kDC mladih pacova DA soja pokazala je da je stimulacija LPS-om dovela do povećanja ekspresije MHC II i kostimulatornih (CD80 i CD86) molekula. Sa druge strane, prisustvo LPS-a je kod kDC starih životinja povećalo samo ekspresiju CD86 molekula, dok nije uticalo na ekspresiju ostalih ispitivanih markera (MHC II, CD80 i CD40). Iz navedenih rezultata se može zaključiti da su kDC starih DA pacova nakon stimulacije LPS-om imale nezreliji fenotip u poređenju sa kDC mladih DA pacova koje su na isti način tretirane. Nekoliko objašnjenja moglo bi se ponuditi za ovaj nalaz. Prvo, budući da je pokazano da IL-10, delujući autokrino, inhibira sazrevanje DC pod uticajem LPS-a (Corinti i sar., 2001), može se pretpostaviti da je povećana produkcija ovog antiinflamatornog citokina od strane kDC starih životinja stimulisanih LPS-om ograničila sazrevanje ovih ćelija. Drugo, pored povećane koncentracije IL-10, koncentracija proinflamatornog citokina TNF- α , koji povećava

ispoljenosti kostimulatornih molekula na DĆ (Morisson i sar., 2003; Slobodin i sar., 2009), je bila manja u supernatantima kultura kDC starih DA pacova stimuliranih LPS-om u poređenju sa istim ćelijama mladih životinja. Budući da IL-10 negativno reguliše sintezu TNF- α od strane istih ćelija (Corinti i sar., 2001), nalaz niže koncentracije TNF- α u saglasnosti je sa povećanom produkcijom IL-10. Treće, rezultati dobijeni u studijama na humanim DĆ, koji ukazuju na izmenjenu funkcija TLR kod starih osoba, bilo da se radi o ekspresiji ovog molekula ili prenosu signala posredstvom njega (Shaw i sar., 2011), mogu da objasne slabiju aktivaciju i posledično nezreliji fenotip kDC starih DA pacova i pored veće ispoljenosti TLR4 na ovim ćelijama u odnosu na iste ćelije mladih životinja (Shaw i sar., 2011).

5.2.3. Uticaj starenja na kapacitet kDC da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita

Starenje, kod oba soja pacova, dovodi do smanjenja sposobnosti kDC stimuliranih LPS-om da indukuju proliferaciju alogernih T limfocita u ko-kulturi. Podaci dobijeni kod miša i ljudi takođe ukazuju na manji alostimulatorni kapacitet DĆ sa starenjem (Agrawal i sar., 2007a; Agrawal i sar., 2007b; Pereira i sar., 2011; You i sar., 2013). Ovakav nalaz smanjenog alostimulatornog kapaciteta je najverovatnije posledica smanjene ispoljenosti MHC molekula II klase na kDC starih pacova oba soja stimuliranih LPS-om u poređenju sa odgovarajućim ćelijama mladih životinja istog soja. U saglasnosti sa ovom pretpostavkom su podaci da DĆ podsoja miševa koji ubrzano stare (*engl.* senescence-accelerated mouse, SAMP1) imaju, u poređenju sa BALB/c miševima i mladim SAMP1 miševima, sniženu alostimulatornu sposobnost koja se pripisuje sniženoj gustini ispoljenosti MHC II molekula i intercelularnog adhezivnog molekula (*engl.* intercellular adhesion molecule, ICAM) na površini tih ćelija, a ne ekspresiji CD80 i CD86 molekula (Haruna i sar., 1995). Osim toga, kod starih AO pacova smanjeni alostimulatorni kapacitet bi se mogao povezati i sa dominacijom CD4- subpopulacije kDC u kulturi starih pacova u poređenju sa mladim pacovima, budući da je pokazano da su CD4- kDC slabije APC u MLR od CD4+ kDC (Trinite i sar., 2000). Sa druge strane, kod starih DA pacova smanjenja sposobnost stimulacije T limfocita može biti posledica povećane produkcije IL-10 od strane kDC, s

obzirom da je pokazano da on direktno utiče na proliferaciju T limfocita, inhibirajući produkciju IL-2 (de Waal Maleyft i sar., 1993; Mosmann i Sad, 1996).

5.2.4. Uticaj starenja na kapacitet kDC da usmeravaju diferencijaciju alogernih CD4+ T limfocita ka različitim Th efektorskim ćelijama

Prethodno navedeni rezultati ukazuju da je starenje uticalo na sposobnost aktivacije/sazrevanja kDC pacova oba soja u kulturi nakon stimulacije LPS-om i da je taj uticaj bio sojno specifičan. Imajući u vidu da proces sazrevanja ne podrazumeva samo povećavanje ekspresije molekula, već i sekreciju citokina koji su od velikog značaja kako za funkcionisanje urođene imunosti, tako i za usmeravanje diferencijacije T limfocita ka funkcionalno različitim subpopulacijama, u daljim istraživanjima određivana je produkcija citokina od strane kDC kao i citokina produkovanih u ko-kulturi kDC i alogernih CD4+ ćelija, a koji su karakteristični za različite Th subpopulacije.

U poređenju sa kDC mladih AO pacova, posle stimulacije LPS-om nađeni su značajno veći nivoi iRNK za TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 i TGF- β u kDC starih AO pacova i povećana koncentracija TNF- α , IL-6, IL-12 i IL-23 u supernatantima odgovarajućih kultura. Sa druge strane, produkcija IL-10 je bila značajno niža u kulturama kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om, u odnosu na isti način tretirane kDC mladih životinja.

U skladu sa povećanom produkcijom IL-12, koji se smatra najvažnijim citokinom za usmeravanje diferencijacije CD4+ limfocita ka Th1 ćelijama, u supernatantima ko-kultura kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om i alogernih CD4+ T limfocita nađena je povećana koncentracija IFN- γ , najvažnijeg citokina koji karakteriše Th1 ćelije (Gutcher i Becher, 2007), u odnosu na odgovarajuće supernatante ko-kultura mladih životinja. Međutim, i u supernatantima ko-kultura kDC starih AO pacova koje nisu stimulisane LPS-om, koncentracija IFN- γ je bila veća u odnosu na supernatante ko-kultura nestimulisanih kDC mladih životinja, a ove promene nisu bile praćene promenama u koncentraciji IL-12. Tačnije, nije bilo razlike u koncentraciji IL-12 u supernatantima kultura nestimulisanih kDC mladih i starih AO pacova. Imajući u vidu iznete rezultate, nametnula se potreba za pronalaženjem nekih drugih mehanizama koji bi mogli da utiču na produkciju IFN- γ od strane T limfocita u MLR. Prvo, imajući u

vidu da i DĆ mogu da produkuju IFN- γ (Satthaporn i Eremin, 2001), koncentracija ovog citokina merena je u supernatantima kultura kDC. Ova mogućnost je isključena, budući da u supernatantima kultura kDC nije bilo moguće detektovati merljive koncentracije IFN- γ (rezultati nisu prikazani). Drugo, podaci da: 1) produkcija IL-12 od strane DĆ nakon stimulacije TLR agonistima ne korelira nužno sa produkcijom IL-12 koja je indukovana vezivanjem CD40L za CD40 molekul na DĆ (Qi i sar., 2003), 2) je ispoljenost CD40 molekula na DĆ u korelaciji sa njihovom sposobnošću da produkuju IL-12 nakon vezivanja CD40L (Agnello i sar., 2003) i 3) je nađena veća ispoljenost CD40 molekula na kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om, ali isto tako i nestimulisanih u poređenju sa odgovarajućim kDC mladih pacova, može se pretpostaviti da su starošću uslovljene promene ispoljenosti CD40 molekula na nestimulisanim kDC starih AO pacova doprinele da one produkuju više IL-12 u MLR i posledično utiču na povećanu produkciju IFN- γ . Pored toga, i starošću uslovljene promene nekih drugih članova IL-12 familije (Smiths i sar., 2004) ili čak i signalnih puteva koji ne zavise od IL-12 (CD27/CD70 osovina) (Soares i sar., 2007) mogle bi da povećaju sposobnost kDC starih životinja da indukuju Th1 imunski odgovor.

