

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

Komisiji za posle diplomске studije – doktorske studije

Nastavno-naučno veće Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 12.04.2018. godine, donelo je Odluku (broj 668/2) kojom se imenuje Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom "**Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćanjem vremena diferencijacije**", kandidata mag. farm. Bojana Pavlovića, u sastavu:

1. Dr Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sci. Biol. Sergej Tomić, naučni saradnik - Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije, mentor
3. Dr Nevena Arsenović Ranin, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mag. farm. Bojan Pavlović je zaposlen u Phytonet d.o.o. Kandidat je student doktorskih akademskih studija - modul farmakologija, podmodul imunofarmakologija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mag. farm. Bojana Pavlovića pod nazivom „**Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćenjem vremena diferencijacije**“, napisana je na 151 strani i sadrži 56 kompozitnih slika/grafikona, 9 tabela i 374 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Hipoteza, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Doktorska disertacija sadrži i rezime na srpskom i engleskom jeziku, kao i zakonom propisane obavezne Priloge (kratka biografija kandidata, potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije, korišćenju doktorske disertacije).

U poglavlju **Uvod** pregledano i sistematski su izneti relevantni podaci iz literature o dendritskim ćelijama (otkriće, životni ciklus, tipovi, uloga u stečenom imunskom odgovoru), koje su predmet proučavanja ove doktorske disertacije. Takođe, s obzirom da je primena dendritskih ćelija u imunoterapiji tumora jedan od pristupa sa najviše izgleda za uspeh u kliničkoj praksi, istaknuti su aktuelni naučni problemi vezani za primenu dendritskih ćelija dobijenih po konvencionalnom i protokolu ubrzane diferencijacije u imunoterapiji tumora, i ukazano na nepoznanice koje je neophodno ispitati da bi korišćenje ovih ćelija u imunoterapiji tumora bilo efikasno i bezbedno.

Hipoteza je dobro i precizno definisana.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se ispituju i uporede fenotipska i funkcijska svojstva dendritskih ćelija dobijenih konvencionalnim protokolom i protokolom ubrzane diferencijacije od monocita istih donora u prisustvu različitih faktora stimulacije/sazrevanja, a u cilju razvoja imunogenih dendritskih ćelija koje bi mogle da se koriste u imunoterapiji tumora. Osim toga, cilj je bio i da se ispituju karakteristike prekursorskih monocita na osnovu kojih bi bilo moguće predvideti uspešno generisanje imunogenih dendritskih ćelija kod različitih donora.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisani materijal, protokoli i eksperimentalne procedure koji su korišćeni u *in vitro* eksperimentima. Sve metode koje su korišćene u eksperimentalnom radu predstavljaju najsavremenije metode imunoloških ispitivanja u humanim model sistemima.

Rezultati su prikazani na 62 stranice teksta, kroz 53 kompozitna grafikona/slika i 6 tabela u okviru 6 celina. Prvi deo rezultata je fokusiran na upoređivanje fenotipskih svojstava dendritskih

ćelija dobijenih od monocita konvencionalnim i protokolom ubrzane diferencijacije pomoću proinflamacijskog koktela. U drugom delu je analizovana povezanost ekspresije aktivacionih markera i produkcije proinflamacijskih citokina od strane monocita, sa njihovim potencijalom za diferencijaciju u dendritske ćelije kod različitih donora. U trećem delu su ispitivana funkcijska svojstva dendritskih ćelija dobijenih od monocita različitim protokolima. Četvrti deo rezultata se odnosi na potencijalnu primenu Poly (I:C), agoniste TLR3, umesto proinflamacijskog koktela, u protokolima dobijanja dendritskih ćelija od monocita, sa posebnim osvrtom na efekat ovog agoniste, samog ili u kombinaciji sa TNF- α , na vijabilnost i sposobnost dendritskih ćelija da usmeravaju diferencijaciju CD4⁺ T ćelija ka Th1 subpopulaciji. U petom delu rezultata ispitivan je uticaj niskih doza Poly (I:C) na kapacitet monocita “loših respondera” da se diferenciraju u imunogene dendritske ćelije primenom protokola ubrzane diferencijacije. Poslednji, šesti deo rezultata se odnosi na ispitivanje uloge IL-6 u dobijanju imunogenih dendritskih ćelija od monocita primenom protokola ubrzane diferencijacije.