Pored povećane koncentracije IFN- γ , u supernatantima ko-kultura alogenh T limfocita i kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om, nađena je i povećana koncentracija IL-17, citokina koji karakteriše Th17 ćelije (Mills, 2008), u poređenju sa odgovarajućim supernatantima mladih AO pacova. Ovakav rezultat ne iznenađuje s obzirom na ranije pomenute rezultate da kDC starih životinja, nakon stimulacije LPS-om, povećavaju produkciju citokina (IL-6, IL-23 i TGF- β) koji su ključni za usmeravanje diferencijacije T limfocita ka Th17 ćelijama (Torchinsky i Blander, 2010). Naime, IL-6 je važan za početne faze diferencijacije naivnih CD4+ T limfocita u Th17 ćelije, jer indukuje transkripciju gena za IL-17, IL-22 i receptor za IL-23 u ovim ćelijama, tako da je povećana produkcija IL-6 od strane kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om u odnosu na odgovarajuće ćelije mladih pacova, u skladu sa njihovom povećanom sposobnošću usmeravanja diferencijacije limfocita ka Th17 ćelijama. Dalje, u skladu sa povećanom koncentracijom IL-17 u supernatantima ko-kultura alogenh T limfocita i kDC starih AO pacova stimulisanih LPS-om, u poređenju sa odgovarajućim supernatantima ko-kultura mladih AO pacova, je i povećana produkcija IL-23 od strane kDC starih životinja stimulisanih LPS-om u odnosu na

odgovarajuće ćelije mladih. Pokazano je da je IL-23 značajan u kasnijim fazama diferencijacije već usmerenih Th17 ćelija i da je odgovoran za njihovu potpunu aktivaciju i ispoljavanje inflamatornog potencijala (Torchinsky i Blander, 2010).

Imajući u vidu značaj TGF- β u procesu diferencijacije Th17 ćelija ljudi i miševa (Yang i sar., 2008; Perona-Wright i sar., 2009; Ghoreschi i sar., 2010), merena je i ekspresija iRNK za TGF- β i produkcija ovog citokina od strane kDĆ AO pacova oba uzrasta. Nađena je povećana ekspresija gena za TGF- β u kDĆ starih AO pacova stimulisanih LPS-om u odnosu na odgovarajuće kDĆ mladih, dok nije bilo moguće detektovati merljive koncentracije produkta u supernatantima kultura kDĆ AO pacova oba uzrasta stimulisanih LPS-om, kao što je prethodno navedeno. Međutim, budući da postoje podaci da ni IL-6 ni IL-23 ne zahtevaju prisustvo TGF- β da bi efikasno usmerili diferencijaciju T limfocita u pravcu Th17 ćelija (Ghoreschi i sar., 2010) i da je prisustvo IL-6 ključno da bi se diferencijacija T limfocita usmerila ka Th17 ćelijama, a ne ka T reg ćelijama (Yang i sar., 2008; Perona-Wright i sar., 2009), čini se mogućim da je, čak i u odsustvu aktivnog TGF- β , povećana produkcija IL-6 i IL-23 od strane kDĆ starih AO pacova stimulisanih LPS-om dovoljna da usmeri diferencijaciju T limfocita u pravcu Th17 ćelija.

Posle stimulacije LPS-om, u kDĆ starih DA pacova nađeni su značajno veći nivoi iRNK za IL-6, IL-23p19, IL-10 i TGF- β u poređenju sa kDĆ mladih DA pacova stimulisanih na isti način. U skladu sa rezultatima ekspresije gena, bila je i povećana koncentracija IL-6, IL-23 i IL-10 izmerena u supernatantima kultura kDĆ starih DA životinja stimulisanih LPS-om u odnosu na odgovarajuće supernatante mladih pacova istog soja. Sa druge strane, u supernatantima kultura kDĆ starih DA pacova stimulisanih LPS-om izmerena je manja koncentracije TNF- α u odnosu na supernatante kultura kDĆ mladih DA pacova stimulisanih LPS-om. Treba naglasiti da ni uzrast pacova ni stimulacija LPS-om nisu uticali na produkciju IL-12 od strane kDĆ iz kulture.

U poređenju sa odgovarajućim kontrolnim, u supernatantima ko-kultura kDĆ mladih DA pacova stimulisanih LPS-om i alogenih T limfocita izmerena je veća koncentracija IFN- γ . Imajući u vidu prethodno navedene rezultate da LPS ne utiče na produkciju IL-12, koji je od ključne važnosti za usmeravanje diferencijacije T limfocita ka Th1 ćelijama, od strane kDĆ mladih DA pacova, njihova povećana Th1

polarizaciona sposobnost nije bila očekivana. Objašnjenje za ovaj nalaz možda bi moglo da leži u podacima da kDC mladih DA pacova posle stimulacije LPS-om proizvode više TNF- α , za koji je pokazano da može da usmerava diferencijaciju T limfocita ka Th1 ćelijama (Becher i sar., 1999). Osim toga imajući u vidu da starenje nije uticalo na sekreciju IL-12, ali da postoje podaci koji ukazuju da neki molekuli, kao što je NO, mogu da utiču na povećanje ekspresije receptora za IL-12 (Niedbala i sar., 2002) urađena je analiza ekspresije gena za iNOS u kDC. Na osnovu prethodno navedenog, i nalaza da u nestimulisanim kDC mladih DA pacova nije bilo moguće detektovati iRNK za iNOS, a da su nivoi gena za iNOS bili detektabilni nakon stimulacije istih ćelija LPS-om, može se pretpostaviti da je povećana osetljivost alogernih T limfocita na IL-12 doprinela povećanoj produkciji IFN- γ u supernatantima ko-kultura ovih limfocita i kDC mladih DA pacova stimulisanih LPS-om u poređenju sa supernatantima ko-kultura sa nestimulisanim kDC životinja istog uzrasta.

Analiza supernatanta iz ko-kultura alogernih T limfocita i kDC je pokazala da kDC starih DA pacova stimulisane LPS-om, za razliku od odgovarajućih kDC mladih DA pacova, nisu bile efikasne u stimulaciji diferencijacije T limfocita iz MLR u pravcu Th1 ćelija u poređenju sa nestimulisanim kDC pacova istog uzrasta. Tačnije, nije bilo razlika u koncentraciji IFN- γ u supernatantima ko-kultura kDC starih životinja stimulisanih LPS-om u odnosu na odgovarajuće kontrolne supernatante starih DA pacova. Ovaj rezultat nije bio očekivan, s obzirom da je nakon stimulacije LPS-om nivo iRNK za iNOS u kDC starih DA pacova bio 1,3 puta veći u ovim ćelijama u odnosu na kontrolne kDC pacova istog uzrasta.

Objašnjenje bi moglo da leži u podacima da su kDC starih DA pacova nakon stimulacije LPS-om, proizvele veće količine IL-10 i IL-6 u odnosu na nestimulisane kDC životinja istog uzrasta, a ovi citokini su inhibišu sintezu IFN- γ i Th1 polarizaciju (de Waal Maleyft i sar., 1993; Mosmann i Sad, 1996; Lalani i sar., 1997; Diehl i Rincon, 2002).

Konačno treba istaći da se različit uticaj starenja na sposobnost kDC pacova AO i DA soja da usmeravaju diferencijaciju T limfocita u pravcu Th1 ćelija može povezati sa nalazima da kDC starih AO pacova nakon stimulacije LPS-om, za razliku od kDC starih DA pacova, ne povećavaju produkciju IL-10. Suprotno, kDC mladih AO pacova

su nakon stimulacije LPS-om, povećale produkciju ovog citokina i nisu pokazale sposobnost Th1 polarizacije.

Iako kDC starih DA pacova stimulisane LPS-om, u odnosu na nestimulisane kDC životinja istog uzrasta, nisu uticale na povećanje koncentracije IL-17 u supernatantima MLR, nađene su veće koncentracije ovog citokina u supernatantima ko-kultura alogenih T limfocita i kDC starih životinja stimulisanih LPS-om u poređenju sa supernatantima ko-kultura u kojima su stimulatori bile odgovarajuće ćelije mladih životinja. Ovakav nalaz je verovatno posledica povećane produkcije IL-17 od strane alogenih T limfocita stimulisanih kontrolnim kDC starih DA pacova i u saglasnosti je sa povećanom sekrecijom IL-23 i ekspresijom gena za IL-23p19 od strane nestimulisanih kDC starih životinja, koji je važan za održanje produkcije IL-17 u diferenciranim Th17 ćelijama (Oppmann i sar. 2000; McGeachy i sar., 2008; Torchinsky i Blander, 2010). Podaci da sa starošću dolazi do epigenetskih promena strukture hromatina koje utiču na vezivanje transkripcionih faktora za promotor gena za p19 podjedinicu IL-23 (El Mazayen i sar., 2009) u potpunosti podržavaju ovu pretpostavku.

Sa druge strane, izostanak povećanja produkcije IL-17 u ko-kulturama alogenih T limfocita i kDC starih DA pacova stimulisanih LPS-om u odnosu na supernatante ko-kultura odgovarajućih kDC mladih DA pacova, može biti posledica povećane produkcije IL-10 od strane kDC starih pacova stimulisanih LPS-om. Preciznije, pokazano je da IL-10 sprečava diferencijaciju T limfocita u pravcu Th17 ćelija posredstvom inhibicije IL-1 β (Wilke i sar., 2011; Qu i sar., 2012; Coresetti i sar., 2013), tako da duplo manji sadržaj iRNK za IL-1 β nađen u kDC starih DA pacova stimulisanih LPS-om (0.54 ± 0.04) u odnosu na odgovarajuće kDC mladih pacova (0.094 ± 0.06), podržava ovu pretpostavku.

Starenje nije uticalo na sposobnost kDC ispitivanih sojeva da usmeravaju diferencijaciju T limfocita u pravcu Th2 ćelija, budući da nije bilo razlika u koncentracijama IL-4, citokina koji karakteriše Th2 ćelije, u supernatantima ko-kultura alogenih T limfocita i kDC starih AO i DA pacova stimulisanih LPS-om u poređenju sa odgovarajućim ćelijama mladih životinja.

Na osnovu svih prethodno iznetih podataka, moglo bi se zaključiti da su kDC starih AO pacova nakon stimulacije LPS-om u poređenju sa odgovarajućim ćelijama mladih životinja: 1) imale zreliji fenotip (na osnovu povećane ekspresije kostimulatornih molekula); 2) produkovale više TNF- α , IL-12, IL-6 i IL-23, a manje IL-10; 3) ispoljile sposobnost da usmere diferencijaciju CD4+ T limfocita ka Th1/Th17 efektorskim ćelijama i 4) imale manji alostimulatorni kapacitet.

Sa druge strane, kDC starih DA pacova stimulisane LPS-om su u poređenju sa odgovarajućim ćelijama mladih životinja: 1) imale nezreliji fenotip (na osnovu smanjene ekspresije kostimulatornih molekula); 2) produkovale više IL-6, L-23 i IL-10, a manje TNF- α ; 3) bile neefikasne u usmeravanju diferencijacije CD4+ T limfocita ka Th1/Th17 efektorskim ćelijama i 4) imale manji alostimulatorni kapacitet.

5.3. UTICAJ STARENJA NA INDUKCIJU I RAZVOJ EAE-A KOD PACOVA AO I DA SOJA

EAE predstavlja priznati animalni model MS i prototip organ-specifične autoimunske bolesti u čijoj patogenezi značajno mesto pripada Th1 i Th17 efektorskim ćelijama. Dobro je poznato da se sojevi pacova (i glodara uopšte) 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 relativno rezistentne se ubrajaju pacovi BN, AO, PVG i Fisher soja, dok se relativno osetljivim smatraju pacovi Lewis i DA soja (Miljković i Mostarica-Stojković, 2006). Ovakva zapažanja su podstakla brojne autore da tragaju za genetskim i ćelijskim faktorima koji uslovljavaju ove razlike (Fournié i sar., 2001; Miljković i Mostarica-Stojković, 2006; Miljković i sar., 2006; Marković i sar., 2009; Mensah-Brown i sar., 2011), kao i da pokušaju da pronađu povezanost između fenotipskih karakteristika ćelija uključenih u patogenezu bolesti i karakteristika bolesti (fenotipa bolesti) (Fournié i sar., 2001; Andersson i sar., 2004).

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, a naročito rezultate dobijene *in vitro*, koji ukazuju na starenjem uslovljene promene u ekspresiji gena za citokine koji usmeravaju diferencijaciju CD4+ limfocita u ćelije Th1/Th17 citokinskog profila,

poslednji segment ove studije se odnosio na ispitivanje osetljivosti starih AO i DA pacova na indukciju i razvoj EAE-a.

U skladu sa literaturnim podacima (Mostarica-Stojković i sar., 1982; Lukić i sar., 2001; Stošić-Grujičić i sar., 2004), pokazano je da su odrasle mlade ženke DA pacova osetljive, dok su ženke AO soja istog uzrasta bile relativno rezistentne na indukciju EAE-a. Starenje, u zavisnosti od soja, različito utiče na indukciju i razvoj EAE-a. Preciznije, starenjem pacovi AO soja postaju osetljiviji, a pacovi DA soja manje osetljivi na indukciju ove organ specifične autoimunske bolesti. Ovakav nalaz ne izenađuje, s obzirom da je ranije pokazano da je kod glodara sa starenjem moguća promena podložnosti razvoju EAE-a i kliničke slike bolesti 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 EAE imao karakter hronične relapsirajuće bolesti, za razliku od monofaznog akutnog oblika koji se razvija kod mladih životinja (Ludowyk i sar., 1993).

Različit uticaj starenja na indukciju i razvoj EAE-a kod AO i DA pacova razmatran je u svetlu nađenih promena kDC⁺ starih AO i DA pacova, kako sveže izolovanih, tako i stimulisanih *in vitro* LPS-om. Pre svega, zastupljenost različitih populacija i subpopulacija pacovskih DC⁺ se dovodi u vezu sa njihovom sklonošću da usmeravanju Th ćelijskog odgovor u određenom pravcu i posledično osetljivošću tih životinja na razvoj nekih autoimunskih bolesti (Hubert i sar., 2006). Tako, kod BN pacova, koji su podložni Th2 posredovanim bolestima, dominantu subpopulaciju DC⁺ u slezini čine CD4⁺ kDC⁺, dok je kod Lewis pacova, koji su skloni Th1 posredovanim bolestima, populacija pDC⁺ najzastupljenija (Hubert i sar., 2006). Ranije pomenuti nalazi ove doktorske studije, koji se odnose na zastupljenost različitih subpopulacija u okviru sveže izolovanih slezinskih kDC⁺ mladih pacova, u potpunosti podržavaju navode iz literature. Kod mladih AO pacova, koji su rezistentni na indukciju EAE-a, dominira CD4⁺ subpopulacija kDC⁺ koja produkuje male količine proinflamatornih citokina, dok je kod osetljivog DA soja nađena veća zastupljenost CD4⁻ subpopulacije kDC⁺, koju karakteriše produkcija velike količine proinflamatornih citokina. U svetlu tih rezultata, nađena promena odnosa subpopulacija kDC⁺ kod starih AO pacova u korist CD4⁻ subpopulacije kDC⁺, može se povezati sa njihovom većom osetljivošću na indukciju