Poglavlje **Diskusija** se sastoji iz tri dela koji logički prate prikazane rezultate. Kandidat na kritičan način procenjuje rezultate dobijene tokom izrade doktorske disertacije i poredi ih i objašnjava u svetlu onih koji su dostupni iz relevantnih literaturnih izvora.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci koji su proistekli iz dobijenih rezultata i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 374 bibliografske jedinice.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati istraživanja dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su prikazani u sklopu 6 logičnih celina. U prvom delu je pokazano da protokol ubrzane diferencijacije monocita pomoću proinflamacijskog koktela (IL-6, IL-1 β , PGE-2, TNF- α) omogućava dobijanje imunogenih dendritskih ćelija (engl. fast dendritic cell; fDC) kao i konvencionalni protokol, u pogledu ekspresije markera sazrevanja dendritskih ćelija, produkcije IL-12 i usmeravanja diferentovanja pomoćničkih CD4⁺ T limfocita (Th) ka Th1 subpopulaciji. Međutim, na osnovu analize ekspresije CD14 molekula je pokazano da monociti samo dela ispitivanih donora (“dobri responderi”) odgovaraju na protokol ubrzane diferencijacije. Kod “loših respondera” fDC su bile manje zrele, što je procenjeno na osnovu ispoljavanja markera sazrevanja, pre svega MHC molekula II klase, CD83, CD86 i CCR7 molekula. U drugom delu je pokazano da ovakva svojstva fDC korelišu sa većom ekspresijom CD16 molekula na površini monocita “loših respondera”, i njihovom

sposobnošću da produkuju više IL-6 i IL-1 β rano, na početku kultivacije, u odnosu na monocite “dobrih respondera”. Ispitivanjem funkcionalnih svojstava fDC, u okviru trećeg dela, je pokazano da, u skladu sa nižim stepenom zrelosti, fDC “loših respondera” produkuju manje IL-12, slabije stimulišu proliferaciju aloreaktivnih T ćelija i njihovu diferencijaciju u Th1 ćelije.

S obzirom da proinflamacijski koktel sadrži potencijalne inhibitore diferencijacije dendritskih ćelija (IL-6, IL-1 β i PGE2), ispitano je da li stimulacija TLR3 agonistom, kao što je Poly(I:C), za koji je pokazano da stimuliše nastanak Th1 ćelija, povećava efikasnost dobijanja imunogenih fDC. Međutim, pokazano je da Poly (I:C) u visokim dozama indukuje apoptozu dendritskih ćelija, te je bilo neophodno pronaći pogodne uslove za ovakvu stimulaciju, a to je upravo bio cilj ispitivanja u okviru četvrtog dela. Naime, pokazano je da primena TNF- α u kombinaciji Poly (I:C) inhibira njegov proapoptotski efekat. Međutim, prisustvo TNF- α je, pored apoptoze, inhibiralo i sposobnost dendritskih ćelija da usmere diferencijaciju Th ćelija ka Th1 subpopulaciji, a potenciralo ekspresiju tolerogenog molekula ILT3 na njima. Zbog ovog negativnog efekta ispitivan je uticaj različitih doza Poly (I:C) i pokazano je da su niske doze Poly (I:C) stimulisale sazrevanje dendritskih ćelija i produkciju IL-12, a nisu indukovale apoptozu. Zbog toga kombinacija Poly (I:C) i TNF- α nije dalje korišćena za razvoj protokola za dobijanje imunogenih fDC, već je ispitivanje nastavljeno korišćenjem niskih doza Poly (I:C). Međutim, u protokolu za ubranu diferencijaciju su niske doze Poly (I:C) potencirale dobijanje imunogenih fDC samo kod 5 od 12 donora, dok je kod 7 donora uočen povećan tolerogeni potencijal dendritskih ćelija dobijenih na ovaj način. Detaljnije ispitivanje ovog fenomena, opisanog po prvi put, je pokazalo da fDC “loših respondera” nakon stimulacije sa Poly (I:C) slabo sazrevaju, produkuju manje IL-12 i IL-23, a više IL-10 i IL-1 β , što je u kokulturi sa aloreaktivnim T ćelijama dovelo do smanjene diferencijacije Th ćelija ka Th1 i Th17 subpopulacijama, a povećane ka Th2 ćelijama, u odnosu na dendritske ćelije istih donora dobijene konvencionalnim protokolom. Osim toga, fDC “loših respondera” su ispoljavale više ILT3 i IDO-1 molekula, i indukovale nastanak više supresivnih TGF- β -produkujućih T regulatornih ćelija u odnosu na dendritske ćelije istih donora dobijene konvencionalnim protokolom. Takođe, treba istaći da bez obzira na primenjeni protokol za diferencijaciju monocita, kod “dobrih respondera” primena niskih, netoksičnih doza Poly (I:C), efikasnije stimuliše produkciju IL-12 i diferencijaciju ka Th1 subpopulaciji nego proinflamacijski koktel.

S obzirom da Poly (I:C) nije povećao efikasnost dobijanja imunogenih fDC, u poslednjem delu istraživanja je detaljnije ispitivana uloga autokrinog IL-6, koga monociti “loših respondera” produkuju u većoj količini u odnosu na monocite “dobrih respondera”. Pokazano je da primena monoklonskog antitela usmerenog protiv receptora za IL-6 (tocilizumab) u postupku ubrane

diferencijacije monocita značajno poboljšava efikasnost diferencijacije i sazrevanja fDC indukovano sa niskim dozama Poly (I:C). U prisustvu tocilizumaba fDC su bolje sazrevale, produkovala su više IL-12 i manje TGF- β , snažnije su indukovale proliferaciju aloreaktivnih T ćelija, i nisu indukovale nastanak T regulatornih ćelija, usled smanjene ekspresije ILT-3 i PD-L1 molekula.

Na osnovu rezultata je zaključeno da protokol ubrzane diferencijacije omogućava dobijanje imunogenih dendritskih ćelija pogodnih za primenu u imunoterapiji tumora, slično kao konvencionalni protokol, ali samo kod dela donora. Kod određenog broja donora odgovor na protokol ubrzane diferencijacije je bio slab, i bez obzira na primenjeni maturacioni stimulus, rezultovao je generisanjem dendritskih ćelija koje poseduju izražene tolerogene osobine i nisu kandidati za efikasnu i bezbednu primenu u imunoterapiji tumora. Analizom markera monocita u toku rane kultivacije, moguće je identifikovati monocite "loših respondera", za koje je bolje primeniti konvencionalni protokol ili sprečiti delovanje IL-6 produkovanog od strane monocita u protokolu ubrzane diferencijacije, što omogućava dobijanje imunogenih dendritskih ćelija pogodnih za primenu u imunoterapiji tumora.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Prve publikacije koje su opisale mogućnost primene protokola za ubranu diferencijaciju monocita u imunogene dendritske ćelije su pokazale da je moguće dobiti funkcionalno zrele dendritske ćelije iz monocita nakon 2-3 dana kultivacije i da se one po svojim osobinama mogu porediti sa onima dobijenim konvencionalnim protokolom (Obermaier i sar., 2003; Dauer i sar., 2003). Ramadan i saradnici (2004) su potvrdili ove nalaze i ukazali na prednost protokola za ubranu diferencijaciju u smislu značajnog smanjenja utroška neophodnih sredstava, radne snage i vremena. Suprotno ovim nalazima, Curti i saradnici (2004) su pokazali da monociti kultivisani po protokolu ubrzane diferencijacije ispoljavaju morfologiju sličniju monocitima nego dendritskim ćelijama. Takođe, ove ćelije su slabije stimulisale proliferaciju alogernih T ćelija, a na osnovu ekspresije markera diferencijacije (CD14) i sazrevanja (CD86, HLA-DR) i odsustva ekspresije CD83 molekula koji je glavni marker zrelih dendritskih ćelija, autori su zaključili da to najverovatnije nisu zrele dendritske ćelije, već aktivirani monociti. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put pokazali, da sposobnost diferencijacije monocita u imunogene fDC u prisustvu proinflamacijskog koktela pre svega zavisi od donora, odnosno od kapaciteta njegovih monocita da produkuju visok nivo IL-6 i IL-1 β rano, na početku kultivacije. Naime,