EAE-a. Sa druge strane, stari DA pacovi su postali rezistentniji na indukciju bolesti, iako je odnos subpopulacija kDC⁺ ostao nepromenjen. Nekoliko objašnjenja moglo bi se ponuditi za ovaj nalaz. Prvo, moguće je da su kod DA pacova, za razliku od AO pacova gde su sa starenjem bile zastupljenije promene na populacionom nivou, starenjem uslovljene promene na ćelijskom nivou uticale na osetljivost ovih životinja na indukciju EAE-a. Ovde se pre svega misli na promenu produkcije citokina koji polarizuju odgovor T limfocita od strane kDC⁺, što može biti posledica promene samih kDC⁺ sa starenjem, ali isto tako i ćelija iz njihovog okruženja (Castle, 2000; Pulendran i sar., 2004; Chelvarajan i sar., 2005; Agrawal i sar., 2007b; Liao i sar., 2007; Panda i sar., 2010;). Drugo, imajući u vidu da pDC⁺ mogu proizvoditi IL-12 i uticati na polarizaciju u pravcu Th1 imunskog odgovora, ne može se isključiti mogućnost da je promena zastupljenosti i/ili funkcije pDC⁺ kod starih DA pacova, koje nisu bile obuhvaćene ovom studijom, mogla da utiče na podložnost razvoju bolesti koje su posredovane ovim tipom ćelijskog odgovora (Hubert i sar., 2004; Hubert i sar., 2006).

Podaci da se kod zdravih osoba nalaze autoreaktivni mijelin-specifični T limfociti (Fletcher i sar., 2010) ukazuju na veliki značaj regulatornih mehanizama koji sprečavaju razvoj autoimunskog procesa. Takođe, pretpostavlja se da je rezistencija na indukciju EAE-a aktivan proces koji se odvija u perifernim limfnim organima rezistentnih životinja u koji su uključeni brojni geni, pre svega oni koji kodiraju MHC molekule, ali i drugi (Miljković i Mostarica-Stojković, 2006). Pokazano je da genotip APC⁺ može da utiče na osetljivost životinja na indukciju EAE-a, i da su geni koji kodiraju MHC molekule od velikog značaja (Miljković i Mostarica-Stojković, 2006). U skladu sa tim podacima, moglo bi se pretpostaviti da su DC⁺ mladih AO pacova, koji su rezistentni na indukciju EAE-a, uspešnije u obavljanju tolerogene funkcije od DC⁺ mladih DA pacova koji su osetljivi na indukciju ove bolesti. S tim u vezi, promenjena osetljivost na indukciju EAE-a kod starih životinja ispitivanih sojeva, mogla bi da bude rezultat promenjenih fenotipskih i funkcijskih karakteristika DC⁺ tj. njihovog tolerogenog potencijala.

U kontekstu rezultata prikazanih u ovoj studiji, a koji su pokazali da sveže izolovane kDC⁺ starih AO pacova imaju nezreliji fenotip, pretpostavka da su one sa starenjem izgubile tolerogenu funkciju ne deluje na prvi pogled logično. Međutim, podaci iz literature da nezreliji maturacioni status DC⁺ može biti povezan sa defektom u

indukciji T reg ćelija i razvojem autoimunosti (Deleamarre i sar., 1999), kao i ranije navedeni rezultati iz ove studije da kDĆ starih AO pacova, nakon aktivacije *in vitro*, proizvode veće količine citokina ključnih za usmeravanje diferencijacije T limfocita ka ćelijama Th1/Th17 citokinskog profila u poređenju sa kDĆ mladih pacova, bi mogli da idu u prilog ove pretpostavke.

Sa druge strane, budući da su stare životinje DA soja bile rezistentnije na indukciju EAE-a, pretpostavka je da su kDĆ ovih pacova sa starenjem postale „tolerogenije“ u poređenju sa kDĆ mladih životinja. Naime, sveže izolovane kDĆ starih DA pacova su imale zreliji fenotip u poređenju sa istim ćelijama mladih životinja, ali su proizvodile više IL-10. Može se pretpostaviti da je upravo povećana produkcija IL-10 od strane ovih ćelija ključna za ostvarivanje njihove tolerogene funkcije, što je u skladu i sa podacima iz literature (Steinman i sar., 2003). Treba istaći da su kDĆ starih DA pacova i nakon aktivacije *in vitro* zadržale sposobnost povećane produkcije IL-10 i da su bile neefikasne u usmeravanju diferencijacije T limfocita ka Th1/Th17 subpopulaciji. Podaci iz literature podržavaju ove pretpostavke i ukazuju na značaj IL-10 u sprečavanju razvoja EAE-a (Zhou i sar., 2014). Naime, pokazano je da DĆ pacova stimulirane *in vitro* LPS-om proizvode velike količine IL-10, i da, nakon intraperitonealnog davanja, sprečavaju razvoj EAE-a kod pacova (Zhou i sar., 2014).

Svi prethodno navedeni rezultati ukazuju da starenje, u zavisnosti od soja, različito utiče na razvoj EAE-a, koji je prototip za organ specifične autoimunske bolesti posredovane Th1/Th17 limfocitima. Starenjem pacovi AO soja, koji su relativno rezistentni na indukciju EAE-a u ranom adultnom uzrastu, postaju osetljiviji na indukciju EAE-a, dok pacovi DA soja, koji su ranom adultnom uzrastu osetljivi na indukciju EAE-a, pokazuju značajno smanjenje osetljivosti. Ove promene u osetljivosti na indukciju EAE-a koreliraju sa starenjem uslovljenim promenama u ekspresiji gena za citokine koji usmeravaju diferencijaciju CD4⁺ limfocita u ćelije Th1/Th17 citokinskog profila.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

I Starenje menja fenotipske i funkcijske karakteristike sveže izolovanih kDC⁺ pacova i te promene su sojno specifične. Preciznije, starenje dovodi do:

1. veće zastupljenosti CD4⁻ ćelija u populaciji kDC⁺ starih pacova AO soja (za razliku od mladih životinja kod kojih je brojnija CD4⁺ subpopulacija), a ne utiče na zastupljenost subpopulacija kDC⁺ sa različitom ekspresijom CD4 molekula kod pacova DA soja, tako da je kod njih u oba uzrasta dominantna CD4⁻ subpopulacija;
2. promene fenotipskih karakteristika kDC⁺ ćelija, tako da ove ćelije starih pacova AO soja pokazuju nezreliji fenotip, a starih pacova DA soja zreliji fenotip, u odnosu na ove ćelije koje su izolovane iz mladih životinja odgovarajućeg soja;
3. promena u ekspresiji iRNK za citokine kod pacova oba soja, s tim što su te promene suprotne kada je u pitanju iRNK za IL-6 i IL-1 β (starenje smanjuje ekspresiju iRNK za IL-6, a povećava ekspresiju iRNK za IL-1 β kod AO pacova), različite (iRNK za IL-10 raste kod DA, a ne menja se kod AO pacova) ili slične (ekspresija TNF- α se povećava kod oba soja pacova, a iRNK za TGF- β se značajno ne menja);
4. promene endocitoznog kapaciteta kDC⁺ (merene preuzimanjem dekstrana), tako da se on povećava kod pacova AO soja, a smanjuje se kod pacova DA soja.