pokazano je da IL-6 i IL-1 β preusmeravaju diferencijaciju humanih monocita ka makrofagima tako što povećavaju ekspresiju receptora za M-CSF na monocitima, a time i odgovor ovih ćelija na autokrino produkovan M-CSF (Chomarat i sar., 2000; Banchereau i sar., 2000; Romani i sar., 1994; Sallusto i sar., 1994). Ovi nalazi su u skladu sa uočenim prisustvom ćelija koje imaju morfologiju makrofaga i ispoljavaju markere (CD14 i CD33) karakteristične za ovaj tip ćelija u kulturama fDC “loših respondera”. Monociti “loših respondera” su ispoljavali i više CD16, a manje CD36 i CD69 molekula u odnosu na “dobre respondere”. Imajući sve ovo u vidu, po prvi put je u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano da je pravovremenom blokadom receptora za IL-6 moguće povećati imunogenost dendritskih ćelija dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije iz monocita “loših respondera”.

Za komponente proinflamacijskog koktela, IL-1 β , IL-6 i PGE-2, je pokazano da inhibiraju diferencijaciju monocita u dendritske ćelije kao i funkcije dendritskih ćelija (migracija, produkcija IL-12 i indukcija Th1 imunskog odgovora) (Sharma i sar., 2003). S toga je u narednom koraku ispitano, da li bi primena Poly (I:C), TLR3 agonista, kao maturacionog stimulusa omogućila dobijanje fDC boljih karakteristika, s obzirom da je iz literature poznato da Poly (I:C) dovodi do snažnog sazrevanja dendritskih ćelija koje imaju potencijal da usmeravaju diferencijaciju Th ćelija ka Th1 subpopulaciji (Dzopalic i sar., 2012; Verdijk i sar., 1999). Međutim, s druge strane je pokazano da Poly (I:C) ima i proapoptotski efekat na dendritske ćelije (Weber i sar., 2010), koji se može prevazići istovremenom primenom TNF- α ili CD40 liganda (Spisek i sar., 2001; Lehner i sar., 2012; McIlroy i sar., 2003). Rezultati primene visokih doza Poly (I:C) u kombinaciji sa TNF- α koji su dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa prethodno objavljenim (Lehner i sar., 2012), a u suprotnosti sa rezultatima objavljenim od strane Spisek i saradnika (2001), koji su pokazali da ova kombinacija dodatno potencira apoptozu dendritskih ćelija. Ono što je po prvi put pokazano u ovim istraživanjima je da TNF- α inhibira ne samo apoptozu, nego i sposobnost Poly (I:C)-stimulisanih dendritskih ćelija da indukuju Th1 imunski odgovor. Prethodno je efekat kombinacije Poly (I:C) i TNF- α bio upoređivan sa efektima proinflamacijskog koktela kao zlatnog standarda (Spisek i sar., 2005; Pedersen i sar., 2005) ili sa efektima nezrelih dendritskih ćelija (Spisek i sar., 2003), što nisu odgovarajuće kontrole, pa je nemoguće izvući dobar zaključak iz ovih studija. Međutim, rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da ova kombinacija nije poželjna za diferencijaciju dendritskih ćelija koje bi mogle da se koriste u imunoterapiji tumora, jer u poređenju sa efektom samog Poly (I:C), dovodi do smanjenog generisanja IFN- γ -produkujućih Th1 ćelija, a one su neophodne za indukciju efikasnog imunskog odgovora na tumor (Palucka i sar., 2013).

U nastavku istraživanja je pokazano da niske doze Poly (I:C), koje ne izazivaju apoptozu dendritskih ćelija, potenciraju Th1 polarišuća svojstva dendritskih ćelija dobijenih iz monocita “dobrih respondera” korišćenjem oba ispitivana protokola, jače nego proinflamacijski koktel, ali da i dalje postoji određen broj donora koji loše odgovora na protokol ubrzane diferencijacije. Truksova i njeni saradnici (2014) su pokazali da dendritske ćelije dobijene trodnevnom i petodnevnom diferencijacijom sa GM-CSF/IL-4 i 24-časovnom stimulacijom sa Poly (I:C), imaju dobar potencijal za terapijsku primenu. Iako su autori pokazali da dendritske ćelije dobijene protokolom ubrzane diferencijacije u njihovoj studiji imaju visoku ekspresiju CD14 i slabo proizvode IL-12p70 (što ne bi išlo u prilog njihovom dobrom potencijalu za terapijsku primenu), zaključak je donet na osnovu sličnog kapaciteta ovih ćelija i onih dobijenih konvencionalnim protokolom za internalizaciju i prezentaciju virusnih i bakterijskih antigena, kao i na osnovu njihove sposobnosti da indukuju antigen-specifičnu proliferaciju CD8⁺ T ćelija. Burdek i saradnici (2010) su pokazali veću ekspresiju HLA-DR molekula na dendritskim ćelijama istih donora nakon primene protokola ubrzane diferencijacije u poređenju sa konvencionalnim, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Međutim, viša ekspresija HLA-DR molekula i prezentacija antigena ne mora neminovno da dovede i do boljeg imunskog odgovora na taj antigen, jer nivo ekspresije samog HLA-DR molekula, nije jedini faktor od koga zavisi imunogenost dendritskih ćelija. U skladu sa tim su podaci da prezentacija antigena u odsustvu ili pri smanjenoj kostimulaciji, indukuje toleranciju na taj antigen (Dudek i sar., 2013). U skladu sa tim Čaing i saradnici (2011) su pokazali da dendritske ćelije nakon 2 dana diferencijacije imaju značajno više ispoljen CD14 i manje ispoljen CD11c molekul, kao i da imaju smanjen kapacitet za maturaciju nakon stimulacije. Osim toga, povećan kapacitet fDC da proizvode IL-10, takođe može doprineti njihovom slabom alostimulatornom kapacitetu. Kvinsborg i saradnici (2009) su pokazali da fDC proizvode značajno veću količinu IL-10 nakon stimulacije Resiquimod-om (R848; TLR7/8 agonist) i proinflamacijskim koktelom, u odnosu na dendritske ćelije istih donora dobijene konvencionalnim protokolom, a na osnovu čega je zaključeno da treba biti posebno oprezan prilikom primene ovih dendritskih ćelija u kliničkoj praksi, što je u skladu i sa zaključcima koji su proistekli iz analize rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, poznato je da IL-10 snažno inhibira produkciju IL-2 (De Waal i sar., 1993) i proliferaciju CD4⁺ T ćelija (Fiorentino i sar., 1991), ali i da ispoljava imunostimulatorni efekat na CD8⁺ T ćelije (Schwarz i sar., 1994), što može objasniti fenomen da fDC indukuju dobru proliferaciju i citotoksičnu aktivnost CD8⁺ T ćelija (Truksova i sar., 2014; Burdek i sar., 2010), ali ne i CD4⁺ T ćelija (Truksova i sar., 2014). Međutim, treba uzeti u obzir da je za efikasan anti-tumorski imunski odgovor osim indukcije

citotoksičnih CD8⁺ T ćelija, neophodna aktivacija i Th1 ćelija (Kenedi i sar., 2008) i, u specifičnim situacijama, Th17 ćelija (Ki i sar., 2013). U tom smislu je pokazano da IL-10 ispoljava inhibitorno dejstvo na diferencijaciju Th ćelija ka Th1 (Saraiva i sar., 2010) i Th17 ćelijama (Gu i sar., 2008), dok stimuliše Th2 imunski odgovor (Steinman i sar., 2003), što nije poželjno u imunoterapiji tumora (Zegler i sar., 2009). Po prvi put je u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano da kod “loših respondera” Poly (I:C) povećava tolerogenost, a ne imunogenost dendritskih ćelija, što je zaključeno na osnovu analize markera tolerogenih dendritskih ćelija (IDO-1, ILT3) i njihove uloge u indukciji regulatornih T ćelija. U jedinoj studiji u kojoj je ispitivan kapacitet dendritskih ćelija dobijenih iz monocita protokolom ubrzane diferencijacije ili konvencionalnim da indukuju regulatorne T ćelije (Truksova i sar., 2014) nije uočena značajna razlika u sposobnosti tih dendritskih ćelija da indukuju regulatorne T ćelije. Mogući razlozi za neslaganje rezultata dobijenih u toj studiji sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji su, što su autori koristili duže vreme diferencijacije za fDC i neodgovarajući statistički test.