II Starenje utiče na sposobnost aktivacije/sazrevanja kDĆ pacova oba soja u kulturi nakon stimulacije lipopolisaharidom (LPS), s tim što je taj uticaj sojno specifičan. Preciznije, starenje:

1. sudeći prema nivou površinske ekspresije kostimulatornih molekula (CD80, CD86 i CD40), povećava sposobnost sazrevanja kDĆ pacova AO soja u odgovoru na LPS u kulturi, a smanjuje sposobnost sazrevanja kDĆ pacova DA soja pod istim eksperimentalnim uslovima;
2. kod oba soja pacova, dovodi do smanjenja sposobnosti kDĆ da indukuju proliferaciju alogernih CD4+ T limfocita u ko-kulturi, što se može povezati sa smanjenjem gustine površinske ekspresije MHC molekula II klase na ovim ćelijama;
3. dovodi do sojno specifičnih promena u sintezi i sekreciji citokina koji su važni za usmeravanje diferencijacije naivnih CD4+ T limfocita, tako da se kod pacova AO soja povećava sinteza i sekrecija IL-6 i IL-23, ključnih citokina za diferencijaciju Th17 limfocita, ali i IL-12 i TNF- α , koji usmeravaju diferencijaciju naivnih CD4 limfocita u Th1 limfocite, a smanjuje sinteza i sekrecija IL-10, dok se kod pacova DA soja, pored povećanja sinteze i sekrecije IL-6 i IL-23 povećava i sinteza i sekrecija IL-10, a smanjuje TNF- α , dok sinteza i sekrecija IL-12 ostaje na onom nivou koji je izmeren kod mladih pacova;
4. povećava nivo IFN- γ (citokina koji karakterše Th1 limfocite) i IL-17 (citokina koji je specifičan za sekretorni profil Th17 limfocita) u ko-kulturi alogernih CD4+ limfocita i kDĆ pacova AO soja, dok u ko-kulturi alogernih CD4+ limfocita i kDĆ pacova DA soja, uprkos nepromenjenoj/povećanoj sekreciji citokina koji usmeravaju diferencijaciju naivnih CD4+ limfocita ka ćelijama Th1/Th17 fenotipa ne dovodi do značajnog povećanja nivoa IFN- γ i IL-17, makar delimično usled povećane sekrecije IL-10 iz kDĆ.

III Starenje, u zavisnosti od soja, različito utiče na razvoj EAE-a, koji je prototip za organ specifične autoimunske bolesti posredovane Th1/Th17 limfocitima. Starenjem pacovi AO soja, koji su relativno rezistentni na indukciju EAE-a u ranom adultnom uzrastu, postaju osetljiviji na indukciju EAE, dok pacovi DA soja, koji su ranom adultnom uzrastu osetljivi na indukciju EAE-a pokazuju značajno smanjenje osetljivosti. Ove promene u osetljivosti na indukciju EAE koreliraju sa starenjem uslovljenim promenama u ekspresiji gena za citokine koji usmeravaju diferencijaciju CD4+ limfocita u ćelije Th1/Th17 citokinskog profila.

U celini, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji:

- Doprinosu boljem razumevanju promena u funkciji DĆ, kao profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija sa važnom ulogom u započinjanju, održavanju i regulaciji imunskog odgovora kod starih jedinki.
- Ukazuju 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 sugerise značaj genetskih faktora u imunopatologiji koja se javlja kod starih.
- 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.
- Ukazuju na neke od celularnih i molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi promena koje se uočavaju kod DĆ starih eksperimentalnih životinja, što bi moglo da predstavlja 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.

7. LITERATURA

Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147-161.

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;178:6912-6922.

Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 2007b;42:421-426.

Agrawal A, Agrawal S, Tay J, Gupta S. Biology of dendritic cells in aging. *J Clin Immunol* 2008;28:14-20.

Agrawal A, Sridharan A, Prakash S, Agrawal H. Dendritic cells and aging: consequences for autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol* 2012;8:73-80.

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;182:1138-1145.

Agrawal A, Tay J, Yang GE, Agrawal S, Gupta S. Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity. *Aging* 2010;2:93-100.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;404:193-197.

Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol* 2011;11:375-388.

Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcao RR, et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol* 2011;72:319-329.

Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Sobrino F, Santa-Maria C. Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils. *Clin Exp Immunol* 2001;124:95-102.

Andersson A, Kokkola R, Wefer J, Erlandsson-Harris H, Harris RA. Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. *J Leukoc Biol* 2004;76:1118-1124.

Anjuere F, Martin P, Ferrero I, Fraga ML, del Hoyo GM, Wright N, et al. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 1999;93:590-598.

Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 2013;45:e11.

Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993;362:761-763.

Aspinall R, Goronzy JJ. Immune senescence. *Curr Opin Immunol* 2010;22:497-499.

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.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669-692.

Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007;120:435-446.

Bach JF, Bendelac A, Brenner MB, Cantor H, De Libero G, Kronenberg M, et al. The role of innate immunity in autoimmunity. *J Exp Med* 2004;200:1527-1531.

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

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.

Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 2008;56:711-721.

Becher B, Blain M, Giacomini PS, Antel JP. Inhibition of Th1 polarization by soluble TNF receptor is dependent on antigen-presenting cell-derived IL-12. *Journal of immunology* 1999;162:684-688.

Berthier R, Martinon-Ego C, Laharie AM, Marche PN. A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes. *J Immunol Methods* 2000;239:95-107.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.

Bhushan M, Cumberbatch M, Dearman RJ, Andrew SM, Kimber I, Griffiths CE. Tumour necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *Br J Dermatol* 2002;146:32-40.

Biasi D, Carletto A, Dell'Agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, et al. Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. *Inflammation* 1996;20:673-681.

Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540-1543.

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;75:342-349.

Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, et al. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 1999;34:253-265.

Brenan M, Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med* 1992;175:1457-1465.

Brinster C, Shevach EM. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4⁺CD25⁺ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* 2005;175:7332-7340.

Brissette-Storkus CS, Kettel JC, Whitham TF, Giezeman-Smits KM, Villa LA, Potter DM, et al. Flt-3 ligand (FL) drives differentiation of rat bone marrow-derived dendritic cells expressing OX62 and/or CD161 (NKR-P1). *J Leukoc Biol* 2002;71:941-949.

Brockner T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997;185:541-550.

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

Burkle A, Caselli G, Franceschi C, Mariani E, Sansoni P, Santoni A, et al. Pathophysiology of ageing, longevity and age related diseases. *Immun Ageing* 2007;4:4.

Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, et al. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol* 2001;70:881-886.

Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infec Dis* 2000;31:578-585.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782-787.

Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 2007;5:e201.

Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol* 2000;30:1113-1119.

Chatta GS, Dale DC. Aging and haemopoiesis. Implications for treatment with haemopoietic growth factors. *Drugs Aging* 1996;9:37-47.

Chelvarajan RL, Collins SM, Van Willigen JM, Bondada S. The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *J Leukoc Biol* 2005;77:503-512.

Chen F, Liu Z, Wu W, Rozo C, Bowdridge S, Millman A, et al. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med* 2012;18:260-266.

Chen J, Astle CM, Harrison DE. Genetic regulation of primitive hematopoietic stem cell senescence. *Exp Hematol* 2000;28:442-450.

Chen X, Makala LH, Jin Y, Hopkins D, Muir A, Garge N, et al. Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clin Immunol* 2008;129:413-418.

Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med* 2004;200:1519-24.

Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 2006;3:10.

Choi KL, Sauder DN. Epidermal Langerhans cell density and contact sensitivity in young and aged BALB/c mice. *Mech Ageing Dev* 1987;39:69-79.

Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:972865.

Cikota B, Janezic A, Magic Z. [Quantification of gene expression using the polymerase chain reaction]. *Vojnosanit Pregl* 2002;59:551-556.

Colic M, Jandric D, Stojic-Vukanic Z, Antic-Stankovic J, Popovic P, Vasilijic S, et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro using granulocyte-macrophage colony stimulating factor and low concentration of interleukin-4. *Vojnosanit Pregl* 2003;60:531-538.

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 2011;164:1079-1106.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 2007;82:1365-1374.

Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001;166:4312-4318.

Corsetti PP, de Almeida LA, Carvalho NB, Azevedo V, Silva TM, Teixeira HC, et al. Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. *PloS One* 2013;8:e74729.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33:375-386.

D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 2003;198:293-303.

de Haan G, Nijhof W, Van Zant G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* 1997;89:1543-1550.

de Haan G, Van Zant G. Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood* 1999;93:3294-3301.

de Heusch M, Oldenhove G, Urbain J, Thielemans K, Maliszewski C, Leo O, et al. Depending on their maturation state, splenic dendritic cells induce the differentiation of CD4(+) T lymphocytes into memory and/or effector cells in vivo. *Eur J Immunol* 2004;34:1861-1869.

de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Sem Immunopathol* 2005;26:289-307.

de la Mata M, Riera CM, Iribarren P. Identification of a CD8alpha(+) dendritic cell subpopulation in rat spleen and evaluation of its OX-62 expression. *Clin Immunol* 2001;101:371-378.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *The J Exp Med* 1996;184:1413-1424.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.

Delemarre FG, Simons PJ, de Heer HJ, Drexhage HA. Signs of immaturity of splenic dendritic cells from the autoimmune prone biobreeding rat: consequences for the in vitro expansion of regulator and effector T cells. *J Immunol* 1999;162:1795-1801.

Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, Saresella M, et al. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol* 2007;122:220-228.

Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India* 2010;27:66-71.

Dimmeler S, Vasa-Nicotera M. Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2081-2082.

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:233-238.

Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002;39:531-536.

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

Dolle ME, Busuttill RA, Garcia AM, Wijnhoven S, van Drunen E, Niedernhofer LJ, et al. Increased genomic instability is not a prerequisite for shortened lifespan in DNA repair deficient mice. *Mutat Res* 2006;596:22-35.

Drakesmith H, Chain B, Beverley P. How can dendritic cells cause autoimmune disease? *Immunol Today* 2000;21:214-217.

Dubsky P, Ueno H, Piqueras B, Connolly J, Banchereau J, Palucka AK. Human dendritic cell subsets for vaccination. *J Clin Immunol* 2005;25:551-572.

Durancik DM, Hoag KA. The identification and enumeration of dendritic cell populations from individual mouse spleen and Peyer's patches using flow cytometric analysis. *Cytometry A* 2009;75:951-959.

Eissler R, Schmaderer C, Rusai K, et al. Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens Res* 2011;34:551-558.

El Mezayen R, El Gazzar M, Myer R, High KP. Aging-dependent upregulation of IL-23p19 gene expression in dendritic cells is associated with differential transcription factor binding and histone modifications. *Aging Cell* 2009;8:553-565.

El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5:189-197.

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

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996;156:5-7.

Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010;162:1-11.

Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev* 2003;124:487-493.

Fortin CF, Larbi A, Dupuis G, Lesur O, Fulop T, Jr. GM-CSF activates the Jak/STAT pathway to rescue polymorphonuclear neutrophils from spontaneous apoptosis in young but not elderly individuals. *Biogerontology* 2007;8:173-187.

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;184:145-160.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-254.

Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 2007;128:92-105.

Frasca D, Blomberg BB. Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol* 2011;31:430-435.

Frasca D, Van der Put E, Riley RL, Blomberg BB. Reduced Ig class switch in aged mice correlates with decreased E47 and activation-induced cytidine deaminase. *J Immunol* 2004;172:2155-2162.

Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;176:1665-1671.

Fujihashi K, McGhee JR. Mucosal immunity and tolerance in the elderly. *Mech Ageing Dev* 2004;125:889-898.

Fulop T, Jr., Foris G, Worum I, Leovey A. Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol* 1985;61:425-432.

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Levesque I, Varin A, Herbein G. Cytokine receptor signalling and aging. *Mech Ageing Dev* 2006;127:526-537.

Fulop T, Larbi A, Kotb R, de Angelis F, Pawelec G. Aging, immunity, and cancer. *Discov Med* 2011;11:537-550.

Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol* 1997;98:512-519.

Gallo PM, Gallucci S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol* 2013;4:138.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001;13:114-119.

Geiger H, Rudolph KL. Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. *Trends Immunol* 2009;30:360-365.

Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:453-460.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467:967-971.

Gilchrest BA, Murphy GF, Soter NA. Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1982;79:85-88.

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;127:257-263.

Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005;435:590-597.

Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol* 2006;41:246-251.

Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:133-145.

Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 2002;169:7104-7110.

Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect* 1999;1:1079-1084.

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;61:1039-1047.

Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39:42-50.

Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *Journal Pathol* 2007;211:144-156.

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621-667.

Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2002;277:32124-32132.

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

Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 2007;117:1119-1127.

Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci* 2010;11:789-806.

Harrison DE, Astle CM, Stone M. Numbers and functions of transplantable primitive immunohematopoietic stem cells. Effects of age. *J Immunol* 1989;142:3833-3840.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;90:3245-3287.

Haruna H, Inaba M, Inaba K, Taketani S, Sugiura K, Fukuba Y, et al. Abnormalities of B cells and dendritic cells in SAMP1 mice. *Eur J Immunol* 1995;25:1319-1325.

Hasler P, Zouali M. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol* 2005;233:102-108.

Hawkley LC, Cacioppo JT. Stress and the aging immune system. *Brain Behav Immun* 2004;18:114-119.

Haynes L, Linton PJ, Eaton SM, Tonkonogy SL, Swain SL. Interleukin 2, but not other common gamma chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med* 1999;190:1013-1024.

Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47-64.

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001;167:741-748.

High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004;3:1-14.

Hornsby PJ. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol* 2007;42:575-581.

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;177:1007-1016.

Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II⁺ CD4⁺CD11b⁻OX62⁻ and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 2004;172:7485-7494.

Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 2013;4:82.

Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, et al. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major

histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3038-3042.

Indrasingh I, Chandi G, Jeyaseelan L, Vettivel S, Chandi SM. Quantitative analysis of CD1a (T6) positive Langerhans cells in human tonsil epithelium. *Ann Anat* 1999;181:567-572.

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;190:229-239.

Jaekal J, Abraham E, Azam T, Netea MG, Dinarello CA, Lim JS, et al. Individual LPS responsiveness depends on the variation of toll-like receptor (TLR) expression level. *J Microb Biotechnol* 2007;17:1862-1867.

Jakubzick C, Bogunovic M, Bonito AJ, Kuan EL, Merad M, Randolph GJ. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *J Exp Med* 2008;205:2839-2850.

Janeway C, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.

Jing Y, Shaheen E, Drake RR, Chen N, Gravenstein S, Deng Y. Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol* 2009;70:777-784.

Johnson TE. Recent results: biomarkers of aging. *Exp Gerontol* 2006;41:1243-1246.

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;185:6783-6794.

Josien R, Heslan M, Soulillou JP, Cuturi MC. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J Exp Med* 1997;186:467-472.

Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, Lu TT, Ware CF, Cyster JG. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 2005;22:439-450.

Kacew S, Festing MF. Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. *J Toxicol Environ Health* 1996;47:1-30.

Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:5688-5694.

Kallen B, Nilsson O. Age as a factor determining susceptibility for experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Int Arch Allergy App Immunol* 1989;90:16-19.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-993.

Karni A, Abraham M, Monsonogo A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, et al. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 2006;177:4196-4202.

Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2003;198:305-313.

Katz JM, Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Lu X, Tumpey TM, Sambhara S. Immunity to influenza: the challenges of protecting an aging population. *Immunol Res* 2004;29:113-124.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191-197.

Klinkert WE, LaBadie JH, O'Brien JP, Beyer CF, Bowers WE. Rat dendritic cells function as accessory cells and control the production of a soluble factor required for mitogenic responses of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:5414-5418.

Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001;98:2043-2051.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672.

Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 2012;33:449-458.

Kovačević-Jovanović V, Mitić K, Stanojević S, Miletić T, Vujić V, Dimitrijević M. Production of H₂O₂ and NO by rat peritoneal macrophages in response to gut commensal bacteria. *Acta Vet* 2009;59:111-122.

Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006;443:453-457.

Krishnaraj R, Bhooma T. Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. 2. IL2-induced interferon gamma secretion. *Immunol Lett* 1996;50:59-63.

Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 2008;205:1535-1541.

Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1325-1334.

Kurban RS, Bhawan J. Histologic changes in skin associated with aging. *J Dermatol Surg Oncol* 1990;16:908-914.

Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79:469-83.

Lande R, Gafa V, Serafini B, Giacomini E, Visconti A, Remoli ME, et al. Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:388-401.

Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biology* 2003;73:49-56.

Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 2001;13:291-298.

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.

Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 2010;9:527-535.

Lecoecur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997;209:111-123.

Lee JS, Lee WW, Kim SH, Kang Y, Lee N, Shin MS, et al. Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans. *Clin Immunol* 2011;140:84-91.

Leslie RD, Delli Castelli M. Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications. *Diabetes* 2004;53:3033-40.

Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in aged F344 rats. *J Gerontol* 1976;31:271-274.

Li G, Smithey MJ, Rudd BD, Nikolich-Zugich J. Age-associated alterations in CD8 α + dendritic cells impair CD8 T-cell expansion in response to an intracellular bacterium. *Aging Cell* 2012;11:968-977.

Liao HF, Yang YC, Chen YY, Hsu ML, Shieh HR, Chen YJ. Macrophages derived from bone marrow modulate differentiation of myeloid dendritic cells. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:104-111.

Linton PJ, Li SP, Zhang Y, Bautista B, Huynh Q, Trinh T. Intrinsic versus environmental influences on T-cell responses in aging. *Immunol Rev* 2005;205:207-219.

Liu FJ, Wen T, Liu L. MicroRNAs as a novel cellular senescence regulator. *Ageing Res Rev* 2012;11:41-50.

Liu J, Beller D. Aberrant production of IL-12 by macrophages from several autoimmune-prone mouse strains is characterized by intrinsic and unique patterns of NF-kappa B expression and binding to the IL-12 p40 promoter. *J Immunol* 2002;169:581-586.

Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 2002;196:1091-1097.

Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 2010;234:45-54.

Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009;324:392-397.

Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 2007;8:578-583.

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;161:1146-1155.

Lopez C, Comabella M, Al-zayat H, Tintore M, Montalban X. Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J Neuroimmunol* 2006;175:183-191.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145-151.

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;48:121-134.

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.

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445-449.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-5079.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionic A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512-4520.

Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:575-584.

Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yarilina A, Cortesini R, Mancini D, Suci-Foca N. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;11:245-258.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001;97:3333-3341.

Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953-1962.

Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol* 2002;32:1524-1529.

Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol* 2009;47:141-146.

Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:188-211.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.

McBride JM, Jung T, de Vries JE, Aversa G. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 2002;215:162-172.

McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 2008;28:445-453.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1035:104-116.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 2002;195:221-231.

McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 2005;79:17-27.

Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol* 2011;232:68-74.

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, Mijatovic S, Popadic D, Cvetkovic I, Mostarica-Stojkovic M. 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;84:379-388.

Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 2008;38:2636-2649.

Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Effects of aging on the common lymphoid progenitor to pro-B cell transition. *J Immunol* 2006;176:1007-1012.

Molne J, Jansson S, Ericson LE, Nilsson M. Adherence of RFD-1 positive dendritic cells to the basal surface of thyroid follicular cells in Graves' disease. *Autoimmunity* 1994;17:59-71.

Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 2006;443:448-452.

Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, Tough DF. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 2002;99:3263-3271.

Montoya-Ortiz G. Immunosenescence, aging, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis* 2013;2013:267078.

Moser M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity* 2003;19:5-8.

Morrison RS, 3rd, Cruse JM, Wang H, Lewis RE. Dendritic cell differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor-alpha. *Exp Mol Pathol* 2003;75:228-237.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.

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* 1982a;149:699-702.

Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clin Exp Immunol* 1982b;50:311-317.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002;297:1867-1870.

Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 2008;86:439-452.

Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, Shortman K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 2006;7:663-671.

Niedbala W, Wei XQ, Campbell C, Thomson D, Komai-Koma M, Liew FY. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16186-16191.

Nikolich-Zugich J. T cell aging: naive but not young. *J Exp Med* 2005;201:837-840.

Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, 3rd, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging* 2013;5:725-740.

Nuyts AH, Lee WP, Bashir-Dar R, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? *Mult Scler* 2013;19:995-1002.

Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J Clin Immunol* 2010;30:806-813.

Olivieri F, Rippo MR, Prattichizzo F, Babini L, Graciotti L, Recchioni R, Procopio AD. Toll like receptor signaling in "inflammaging": microRNA as new players. *Immun Ageing* 2013;10:11.

Olsson J, Wikby A, Johansson B, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev* 2000;121:187-201.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-725.

Pachowka M, Makula J, Korczak-Kowalska G. Diminished cytokines gene expression in lymphoid organs of healthy aged rats. *Cytokine* 2011;54:24-28.

Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, e Lord JM, Shaw AC. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009;30:325-333.

Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, Chen S, Towle V, Belshe RB, Fikrig E, Allore HG, Montgomery RR, Shaw AC. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010;184:2518-2527.

Parham P. Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol Rev* 2006;214:155-160.

Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M, Hirano T. IL-6 regulates in vivo

dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173:3844-3854.

Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001;124:480-492.

Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 2005;205:257-268.

Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 2002;7:d1056-1183.

Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A. Immunosenescence and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;75:165-172.

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;132:187-194.

Perona-Wright G, Jenkins SJ, O'Connor RA, Zienkiewicz D, McSorley HJ, Maizels R et al. A pivotal role for CD40-mediated IL-6 production by dendritic cells during IL-17 induction in vivo. *J Immunol* 2009;182:2808-2815.

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 2002;16:779-790.

Pietschmann P, Hahn P, Kudlacek S, Thomas R, Peterlik M. Surface markers and transendothelial migration of dendritic cells from elderly subjects. *Exp Gerontol* 2000;35:213-224.

Pinto LA; Castro BG, Pereira Soares MB, Rios Grassi MF. An evaluation of the spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells in HTLV-1-infected individuals using flow cytometry. *ISRN Oncology*. doi: 10.5402/2011/326719.

Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 2005;11:252-253.

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004;3:161-167.

Probst HC, Muth S, Schild H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur J Immunol* 2014;44:927-933.

Proietto AI, Mittag D, Roberts AW, Sprigg N, Wu L. The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34(+) stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cell Mol Immunol* 2012;9:446-454.

Pulendran B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 2004;29:187-196.

Qi H, Denning TL, Soong L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* 2003;71:3337-3342.

Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* 2012;40:761-770.

Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003;3:569-581.

Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunology* 2006;6:476-483.

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;169:4697-4701.

Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *J Exp Med* 1935;61:689-702.

Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:285-294.

Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 2003;111:725-740.

Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007;447:725-729.

Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999;96:701-712.

Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006;108:1435-1440.

Salam N, Rane S, Das R, Faulkner M, Gund R, Kandpal U, et al. T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res* 2013;138:595-608.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-440.

Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998;28:2760-2769.

Sathe P, Shortman K. The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* 2008;1:425-431.

Satthaporn S, Eremin O. Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb* 2001;46:9-19.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191:423-434.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878-888.

Schlecht G, Mouries J, Poitrasson-Riviere M, Leclerc C, Dadaglio G. Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo. *Int Immunol* 2006;18:445-452.

Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 2012;3:274.

Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003;19:59-70.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-126.

Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010;22:507-513.

Shaw AC, Panda A, Joshi SR, Qian F, Allore HG, Montgomery RR. Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev* 2011;10:346-353.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-161.

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:19-30.

Shurin MR, Shurin GV, Chatta GS. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:90-105.

Slobodin G, Kessel A, Peri R, Zaigraikin N, Rozenbaum M, Rosner I, et al. Etanercept impairs maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibiting the autocrine TNF α -mediated signaling. *Inflammation* 2009;32:146-150.

Smits HH, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2005;26:123-129.

Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, et al. A subset of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN- γ by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* 2007;204:1095-1106.

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;24:331-341.

Stanojevic S, Mitic K, Vujic V, Kovacevic-Jovanovic V, Dimitrijevic M. The influence of stress and methionine-enkephalin on macrophage functions in two inbred rat strains. *Life Sci* 2007;80:901-909.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191:411-416.

Stephens RJ, Ritchie JM, Harrison LC. Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2002;168:5032-5041.

Stichel CC, Luebbert H. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging* 2007;28:1507-1521.

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.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 2008;14:337-342.

Summers de Luca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol* 2012;12:339-351.

Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004;172:4410-4417.

Swain SL, Nikolich-Zugich J. Key research opportunities in immune system aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:183-186.

Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 2001;184:129-135.

Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 2010;234:142-162.

Takeuchi C, Yamagata K, Takemiya T. Variation in experimental autoimmune encephalomyelitis scores in a mouse model of multiple sclerosis. *World J Neurol* 2013; 3(3):56-61.

Tan SY, Cavanagh LL, d'Advigor W, Shackel N, Fazekas de St Groth B, Weninger W. Phenotype and functions of conventional dendritic cells are not compromised in aged mice. *Immunol Cell Biol* 2012;90:722-732.

Tan J, O'Neill H. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 2005;78(2):319-324.

Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000;121:77-88.

Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1467-1477.

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;5:473-486.

Thomas R, MacDonald KP, Pettit AR, Cavanagh LL, Padmanabha J, Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 1999;66:286-292.

Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-304.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol* 2003;3:133-146.

Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 2000;165:4202-4208.

Turnbull E, MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev* 2001;184:58-68.

Turnbull EL, Yrlid U, Jenkins CD, Macpherson GG. Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo. *J Immunol* 2005;174:1374-1384.

Uciechowski P, Kahmann L, Plumakers B, Malavolta M, Mocchegiani E, Dedoussis G, et al. TH1 and TH2 cell polarization increases with aging and is modulated by zinc supplementation. *Exp Gerontol* 2008;43:493-498.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000;12:71-81.

van Blokland SC, Wierenga-Wolf AF, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, et al. Professional antigen presenting cells in minor

salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest* 2000;80:1935-1941.

van Cruijssen H, Hoekman K, Stam AG, van den Eertwegh AJ, Kuenen BC, Scheper RJ, et al. Defective differentiation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in advanced cancer patients is not normalized by tyrosine kinase inhibition of the vascular endothelial growth factor receptor. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:17315.

van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-48129.

van Duin D, Shaw AC. Toll-like receptors in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1438-1444.

Varas A, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Jimenez E, Garcia-Ceca J, Arias-Diaz J, et al. Age-dependent changes in thymic macrophages and dendritic cells. *Microsc Res Tech* 2003;62:501-507.

Vasilev S, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic LJ. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between dark agouti and albino oxford rats. *Vet Parasitol* 2009;159:229-231.

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.

Velasquez-Lopera MM, Correa LA, Garcia LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2008;154:107-114.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-189.

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;169:2284-2291.

Vollmer T, Waxman S. Multiple sclerosis and other demyelinating disorders. In: Rosenberg RN (ed.) *Comprehensive Neurology*, New York, Raven Press: (1991) 489-93.

Vremec D, O'Keeffe M, Wilson A, Ferrero I, Koch U, Radtke F, et al. Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture. *Innate Immun* 2011;17:338-352.

Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000;164:2978-2986.

Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 2005;3:166-175.

Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol* 2013;34:521-530.

Wang YC, Hu XB, He F, Feng F, Wang L, Li W, et al. Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4. *J Biol Chem* 2009;284:15993-6003.

Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2008;9:676-683.

Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstein B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis* 2008;46:1078-1084.

Wheeler RD, Owens T. The changing face of cytokines in the brain: perspectives from EAE. *Curr Pharm Des* 2005;11:1031-1037.

Wilke CM, Wang L, Wei S, Kryczek I, Huang E, Kao J, et al. Endogenous interleukin-10 constrains Th17 cells in patients with inflammatory bowel disease. *J Transl Med* 2011;9:217.

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;102:2187-194.

Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-28.

Wong C, Goldstein DR. Impact of aging on antigen presentation cell function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2013;25:535-541.

Wong CP, Magnusson KR, Ho E. Aging is associated with altered dendritic cells subset distribution and impaired proinflammatory cytokine production. *Exp Gerontol* 2010;45:163-169.

Wong CP, Magnusson KR, Ho E. Increased inflammatory response in aged mice is associated with age-related zinc deficiency and zinc transporter dysregulation. *The J Nutr Biochem* 2013;24:353-359.

Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:519-527.

Worthington JJ, Fenton TM, Czajkowska BI, Klementowicz JE, Travis MA. Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* 2012;217:1259-1265.

Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 2001;98:3376-3382.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320.

Xing Z, Ryan MA, Daria D, Nattamai KJ, Van Zant G, Wang L, et al. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* 2006;108:2190-2197.

Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* 2013;252:12-23.

Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:235-247.

Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008;29:44-56.

Yang Z, Breider MA, Carroll RC, Miller MS, Bochsler PN. Soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein from bovine serum enable bacterial lipopolysaccharide-mediated cytotoxicity and activation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *J Leukoc Biol* 1996;59:241-247.

You J, Dong H, Mann ER, Knight SC, Yaqoob P. Ageing impairs the T cell response to dendritic cells. *Immunobiology* 2013;218:1077-1084.

Yrlid U, Macpherson G. Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. *APMIS* 2003;111:756-765.

Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.

Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 2003;170:2153-2160.

Zhou H, Wang Y, Lian Q, Yang B, Ma Y, Wu X, et al. Differential IL-10 production by DCs determines the distinct adjuvant effects of LPS and PTX in EAE induction. *Eur J Immunol* 2014;44:1352-1362.

Biografija

Biljana Bufan je rođena 27.9.1976. u Pančevu. Osnovnu školu i Gimnaziju je završila u Kovinu. Školske 1995/96. godine upisala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu na kome je diplomirala 2002. godine. Nakon završetka studija, obavila je je lekarski pripravnički staž i položila stručni ispit za doktore medicine.

Poslediplomske magistarske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer-Imunologija je upisala školske 2002/03. godine, a magistarsku tezu, pod nazivom “Modulacija diferencijacije humanih dendritičnih ćelija monocitnog porekla *in vitro* pomoću aspirina i azot monoksid derivata aspirina” odbranila je 25.6.2007. godine. Eksperimentalni deo magistarskog rada je radila tokom 2003-2005. godine na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu, pod mentorstvom akademika prof. dr sc. Miodraga Čolića.

Poslediplomske specijalističke studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu-Imunologija upisala je školske 2007/08. godine i 2011. godine je položila specijalistički ispit.

Poslediplomske doktorske akademske studije je upisala školske 2006/07. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Farmakologija-Imunofarmakologija. Eksperimentalni deo doktorske disertacije je uradila u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković” Institut za virusologiju, serume i vakcine „Torlak“ u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Zorice Stojić-Vukanić.

Zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu od 2004. godine na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju i učestvuje u izvođenju nastave na Integrisanim akademskim studijama na predmetima Imunologija i Imunologija sa imunohemijom.

Član je Društva imunologa Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Биљана С. Буфан

број индекса 43/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај старења на фенотипске и функцијске карактеристике
дендритских ћелија различитих сојева пацова

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



У Београду, 29. 8. 2014.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Биљана С. Буфан

Број индекса 43/06

Студијски програм Фармакологија-Имунофармакологија

Наслов рада Утицај старења на фенотипске и функцијске
карактеристике дендритских ћелија различитих сојева пацова

Ментор др сц. Зорица Стојић-Вуканић, ванредни професор

Потписана Биљана Буфан

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда



у

Београду, 29.8.2014.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај старења на фенотипске и функцијске карактеристике

дендритских ћелија различитих сојева пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, 29.8.2014.