Literatura

1. Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A., 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biological procedures online*. 5(1):197.
2. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A., 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *The Journal of Immunology*.;170(8):4069-76.
3. Ramadan G, Konings S, Kurup V, Keever-Taylor, 2004. C. Generation of Aspergillus-and CMV-specific T-cell responses using autologous fast DC. *Cytotherapy*. 6(3):223-34.
4. Curti A, Ferri E, Pandolfi S, Isidori A, Lemoli RM., 2004. Dendritic cell differentiation. *The Journal of Immunology*. 172(1):3-4.
5. Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK., 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 171(5):2262-9.
6. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK., 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*. 1(6):510.
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B, Palucka K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 18(1):767-811.

8. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*. 180(1):83-93.
9. Sallusto F, Lanzavecchia A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 179(4):1109-18.
10. Sharma S, Stolina M, Yang S-C, Baratelli F, Lin JF, Atianzar K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M., 2003. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clinical Cancer Research*. 9(3):961-8.
11. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M., 2012. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunologic research*. 52(1-2):20-33.
12. Verdijk RM, Mutis T, Esendam B, Kamp J, Melief CJ, Brand A, Goulmy E., 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly (I: C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 163(1):57-61.
13. Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M, Häcker G., 2010. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell death and differentiation*. 17(6):942.
14. Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M., 2001. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 50(8):417-27.
15. Lehner M, Kellert B, Proff J, Schmid MA, Diessenbacher P, Ensser A, Dörrie J, Schaft N, Leverkus M, Kämpgen E., 2012. Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *The Journal of Immunology*. 188(10):4810-8.
16. McIlroy D, Gregoire M., 2003. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer immunology, immunotherapy*. 52(10):583-91.
17. Pedersen AE, Thorn M, Gad M, Walter M, Johnsen H, Gaarsdal E, Nikolajsen K, Buus S, Claesson M, Svane I., 2005. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. *Scandinavian journal of immunology*. 61(2):147-56.
18. Spisek R, Bougras G, Ebstein F, Masse D, Meflah K, McIlroy D, Gregoire M., 2003. Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete

phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 52(7):445-54.

19. Palucka K, Banchereau J., 2013. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*. 39(1):38-48.
20. Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, Partlova S, Spisek R, Fucikova J., 2014. Day 3 Poly (I: C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. *Immunology letters*. 160(1):39-49.
21. Bürdek M, Spranger S, Wilde S, Frankenberger B, Schendel DJ, Geiger C., 2010. Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *Journal of translational medicine*. 8(1):90.
22. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P., 2013. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Frontiers in immunology*. 4:438.
23. Chiang CL-L, Hagemann AR, Leskowitz R, Mick R, Garrabrant T, Czerniecki BJ, Kandalaft LE, Powell Jr DJ, Coukos G., 2011. Day-4 myeloid dendritic cells pulsed with whole tumor lysate are highly immunogenic and elicit potent anti-tumor responses. *PloS one*. 6(12):e28732.
24. Kvistborg P, Bøgh M, Pedersen A, Claesson M, Zocca M., 2009. Fast generation of dendritic cells. *Cellular immunology*. 260(1):56-62.
25. de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE., 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *The Journal of Immunology*. 150(11):4754-65.
26. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A., 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*. 146(10):3444-51.
27. Schwarz MA, Hamilton LD, Tardelli L, Narula SK, Sullivan LM., 1994. Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*. 16(2):95-104.
28. Kennedy R, Celis E., 2008. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological reviews*. 222(1):129-44.
29. Qi W, Huang X, Wang J., 2013. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cellular Immunology*. 285(1-2):18-22.
30. Saraiva M, O'garra A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature*

reviews immunology. 10(3):170.

31. Gu Y, Yang J, Ouyang X, Liu W, Li H, Yang J, Bromberg J, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC., 2008. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells.

European journal of immunology. 38(7):1807-13.

32. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC., 2003. Tolerogenic dendritic cells. Annual review of immunology. 21(1):685-711.

33. Ziegler A, Heidenreich R, Braumüller H, Wolburg H, Weidemann S, Mocikat R, Röcken M., 2009. EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. Blood. 113(15):3494-502.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati doktorske disertacije mag. farm. Bojana Pavlovića su publikovani u dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i predstavljani u vidu jednog saopštenja na međunarodnom naučnom skupu štampanog u izvodu (M34).

Publikovani radovi iz doktorske disertacije (M21):

1. **Bojan Pavlović**, Sergej Tomić, Jelena Đokić, Saša Vasiljić, Dragana Vučević, Jovanka Lukić, Alisa Gruden-Movsesijan, Nataša Ilić, Milan Marković, Miodrag Čolić. Fast dendritic cells matured with Poly (I: C) may acquire tolerogenic properties. *Cytotherapy* (2015) 17 (12), 1763-1776 (IF=3.625)

2. Ana Thorne, Sergej Tomić, **Bojan Pavlović**, Dušan Mihajlović, Tanja Džopalić, Miodrag Čolić. Tumor necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of poly (I:C)-treated dendritic cells but impairs their Th1 and Th17 polarizing capability. *Cytotherapy* (2015) 17 (5), 633-646 (IF=3.625).

Saopštenje na međunarodnom skupu štampano u izvodu (M34):

1. Tanja Džopalić, Ana Thorne, Sergej Tomić, **Bojan Pavlović**, Mihajlović Dušan, Miodrag Čolić. Tumor necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of poly(I:C)-treated dendritic cells but impairs their Th1 and Th17 polarizing capability. 4th European Congress of Immunology, September 2015, Vienna, Austria.

E. ZAKLJUČAK I OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije donose nova i dopunjuju već postojeća saznanja o mogućnostima dobijanja imunogenih dendritskih ćelija postupkom ubrzane diferencijacija od monocita, a koje bi mogle biti potencijalni kandidati za primenu u imunoterapiji tumora. Različitim eksperimentalnim pristupima na humanom model sistemu je pokazano da su dendritske ćelije dobijene po ovom protokolu fenotipski i funkcijski slične dendritskim ćelijama diferenciranim iz monocita konvencionalnim protokolom, što čini ovaj protokol znatno pristupačnijim za pacijente. Međutim, dobar kapacitet za dobijanje imunogenih dendritskih ćelija iz monocita skraćanjem vremena diferencijacije poseduju samo monociti dela ispitivanih donora (označeni kao “dobri responderi”). Monociti “loših respondera”, iako se dobro diferenciraju u dendritske ćelije po konvencionalnom protokolu, primenom protokola ubrzane diferencijacije stiču tolerogene osobine, što nije poželjno za njihovu primenu u imunoterapiji tumora. Naime, na ovaj način dobijene dendritske ćelije imaju veći tolerogeni kapacitet, što se ogleda u povišenoj ekspresije ILT3 i IDO-1 molekula i sposobnosti da indukuju regulatorne T ćelije, za koje je pokazano da podstiču rast tumora. Slično je pokazano i kada je za pripremu imunogenih dendritskih ćelija kao maturacioni stimulus korišćen TLR3 agonist, Poly (I:C), u kombinaciji sa TNF- α . Ovi podaci su vrlo značajni ako se uzme u obzir da su neki od ovih protokola već predloženi za primenu u kliničkim studijama. Veliki doprinos je učinjen i na identifikaciji molekularnih markera monocita dobrih i loših respondera, kao i mehanizama koji su odgovorni za nastanak imunogenih dendritskih ćelija. Pokazano je da dobar kapacitet za formiranje imunogenih dendritskih ćelija protokolom ubrzane diferencijacije ne zavisi od tipa primenjenog maturacionog stimulusa, već od fenotipskih i funkcijskih karakteristika monocita koji se koriste za njihovo dobijanje. U tom smislu je značajan i rezultat da se imunogene osobine dendritskih ćelija koje se dobijaju ubrzanom diferencijacijom od monocita značajno mogu poboljšati blokiranjem autokrinog delovanja IL-6, čime bi njihova primena u kliničkoj praksi bila uspešnija i bezbednija.

Na osnovu rezultata koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji i objavljeni u dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i u vidu jednog saopštenja na međunarodnom naučnom skupu štampanog u izvodu (M34), ova disertacija predstavlja originalan i značajan naučni doprinos oblasti Farmakologije - Imunofarmakologije. Uzimajući u obzir sve izloženo, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju mag. farm. Bojana Pavlovića i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije kandidata mag. farm. Bojana Pavlovića, pod nazivom:

„Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćanjem vremena diferencijacije“

Beograd, 11.05.2018.

Dr Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor

Dr sci. Biol. Sergej Tomić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne
energije, mentor

Dr Nevena Arsenović Ranin, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet