

---

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Владимир Турунташ

**ДЕЈСТВО СТАЛНОГ МАГНЕТСКОГ ПОЉА  
НА ФУНКЦИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ  
ХУМАНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА  
ПЕРИФЕРНЕ КРВИ *IN VITRO***

докторска дисертација

Београд, 2026.

---

UNIVERSITY OF BELGRADE  
MEDICAL FACULTY

Vladimir Turuntas

**THE EFFECT OF A STATIC MAGNETIC  
FIELD ON THE FUNCTIONAL  
CHARACTERISTICS OF HUMAN  
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR  
CELLS *IN VITRO***

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026.

---

ПОДАЦИ О МЕНТОРИМА, ЧЛАНОВИМА КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ  
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ И ДАТУМ ОДБРАНЕ

**МЕНТОРИ:**

**др Силвио Де Лука**

редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду

**др Саша Василијић**

научни саветник, Пало Алто, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

**др Ведрана Макевић**

доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду

**др Јелена Нешовић Остојић**

професор Медицинског факултета Универзитета у Београду

**др Иван Станојевић**

пуковник, ванредни професор, Институт за медицинска истраживања ВМА,  
Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду

**ДАТУМ ОДБРАНЕ:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

*Мом оцу,*

*Alexanderu M. Trbovichu,*

*академику, проф. Миодрагу Чолићу, мојим менторима,*

*фочанским и београдским улицама...*

---

Студија је изведена као део пројекта „Функционални аспекти модулације имуногених и толерогених својстава дендритских ћелија“, на Војномедицинској академији, Београд, Србија (број пројекта: МФВМА/10/12-14), којом је руководио проф. др. Саша Василијић.

---

## САЖЕТАК

### Дејство сталног магнетског поља на функцијске карактеристике хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви *in vitro*

**Увод:** За разлику од електромагнетних поља, статичка магнетна поља (СМП) нису опсежно проучавана у погледу њихових потенцијалних здравствених последица. Иако магнетни полови оријентисани нагоре и надоле могу изазвати различите биолошке ефекте, углавном је испитиван само пол са оријентацијом нагоре. Имајући у виду да је интеракција антиген-презентујућих ћелија (АПЋ) и Т лимфоцита кључна за покретање имунског одговора, процењивали смо ефекат дуготрајне експозиције хуманих мононуклеарних ћелија (МНЋ), статичким магнетним пољима умерене јачине, различитих оријентација, са фокусом на цитокински профил активираних лимфоцита.

**Метод:** Културе алогених МНЋ периферне крви биле су континуирано изложене дејству четири СМП. Интензитет примењеног поља износио је 1 милитесла (mT) или 56 mT, при оријентацији поља нагоре или надоле. Супернатанти ћелијских култура анализирани су на присуство IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-17, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10 методом ELISA или проточном цитометријом.

**Резултати:** Статичко магнетно поље оријентисано нагоре јачине 56 mT значајно је повећало ослобађање IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$  (оба  $p < 0,05$ ) у супернатантима култура Т ћелија и незрелих ДЋ. Насупрот томе, исте културе изложене СМП оријентисаном нагоре јачине 1 mT показале су значајно повишене нивое IL-17 ( $p < 0,05$ ). Нивои IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10 нису били измењени дејством СМП оријентисаног нагоре. Статичко магнетно поље оријентисано надоле јачине 56 mT повећало је ослобађање TNF- $\alpha$  када су Т ћелије стимулисане зрелим ДЋ. Продукција осталих цитокина није била измењена дејством СМП оријентисаног надоле.

**Закључак:** Ови налази показују различите *in vitro* биолошке ефекте статичких магнетних поља оријентисаних нагоре и надоле на продукцију цитокина Т ћелија активираних дендритским ћелијама, доприносећи бољем разумевању утицаја СМП на имунски систем и указујући на то да селективни ефекат СМП на имунски одговор може имати потенцијалне терапијске импликације код различитих имунопосредованих поремећаја.

**Кључне речи:** статичко магнетно поље; мононуклеарне ћелије, Т лимфоцити; дендритске ћелије; цитокини; пролиферација

**Научна област:** Медицина

**Ужа научна област:** Имунологија

**УДК број:** \_\_\_\_\_

---

## ABSTRACT

### ***The effect of a static magnetic field on the functional characteristics of human peripheral blood mononuclear cells in vitro***

**Background:** In contrast to electromagnetic fields, static magnetic fields (SMFs) have not been extensively studied in terms of their potential health consequences. Although upward- and downward-oriented magnetic poles may cause various biological effects, only the pole with the upward orientation has been mainly investigated. Considering that the interaction of antigen-presenting cells (APCs) and T lymphocytes is crucial to trigger an immune response, we assessed the effect of long-term exposure of human peripheral blood mononuclear cells to moderate strength SMFs of different orientations focusing on the cytokine profile of activated lymphocytes.

**Methods:** Cultures of allogenic peripheral blood mononuclear cells were continuously exposed to four SMFs. The intensity of the applied field was 1 militesla (mT) or 56 mT of the upward- and downward-oriented pole of the SMF. Cell culture supernatants were assayed for IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-17, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 by ELISA or flow cytometry.

**Results:** The upward-oriented 56 mT SMF significantly increased the release of IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$  (both  $p < 0.05$ ) in the cell culture supernatants of T cells and immature DCs. In contrast, the same cultures exposed to the upward-oriented 1 mT SMF showed significantly elevated levels of IL-17 ( $p < 0.05$ ). The levels of IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 were not affected by the upward-oriented SMF. The downward-oriented 56 mT SMF increased TNF- $\alpha$  release when T cells were stimulated with mature DCs. The production of other cytokines was unchanged by the downward-oriented SMF.

**Conclusion:** These findings demonstrate different in vitro biological effects of upward- and downward-oriented static magnetic fields on the cytokine production of T cells activated by DCs, helping to better understand SMF effects on the immune system and suggesting that the selective SMF effect on the immune response could have potential therapeutic effects in different immune-mediated disorders.

**Key words:** static magnetic field; mononuclear cells, T lymphocytes; dendritic cells; cytokines; proliferation

**Scientific field:** Medicine

**Narrower scientific field:** Immunology

**UDK No:** \_\_\_\_\_

## САДРЖАЈ

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. УВОД</b>                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1. Мононуклеарне ћелије периферне крви                                    | 2         |
| 1.1.1. Лимфоцити                                                            | 2         |
| 1.1.1.1. Т лимфоцити                                                        | 3         |
| 1.1.1.2. Активација Т лимфоцита                                             | 3         |
| 1.1.1.3. Диференцијација и поларизација CD4+ Т лимфоцита                    | 4         |
| 1.1.1.3.1. Th1 субпопулација                                                | 5         |
| 1.1.1.3.2. Th2 субпопулација                                                | 7         |
| 1.1.1.3.3. Th17 субпопулација                                               | 9         |
| 1.1.1.4. Б лимфоцити                                                        | 12        |
| 1.1.2. Дендритске ћелије                                                    | 13        |
| 1.1.2.1. Субпопулације хуманих дендритских ћелија                           | 14        |
| 1.1.2.2. Аутоимуност: улога дендритских ћелија                              | 16        |
| 1.1.2.3. Трансплантација органа: улога дендритских ћелија                   | 17        |
| 1.1.2.4. Дендритске ћелије и имунолошка толеранција                         | 17        |
| 1.2. Електромагнетна радијација                                             | 20        |
| 1.2.1. Нејонизујућа радијација                                              | 20        |
| 1.2.2. Стално магнетно поље                                                 | 21        |
| 1.2.2.1. Физичке величине и јединице                                        | 21        |
| 1.2.2.2. Извор експозиције                                                  | 23        |
| 1.2.2.3. Механизми интеракције                                              | 24        |
| 1.2.2.4. In vivo и in vitro студије                                         | 26        |
| <b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b>                                                   | <b>29</b> |
| <b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>                                                | <b>31</b> |
| 3.1. Дизајн студије                                                         | 32        |
| 3.2. Реагенси                                                               | 33        |
| 3.2.1. Медијуми и раствори                                                  | 33        |
| 3.2.2. Цитокини                                                             | 34        |
| 3.2.3. Стимулатори сазревања дендритских ћелија и пролиферације лимфоцита   | 34        |
| 3.2.4. Остале супстанце                                                     | 35        |
| 3.3. Изолација и култивација ћелија                                         | 35        |
| 3.3.1. Мононуклеарне ћелије                                                 | 35        |
| 3.3.2. Дендритске ћелије                                                    | 36        |
| 3.3.3. CD4+ Т лимфоцити                                                     | 36        |
| 3.3.4. Алогена активација Т лимфоцита                                       | 37        |
| 3.3.5. Поликлонска активација мононуклеарних ћелија                         | 38        |
| 3.4. Продукција цитокина                                                    | 38        |
| 3.4.1. Одређивање цитокина методом ELISA                                    | 39        |
| 3.4.2. Одређивање цитокина методом проточне цитофлуориметрије (FlowCytomix) | 39        |
| 3.5. Тестови вијабилности                                                   | 41        |
| 3.6. Магнетно поље                                                          | 43        |
| 3.6.1. Извор сталног магнетног поља                                         | 43        |
| 3.7. Статистичке анализе                                                    | 47        |

---

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>                                                          | <b>48</b> |
| 4.1. Ефекат сталног магнетног поља на хумане<br>CD4 <sup>+</sup> Т лимфоците ..... | 49        |
| 4.1.1. Продукција цитокина .....                                                   | 49        |
| 4.1.2. Пролиферација и вијабилност ћелија.....                                     | 59        |
| 4.2. Ефекат сталног магнетног поља на моноклеарне ћелије<br>периферне крви .....   | 63        |
| 4.2.1. Продукција цитокина .....                                                   | 63        |
| 4.2.2. Пролиферација МНЋ.....                                                      | 73        |
| <b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>                                                           | <b>76</b> |
| <b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>                                                            | <b>87</b> |
| <b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>                                                          | <b>90</b> |

# ***1. УВОД***

Специфични, односно стечени имунски одговор настаје као резултат међусобне интеракције више врста ћелија, од којих су кључне: 1) антиген-презентујуће ћелије (АПЋ) које прихватају, обрађују и презентују антигене, најчешће протеинског порекла, 2) Т лимфоцити који препознају антигене приказане од стране АПЋ и 3) Б лимфоцити. Професионалне антиген-презентујуће ћелије не само да представљају антигене у облику који Т лимфоцити могу препознати, већ и обезбеђују неопходне стимулусе за њихову активацију и диференцијацију у ефекторске ћелије. Међу професионалне АПЋ убрајају се дендритске ћелије (ДЋ), Б лимфоцити и макрофаги, при чему су дендритске ћелије најефикасније у активацији наивних Т лимфоцита и иницирању примарног имунског одговора. Ове ћелије чине хетерогену групу, различиту према пореклу, фенотипским особинама и функцијама. Њихова улога је кључна за иницирање нормалног имунског одговора, одржавање толеранције на сопствене антигене, али и за развој различитих имуно-патолошких стања. У последњих пар деценија, значајно је порасло интересовање научника за дендритске ћелије, са циљем истраживања могућности регулације њихових функција како би се модификовао сам имунски одговор. То је посебно важно у имуно-патолошким стањима где је потребно појачати имунски одговор (нпр. против тумора) или га сузбити (нпр. код аутоимуних болести и трансплантације органа) (1).

## **1.1. МОНОНУКЛЕАРНЕ ЋЕЛИЈЕ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ**

Мононуклеарне ћелије периферне крви (МНЋ) представљају хетерогену популацију имуних ћелија које се карактеришу присуством једра округлог или благо урођеног облика. Ову популацију чине лимфоцити (Т, Б и НК ћелије), моноцити као и дендритске ћелије (ДЋ), који заједно играју кључну улогу у урођеном и стеченом имунском одговору. Ове ћелије потичу из хематопоезских матичних ћелија коштане сржи и циркулишу између крви и ткива, где учествују у имунолошком надзору и одговору на патогене (1).

### **1.1.1. Лимфоцити**

Лимфоцити, јединствене ћелије стеченог имунитета, једине су ћелије у организму које експримују клонално распоређене рецепторе за антиген, при чему је сваки специфичан за различиту антигенску детерминанту. У организму постоје милиони клонова лимфоцита, што омогућава сваком појединцу да препозна и одговори на милионе страних антигена. Лимфоцити се састоје од различитих класа које имају различите функције и протеинске производе. Постоје и подтипови главних класа лимфоцита, тј. В и Т лимфоцита, са различитим фенотипским и функционалним карактеристикама (1).

### 1.1.1.1. Т лимфоцити

Т лимфоцити, посредници ћелијског имунитета, настају од прекурсорских ћелија у коштаном сржи, након чега мигрирају у тимус где сазревају; назив Т лимфоцити означава ћелије пореклом из тимуса (2).

**Подтипови Т лимфоцита:** Два главна подтипа Т ћелија дефинисана су експресијом површинских протеина CD4 и CD8. Т ћелије су посредници ћелијског имунитета: CD4+ Т ћелије су помоћничке Т ћелије или њихови наивни прекурсори, док су CD8+ Т ћелије цитотоксични Т лимфоцити (CTL) или њихови прекурсори. И CD4+ и CD8+ Т ћелије експримују рецепторе за антиген познате као  $\alpha\beta$  Т ћелијски рецептори (Т<sub>H</sub>P). CD4+ помоћничке Т ћелије луче цитокине који делују на различите друге ћелије, укључујући друге Т лимфоците, В ћелије и макрофаге. CD8+ цитотоксични Т лимфоцити препознају и убијају ћелије инфициране вирусима и другим микроорганизмима који могу да преживе унутар ћелија домаћина, као и туморске ћелије (3).

CD4+ регулаторне Т ћелије представљају трећу подгрупу Т ћелија које такође експримују  $\alpha\beta$  рецепторе; њихова функција је супресија имунског одговора. Поред тога, природне килер Т (NKT) ћелије, мукозом асоциране инваријантне Т (MAIT) ћелије и  $\gamma\delta$  Т ћелије представљају три бројчано мање подгрупе Т ћелија које експримују Т<sub>H</sub>P са ограниченом разноврсношћу, слично антителима које производе В-1 ћелије (4).

### 1.1.1.2. Активација Т лимфоцита

Специјализоване антиген-презентујуће ћелије (АП<sub>Т</sub>), пре свега дендритске ћелије, интернализују и обрађују антигене, након чега их у комплексу са молекулима главног комплекса хистокомпатибилности (MHC) презентују Т лимфоцитима. Ванћелијски протеински антигени се презентују у контексту MHC молекула II класе CD4+ Т ћелијама, док се ендогени антигени презентују путем MHC молекула I класе CD8+ Т лимфоцитима.

Процес активације Т ћелија започиње када Т ћелијски рецептор (Т<sub>H</sub>P) препозна MHC-пептид комплекс, што представља „први“ сигнал. Поред тога, на површини Т ћелија налазе се акцесорни и адхезиони молекули (CD28, CD2, интегрини и други) који се везују за одговарајуће лиганде на АП<sub>Т</sub>, стабилизујући контакт и омогућавајући пренос додатних сигнала.

Потпуна активација Т лимфоцита захтева, поред препознавања антигена (сигнал 1), и присуство костимулационог сигнала (сигнал 2), који се најчешће остварује интеракцијом CD28 молекула на Т ћелијама са CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на АП<sub>Т</sub>.

Уколико је присутан само сигнал 1, без одговарајуће костимулације, долази до анергије или апоптозе Т ћелија, што представља важан механизам периферне толеранције (1, 5, 6).

Поред ова два сигнала, дендритске ћелије обезбеђују и „трећи“ сигнал у виду цитокина, који усмеравају диференцијацију и функционалну специјализацију активираних Т лимфоцита (7).

### 1.1.1.3. Диференцијација и поларизација CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита

Након активације, наивни CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити се диференцирају у више функционално различитих ефекторских субпопулација, које се одликују специфичним профилима продукције цитокина и биолошким функцијама. Првобитно су описане две главне субпопулације — Th1 и Th2, али је данас познато да постоји већи број линија, укључујући Th17 и регулаторне Т ћелије (Treg) (8, 9).

Th1 ћелије карактерише продукција интерферона-гама (IFN- $\gamma$ ) и имају кључну улогу у одбрани од интрацелуларних патогена и активацији макрофага. Th2 ћелије луче цитокине као што су IL-4, IL-5 и IL-13 и учествују у одбрани од паразита и у патогенези алергијских болести (8, 10).

Савремени концепт активације Т лимфоцита подразумева постојање три сигнала. Поред препознавања антигена (сигнал 1) и костимулације (сигнал 2), дендритске ћелије обезбеђују и „трећи сигнал“ у виду цитокина који усмеравају диференцијацију Т ћелија ка одређеној ефекторској линији (2, 3). Овај процес зависи од више фактора, укључујући тип патогена, ангажоване *pattern-recognition* рецепторе, подтип дендритских ћелија, као и локалну цитокинску микросредину.

Интерлеукин-12 (IL-12), који продукују активирани дендритске ћелије, представља кључни цитокин за диференцијацију Th1 ћелија, углавном путем индукције транскрипционог фактора T-bet. Насупрот томе, IL-4 подстиче развој Th2 ћелија путем активације транскрипционог фактора GATA-3 (10).

Дендритске ћелије представљају хетерогену и функционално пластичну популацију. Иако је раније постојала подела на „Th1-индукујуће“ (мијелоидне) и „Th2-индукујуће“ (плазмоцитоидне) дендритске ћелије, данас је јасно да сви подтипови могу усмеравати различите Т ћелијске одговоре у зависности од примљених сигнала и услова микросредине (11).

На функцију дендритских ћелија значајно утичу микробни производи и медијатори имунског одговора. Сигнали као што су липополисахарид (LPS), CpG ДНК и вирусна дволанчана РНК стимулишу продукцију IL-12 и подстичу Th1 диференцијацију. С друге стране, антиинфламаторни фактори као што су IL-10, TGF- $\beta$  и простагландин E2 могу инхибирати Th1 одговор и промовисати Th2 или регулаторне фенотипове (9, 12).

Поред тога, интензитет и трајање активације, као и однос дендритских ћелија и Т лимфоцита, могу утицати на исход диференцијације. Продужена активација дендритских ћелија доводи до смањене продукције IL-12 („exhaustion“), што може довести до померања одговора ка Th2 или регулаторном профили (13).

Идентификација Th17 субпопулације, коју карактерише продукција IL-17 и улога у одбрани од екстрацелуларних патогена и аутоимуности, значајно је проширила класичну Th1/Th2 парадигму (14). Заједно са регулаторним Т ћелијама, ове субпопулације чине сложену мрежу која омогућава фино подешавање имунског одговора.

### 1.1.1.3.1. Th1 субпопулација

Подскуп Т помоћничких ћелија 1 (Th1) представља кључну ефекторску популацију стеченог имунитета у одбрани од патогена који преживљавају и умножавају се унутар фагоцитних ћелија. Ове ћелије су прва описана функционално различита субпопулација Т помоћничких лимфоцита и одликују се продукцијом интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), цитокина који има централну улогу у ћелијски посредованом имунском одговору (15). Развој Th1 одговора нарочито је значајан током инфекција изазваних интрацелуларним микроорганизмима, код којих је неопходна ефикасна активација макрофага ради елиминације патогена.

Поларизација наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ка Th1 фенотипу започиње након препознавања антигена у присуству специфичног цитокиноског окружења. Најзначајнији фактор у овом процесу је интерлеукин-12 (IL-12), који продукују дендритске ћелије и макрофаги након активације урођеног имунитета. Поред IL-12, важан допринос имају IFN- $\gamma$ , интерлеукин-18 и интерферони типа I, који заједно обезбеђују услове за развој Th1 ефекторских ћелија (1, 16). Овакав тип имунског одговора најчешће се индукује током инфекција изазваних микобактеријама, листеријама и појединим протозоама, као што је *Leishmania*, али и током вирусних инфекција и након имунизације протеинским антигенима у комбинацији са снажним адјувансима (15).

Дендритске ћелије имају централну улогу у усмеравању диференцијације Т лимфоцита, јер препознавањем микробних структура повезују урођени и стечени имунитет и одређују правац развоја Т помоћничког одговора (16). Истовремено, бројни микроорганизми подстичу природне килер ћелије на лучење IFN- $\gamma$ , који додатно стимулише продукцију IL-12 и на тај начин појачава развој Th1 одговора. Након диференцијације, Th1 ћелије настављају да продукују IFN- $\gamma$ , чиме одржавају сопствени фенотип и истовремено ограничавају развој других подскупова Т помоћничких ћелија, пре свега Th2 и Th17 лимфоцита (15, 19). Додатно, интеракција CD40 лиганда на активираним Т лимфоцитима са CD40 молекулом на антиген-презентујућим ћелијама доводи до појачане продукције IL-12 и стабилизације Th1 имунског одговора.

Најзначајнија функција Th1 ћелија јесте активација макрофага и повећање њихове способности да уништавају фагоцитоване микроорганизме. Исти механизам одговоран је и за развој реакције одложене преосетљивости, која представља важну компоненту бројних хроничних инфламаторних и аутоимуних обољења. Продужена активација макрофага посредована Th1 ћелијама учествује и у формирању гранулома, карактеристичних за обољења као што су туберкулоза и саркоидоза (1, 16).

**Интерферон- $\gamma$ :** Главни ефекторски цитокин Th1 ћелија је интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), једини представник интерферона типа II. За разлику од интерферона типа I, његово основно дејство није усмерено на директну антивирусну заштиту, већ на регулацију и појачавање имунског одговора. Структурно, IFN- $\gamma$  је хомодимерни протеин из породице цитокина типа II. Поред Th1 лимфоцита, продукују га и природне килер ћелије, група 1 урођених лимфоидних ћелија, као и цитотоксични CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити (1, 17).

У оквиру урођеног имунитета, продукција IFN- $\gamma$  најчешће потиче од природних килер ћелија које препознају инфициране или стресом измењене ћелије, као и под утицајем IL-12. У адаптивном имунском одговору, синтеза овог цитокина настаје након антигенски посредоване активације Т лимфоцита, а додатно је појачавају IL-12 и IL-18. Захваљујући оваквом механизму, IFN- $\gamma$  представља важну спону између урођене и стечене имуности.

Поред IFN- $\gamma$ , Th1 лимфоцити синтетишу и тумор-некротишући фактор (TNF), који учествује у локалном рекрутовању инфламаторних ћелија и појачавању запаљенске реакције. Истовремено, ове ћелије могу продуковати и интерлеукин-10, чије је дејство усмерено ка ограничавању прекомерне активације дендритских ћелија и макрофага, чиме се успоставља механизам негативне регулације имунског одговора (17).

Биолошка дејства IFN- $\gamma$  обухватају бројне ефекте на ћелије урођеног и стеченог имунитета:

- Подстиче класичну активацију макрофага и повећава њихову микробицидну активност, чиме омогућава ефикасније уништавање фагоцитованих патогена.
- Усмерава диференцијацију наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ка Th1 фенотипу, док истовремено ограничава развој Th2 и Th17 субпопулација. Овај ефекат остварује путем регулације експресије транскрипционих фактора који контролишу судбину Т помоћничких ћелија (15, 19).
- Повећава експресију молекула укључених у презентацију антигена, укључујући молекуле главног комплекса хистocomпатибилности, компоненте протеазомског система и костимулаторне молекуле на антиген-презентујућим ћелијама, чиме се унапређује активација Т лимфоцита.
- Стимулише макрофаге, дендритске ћелије и друге имуне ћелије на продукцију проинфламаторних медијатора, као што су TNF, интерлеукин-1 и различити

хемокини. На тај начин се обезбеђује привлачење додатних леукоцита у жариште инфекције и појачава локална инфламација. Истовремено се повећава и продукција IL-12, чиме се успоставља позитивна повратна спрега која доприноси одржавању Th1 имунског одговора и континуираној продукцији IFN- $\gamma$  (1, 16, 17).

### 1.1.1.3.2. Th2 субпопулација

Th2 ћелије представљају главне ефекторске ћелије имунског одговора усмереног против хелминта и других екстрацелуларних паразита. Њихова активација доводи до покретања механизма који укључују продукцију IgE антитела, активацију мастоцита и еозинофила, као и појачано лучење мукуса на епителним површинама. Поред заштитне улоге у паразитарним инфекцијама, Th2 ћелије имају централно место у патогенези алергијских болести и учествују у процесима зарастања и ремоделовања ткива (18).

Развој Th2 подскупа настаје под доминантним утицајем интерлеукина-4 (IL-4), који представља кључни сигнал за усмеравање диференцијације наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ка овом фенотипу. Извор IL-4 могу бити активирани Т лимфоцити, мастоцити и група 2 урођених лимфоидних ћелија (ILC2). Додатни подстицај развоју Th2 одговора обезбеђују епителни цитокини, као што су IL-25, IL-33 и тимусни стромални лимфопоетин (TSLP), који се ослобађају након контакта са алергенима или паразитима (1, 18). Карактеристика овог типа имунског одговора је координисано деловање више цитокина који заједно обезбеђују ефикасну елиминацију великих паразита које фагоцити не могу директно уништити.

Главни ефекторски цитокини Th2 ћелија су IL-4, IL-5 и IL-13. Посебан значај имају и Т фоликуларне помоћничке ћелије, које у лимфним фоликулима продукују IL-4 и IL-13 и на тај начин омогућавају класну промену имуноглобулина ка IgE изотипу, што представља један од кључних догађаја у развоју алергијског одговора (17).

**Интерлеукин-4:** Интерлеукин-4 је карактеристични цитокин Th2 подскупа и има двоструку улогу, јер учествује и у настанку и у одржавању Th2 имунског одговора. Припада породици цитокина типа I и поседује структуру са четири  $\alpha$ -хеликсна домена. Најзначајнији извори IL-4 су Th2 лимфоцити, ILC2 ћелије и активирани мастоцити. Његов рецептор чини  $\alpha$  ланац специфичан за везивање цитокина и заједнички  $\gamma$  ланац, који улази у састав више рецептора за цитокине (1, 18).

IL-4 испољава бројна биолошка дејства на различите популације имуних и неимуних ћелија:

- Подстиче класну промену имуноглобулина у Б лимфоцитима ка IgE изотипу, нарочито у сарадњи са Т фоликуларним помоћничким ћелијама. На тај начин омогућава настанак антителиског одговора који је од суштинског значаја у алергијским реакцијама непосредног типа. Поред тога, стимулише и промену ка појединим подтипovima IgG антитела.
- Представља најважнији фактор диференцијације наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у Th2 ефекторске ћелије и омогућава њихово даље умножавање и одржавање након развоја.
- Заједно са IL-13 усмерава макрофаге ка алтернативно активираном фенотипу, који је повезан са репарацијом ткива и контролом инфламације. Истовремено, овај механизам може умањити способност макрофага да елиминишу интрацелуларне патогене који захтевају класичну активацију посредовану интерфероном- $\gamma$ .
- Учествоје у елиминацији паразита преко епителних баријера тако што повећава мотилитет гастроинтестиналног тракта, док у сарадњи са IL-13 доприноси појачаном лучењу мукуса.
- Поспешује миграцију леукоцита у жариште инфламације, нарочито еозинофила, путем повећане експресије адхезионих молекула и продукције хемокина који усмеравају њихово кретање ка месту инфекције или алергијске реакције (1, 8, 11, 16).

**Интерлеукин-13:** Интерлеукин-13 је цитокин блиско сродан IL-4, са којим дели значајан број биолошких функција. Припада истој породици цитокина типа I и структурно је организован као молекул са четири  $\alpha$ -хеликсна домена. Највеће количине IL-13 продукују Th2 лимфоцити, али значајан извор представљају и ILC2 ћелије, као и друге популације леукоцита укључене у тип 2 имунски одговор.

Рецептор за IL-13 изграђен је од IL-4R $\alpha$  и IL-13R $\alpha$ 1 ланца, чиме се објашњава преклапање биолошких ефеката IL-4 и IL-13. Овај рецептор је присутан на бројним ћелијским типовима, укључујући Б лимфоците, мононуклеарне фагоците, дендритске ћелије, еозинофиле, базофиле, ендотелне и епителне ћелије, као и фибробласте.

У физиолошким условима IL-13 учествује у заштити од хелминтских инфекција, док у патолошким условима има важну улогу у развоју алергијске инфламације. Заједно са IL-4 подстиче класну промену антитела ка IgE, стимулише рекрутовање инфламаторних ћелија и учествује у алтернативној активацији макрофага. Посебно значајно дејство IL-13 односи се на повећање продукције мукуса од стране епителних ћелија дисајних путева, што представља један од главних механизма настанка симптома код астме и других алергијских обољења. За разлику од IL-4, IL-13 нема пресудну улогу у иницијалној диференцијацији Th2 лимфоцита (1, 10, 16, 18).

**Интерлеукин-5:** Интерлеукин-5 представља најважнији цитокин одговоран за развој и активацију еозинофила и сматра се кључном кариком која повезује Th2 имунски одговор са еозинофилном инфламацијом. Структурно је хомодимерни протеин који припада породици цитокина типа I. Главни извори IL-5 су Th2 лимфоцити и ILC2 ћелије. Његов рецептор чини специфични  $\alpha$  ланац удружен са заједничким  $\beta$  ланцем, који деле и рецептори за IL-3 и гранулоцитно-макрофагни колонијестимулишући фактор.

Основна функција IL-5 је подстицање пролиферације, сазревања и преживљавања еозинофила, као и њихова активација у периферним ткивима. Под утицајем овог цитокина еозинофили стичу способност ослобађања цитотоксичних гранула и других медијатора који учествују у уништавању паразита. Захваљујући експресији Fc рецептора за IgA и поједине подкласе IgG антитела, еозинофили препознају и везују хелминте обложене антителима и на тај начин посредују њихово оштећење и елиминацију. Поред улоге у антипаразитарној одбрани, исти механизми доприносе развоју хроничне еозинофилне инфламације у бројним алергијским болестима (1, 11, 17, 18).

#### 1.1.1.3.3. Th17 субпопулација

Th17 ћелије представљају посебан подскуп Т помоћничких лимфоцита чија је основна улога организовање инфламаторног одговора усмереног првенствено против екстрацелуларних бактерија и гљивица. За разлику од Th1 и Th2 ћелија, које превасходно активирају макрофаге или еозинофиле, Th17 ћелије омогућавају ефикасно привлачење неутрофила и других инфламаторних ћелија на место инфекције. Поред учешћа у антимикробној одбрани, њихови цитокини имају важну улогу у очувању интегритета епителних баријера и регенерацији оштећених ткива. Иако су ови механизми од суштинског значаја за заштиту домаћина, њихова продужена или неконтролисана активација може допринети настанку хроничних инфламаторних и аутоимунних обољења (19, 20).

Диференцијација Th17 ћелија покреће се у условима интензивне инфламације, најчешће током инфекција бактеријама и гљивицама. Након препознавања микробних структура, дендритске ћелије и макрофаги луче више проинфламаторних цитокина, укључујући IL-1, IL-6 и IL-23, који заједнички усмеравају диференцијацију наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ка Th17 фенотипу. Посебно је значајна активација рецептора *Dectin-1* на дендритским ћелијама након препознавања гљивичних  $\beta$ -гљукана, што представља снажан стимулус за продукцију ових цитокина (19).

Док IL-1 и IL-6 учествују у раним фазама развоја Th17 ћелија, IL-23 има кључну улогу у њиховом ширењу, стабилизацији и дуготрајном одржавању. Посебно је занимљиво да TGF- $\beta$ , који се у већини околности сматра антиинфламаторним медијатором, у присуству проинфламаторних сигнала може подстицати настанак Th17 ћелија и развој проинфламаторног одговора. Насупрот томе, цитокини карактеристични за Th1 и Th2 имунитет, интерферон- $\gamma$  и интерлеукин-4,

ограничавају развој овог подскупа, што указује на постојање сложене међусобне регулације различитих Т помоћничких ћелија (14, 19).

Th17 лимфоцити су посебно бројни у мукозним ткивима, а највећа концентрација налази се у гастроинтестиналном тракту. Ова чињеница указује да локални микромедијум има значајну улогу у њиховом развоју, обезбеђујући високе концентрације TGF- $\beta$  и других инфламаторних медијатора. Бројна истраживања показала су да је развој Th17 ћелија у цревима тесно повезан са саставом интестиналног микробиома. Одређене комензалне бактерије способне су да снажно подстакну настанак овог подскупа, што указује на значајну улогу микробиоте у обликовању локалног имунског одговора. Због тога се Th17 ћелије сматрају важним учесницима како у одбрани од цревних инфекција тако и у развоју хроничних инфламаторних болести гастроинтестиналног тракта (19).

Основни механизам деловања Th17 ћелија заснива се на рекрутовању неутрофила у жариште инфекције. Неутрофили представљају главне ефекторске ћелије у елиминацији бројних бактерија и гљивица које опстају ван ћелија домаћина, али су осетљиве на уништавање након фагоцитозе. Стварањем локалне средине богате хемокинима и проинфламаторним цитокинима, Th17 ћелије обезбеђују брз долазак ових фагоцита на место инфекције. Највећи део ових активности посредован је IL-17, али и други цитокини које луче Th17 ћелије значајно доприносе антимикубној одбрани и одржавању баријерних функција епитела (1, 19, 20).

**Интерлеукин-17:** Интерлеукин-17 представља централни ефекторски цитокин Th17 подскупа и чини главну везу између стеченог имунитета посредованог Т лимфоцитима и акутне инфламације као једног од основних механизма урођене одбране. По својој структури и рецепторском систему овај цитокин се значајно разликује од већине других познатих цитокина. Породица IL-17 обухвата шест сродних молекула, при чему су IL-17A и IL-17F функционално и структурно најближи. Највећи део биолошких активности породице посредован је управо молекулом IL-17A (20).

Поред Th17 ћелија, IL-17A продукују и група 3 урођених лимфоидних ћелија, као и поједине  $\gamma\delta$  Т и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитне популације. Рецептори за IL-17 експримовани су на великом броју различитих ћелија, што омогућава широко деловање овог цитокина у различитим ткивима и органима.

Најважнија биолошка дејства IL-17 су:

- Подстицање развоја инфламаторног одговора богатог неутрофилима. IL-17 стимулише продукцију хемокина и проинфламаторних цитокина који омогућавају привлачење неутрофила и моноцита у жариште инфекције. Истовремено повећава продукцију гранулоцитног колонијестимулишућег фактора, чиме се убрзава стварање нових неутрофила у коштаном сржи.

- Појачавање антимикробне активности епителних и других ћелија путем индукције синтезе дефензина и других антимикробних пептида који директно учествују у уништавању микроорганизама.
- Одржавање локалног инфламаторног одговора кроз стимулацију продукције TNF, интерлеукина-1 и других медијатора који појачавају комуникацију између урођеног и стеченог имунитета (1, 19, 20).

**Остали цитокини Th17 ћелија: IL-22 и IL-21:** Поред интерлеукина-17, Th17 лимфоцити продукују и више других цитокина који учествују у регулацији локалног имунског одговора. Најзначајнији међу њима су интерлеукин-22 и интерлеукин-21.

Интерлеукин-22 припада породици цитокина типа II и продукују га пре свега активирани Th17 ћелије, али и одређене популације природних килер ћелија и урођених лимфоидних ћелија. Његова главна улога односи се на одржавање интегритета епителних баријера. IL-22 делује на епителне ћелије коже, црева и других мукозних површина, стимулишући њихову пролиферацију, регенерацију и продукцију антимикробних пептида. На тај начин доприноси очувању физичке и функционалне баријере између организма и спољашње средине. Истовремено, прекомерна продукција IL-22 може појачати инфламацију и учествовати у оштећењу ткива током хроничних инфламаторних обољења.

Интерлеукин-21 је цитокин са израженим имунорегулаторним својствима који продукују активирани CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, посебно Th17 и Т фоликуларне помоћничке ћелије. Рецептор за IL-21 припада породици рецептора за цитокине типа I и експримован је на бројним популацијама имуних ћелија. Једна од његових најважнијих функција односи се на подршку хуморалном имунском одговору у герминативним центрима лимфних органа. IL-21 подстиче развој Т фоликуларних помоћничких ћелија, стимулише активацију и диференцијацију Б лимфоцита и омогућава ефикасније стварање антителског одговора. Поред тога, повећава пролиферацију и функционалну активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и природних килер ћелија, чиме доприноси широј координацији адаптивног имунитета (1, 21).

#### 1.1.1.4. Б лимфоцити

Б лимфоцити, ћелије које производе антитела, добили су назив јер је код птица утврђено да сазревају у органу који се назива бурза Фабрицијуса. Код сисара не постоји анатомски еквивалент бурзе, а ране фазе сазревања В ћелија одвијају се у коштаном сржи. Стога се назив В лимфоцити односи на ћелије пореклом из коштане сржи (2).

**Подтипови В лимфоцита:** Главни подтипови В ћелија су фоликуларне В ћелије, В ћелије маргиналне зоне и В-1 ћелије, од којих се свака налази у различитим анатомским локализацијама унутар лимфоидних ткива. Фоликуларне В ћелије, најбројнији тип В ћелија у организму, налазе се у лимфоидним ткивима и крви. Оне експримују високо разноврсне, клонално распоређене скупове антитела који служе као рецептори за антиген на површини ћелије, али и као главни секретовани ефекторски молекули хуморалног имунитета. Фоликуларне В ћелије дају већину високоафинитетних антитела и меморијских В ћелија које штите организам од поновних инфекција истим микроорганизмима. Насупрот томе, В-1 ћелије и В ћелије маргиналне зоне чине мањинску популацију В лимфоцита и производе антитела ограничене разноврсности. В-1 ћелије се углавном налазе у мукозним ткивима, као и у перитонеалној и плеуралној дупљи, док су В ћелије маргиналне зоне код глодара присутне искључиво у слезини, али се код људи могу наћи и у циркулацији (1, 22).

### 1.1.2. Дендритске ћелије

Дендритске ћелије (DC) су ћелије присутне у ткивима и у циркулацији које препознају присуство микроорганизама и иницирају реакције урођеног имунског одговора, а такође хватају микробне протеине и презентују их Т лимфоцитима, чиме покрећу стечени имунски одговор. Дендритске ћелије представљају функционално и развојно повезану популацију са моноцитима, те се могу развити из циркулишућих прекурсора који припадају МНЋ фракцији. Иако су у периферној крви присутне у малом броју, оне имају централну улогу у иницирању стеченог имунског одговора као професионалне антиген-презентујуће ћелије (1). Још 1868. године, Лангерханс је описао епидермалне интердигиталне дендритске ћелије (ДЋ), али су интензивнија истраживања у области њихове биологије започета тек пре око четири деценије, захваљујући радовима Штајнмана и Кона (23). Овако „касно“ откриће ДЋ може се објаснити чињеницом да су ове ћелије у организму присутне у веома малом броју, што је отежавало њихову изолацију и детаљно проучавање. Већина података о њима стога потиче из експеримената спроведених *in vitro*. Данас је познато да су ДЋ ретке ћелије (чине мање од 1% циркулишућих моноклеарних ћелија у периферној крви), а представљају хетерогену групу ћелија пореклом од заједничког прекурсора дендритских ћелија (common dendritic cell progenitor – CDP) и насељавају све лимфоидне и скоро све нелимфоидне органе (23, 24). Иако се међусобно разликују према анатомској локализацији, фенотипским особинама и функцији, све ДЋ имају изузетан капацитет за презентацију антигена и активацију наивних Т лимфоцита и иницирање стеченог имунског одговора (25).

Код људи, већина ДЋ у циркулацији су незреле ћелије које још нису дошле у контакт са антигеном. Оне експримирају МНС молекуле, али у малој мери или уопште не испољавају маркере који су карактеристични за њихову диференцијацију и активацију, попут CD83, или костимулаторних молекула као што су CD40, CD80 и CD86 (26, 27). Ове ћелије мигрирају из крви и насељавају већину нелимфоидних ткива и органа (кожу, срце, јетру, плућа и др.), где формирају интерстицијалну мрежу. Дендритске ћелије су веома специјализоване за преузимање и процесирање сопствених или егзогених антигена, који се затим разграђују до антигенских пептида и у комбинацији са МНС II молекулима испољавају на површини ћелије. Када незреле ДЋ дођу у контакт са антигеном, долази до њихове активације. Комплетан процес активације одвија се у условима инфламације, односно у присуству сигналних молекула неопходних за сазревање ДЋ (28).

Активација дендритских ћелија у великој мери је посредована рецепторима урођеног имунитета, посебно Toll-like рецепторима (TLR), који препознају конзервисане молекуларне обрасце патогена и иницирају сигналне путеве који доводе до сазревања и функционалне активације ових ћелија (29). Многи различити молекули могу подстаћи активацију и сазревање ДЋ, доводећи их из фазе незрелих ћелија које преузимају антиген до зрелих ћелија које га презентују. Сигнали за сазревање могу бити ендогеног порекла тј. ендогени сигнали оштећења (DAMPs), настали као последица некрозе ћелија или разградње ткива, укључујући *heat shock*

протеине, продукте разградње ванћелијског матрикса и различите цитокине. Такође, сазревање ДТ може бити изазвано и егзогеним факторима као што су компоненте бактерија, вируса, гљивица и паразита. Производи патогена, као што су липополисахариди (LPS) (30), бактеријска ДНК (31) и вирусна РНК (32), могу деловати као сигнали за сазревање ДТ. Поред тога, активација може бити посредована и сигнаlima од стране Т ћелија, као што су CD40L и IFN- $\gamma$ . Током процеса сазревања, ДТ пролазе кроз бројне промене, како фенотипске, тако и функционалне. Ове промене укључују прераспodelу МНС молекула са унутарћелијских ендокитозних одељака на површину ћелије, смањење капацитета за интернализацију антигена, повећање експресије костимулаторних молекула, морфолошке промене (попут формирања дендрита), реорганизацију цитоскелета, секрецију хемокина, цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 и IFN- $\alpha$ ), као и експресију адхезивних молекула и хемокинских рецептора на површини ћелије. Све ове промене омогућавају да ДТ мигрирају из нелимфоидних ткива ка Т-ћелијским зонама лимфоидних органа (33,34). Њихова миграција је усмеравана хемокинима лимфоидних органа и зависи од експресије рецептора CCR7 на њиховој површини (35). Када ДТ у лимфоидним органима успоставе контакт са специфичним Т лимфоцитима, наступа завршна фаза њихове сазрелости, која је посредована интеракцијом између CD40 и CD40L молекула. Овај процес омогућава оптималну презентацију антигена и ефикасну активацију Т ћелија (36).

#### 1.1.2.1. Субпопулације хуманих дендритских ћелија

Савремена класификација дендритских ћелија заснива се на њиховом пореклу, фенотипу и функцији, при чему се код људи разликују три главне популације: конвенционалне дендритске ћелије типа 1 (cDC1), конвенционалне дендритске ћелије типа 2 (cDC2) и плазмоцитоидне дендритске ћелије (pDC). Поред ових популација, у условима инфламације значајну улогу имају и моноцитима сродне дендритске ћелије (moDC), које настају из циркулишућих моноцита (25, 37).

**Конвенционалне дендритске ћелије (cDC):** Конвенционалне дендритске ћелије (cDC) представљају главну популацију професионалних антиген-презентујућих ћелија које имају кључну улогу у иницирању адаптивног имунског одговора. Према савременој класификацији, код људи се разликују две основне субпопулације конвенционалних дендритских ћелија: cDC1 и cDC2, које се међусобно разликују по фенотипу, функцији и способности усмеравања имунског одговора (25, 38).

cDC1 ћелије су специјализоване за унакрсну презентацију (cross-presentation) егзогених антигена путем МНС I молекула, што омогућава ефикасну активацију CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита. Ове ћелије имају значајну улогу у антивирусном и антитуморском имунитету. Карактерише их експресија површинских маркера CD141 (BDCA3) и XCR1 (39).

cDC2 ћелије су примарно укључене у презентацију антигена путем МНС II молекула и активацију CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, уз способност усмеравања диференцијације Т helper (Th) ћелија у различите ефекторске субпопулације (Th1, Th2, Th17). Ове ћелије експримирају маркер CD1c (BDCA1) и представљају хетерогену популацију која учествује у регулацији имунског одговора у различитим ткивима (40).

Лангерхансове ћелије, које су раније сматране посебном линијом дендритских ћелија, данас се сврставају у ткивне дендритске ћелије и представљају специфичан подтип конвенционалних дендритских ћелија локализован у епидермису. Оне поседују карактеристичне морфолошке и фенотипске особине, укључујући присуство Бирбекових гранула и експресију лангерина (CD207), али функционално деле основне карактеристике са другим cДТ популацијама (41).

**Плазмоцитоидне дендритске ћелије (pDC):** Плазмоцитоидне дендритске ћелије (pDC) представљају посебну субпопулацију дендритских ћелија које се морфолошки одликују сличношћу са плазма ћелијама, а функционално имају кључну улогу у антивирусном имунском одговору. Ове ћелије се налазе у периферној крви и лимфоидним органима, где учествују у раној фази имунског одговора (42). Основна карактеристика pДТ је способност продукције великих количина интерферона типа I (IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ) након стимулације вирусним нуклеинским киселинама. Ова функција је посредована *Toll-like* рецепторима TLR7 и TLR9, који препознају вирусну РНК и ДНК у ендозомима, што доводи до снажне активације антивирусних механизма (43, 44).

Фенотипски, pДТ карактерише експресија маркера CD123 (IL-3 рецептор), као и одсуство мијелоидних маркера као што је CD11c. Поред тога, ове ћелије експримирају HLA-DR и способне су да, након активације, презентују антиген и активирају Т лимфоците, иако је ова функција мање изражена у поређењу са конвенционалним дендритским ћелијама (45).

Иако су првобитно сматране лимфоидном линијом, савремени подаци указују да pДТ потичу од заједничких прекурсора дендритских ћелија, што их сврстава у јединствену развојну групу са осталим дендритским ћелијама (42).

**Дендритске ћелије моноцитног порекла (moDC):** Дендритске ћелије моноцитног порекла (moDC) представљају популацију дендритских ћелија које настају диференцијацијом циркулишућих моноцита, посебно у условима инфламације или у *in vitro* условима. Ове ћелије имају значајну улогу у експерименталним моделима, јер представљају најчешће коришћен систем за проучавање функције дендритских ћелија у оквиру популације моноклеарних ћелија периферне крви (46, 47).

У *in vitro* условима, моноцити периферне крви се у присуству GM-CSF и IL-4 диференцирају у незреле дендритске ћелије, које карактерише способност интензивне ендцитозе и процесирања антигена. Даља стимулација инфламаторним сигнаlima, као што су липополисахарид (LPS) или проинфламаторни цитокини, доводи до њиховог сазревања, које је праћено повећањем експресије МНС II и

костимулаторних молекула (CD80, CD86, CD40), као и стицањем способности активације Т лимфоцита (48, 49).

Фенотипски, моДТ задржавају одређене карактеристике моноцитног порекла, али функционално стичу особине конвенционалних дендритских ћелија. Оне представљају важну карику између урођеног и стеченог имунитета, посебно у условима инфламације, где доприносе иницирању и модулацији имунског одговора (50).

С обзиром да настају из популације моноклеарних ћелија периферне крви, моДТ имају посебан значај у експерименталним условима *in vitro*, где се широко користе за испитивање утицаја различитих физичких и биолошких фактора на функцију имуних ћелија.

#### 1.1.2.2. Аутоимуност: улога дендритских ћелија

Аутоимуност се одликује губитком толеранције на сопствене антигене, што доводи до активације аутореактивних лимфоцита и штетног имунског одговора усмереног против сопствених ткива или органа. Иако механизми који доводе до развоја аутоимуности нису у потпуности разјашњени, дендритске ћелије имају централну улогу у одржавању толеранције и њеном нарушавању, кроз равнотежу између имуноактивације и индукције регулаторних механизма (51). Истраживања су показала да особе са инсулин-зависним дијабетесом типа 1 имају измењен фенотип и функцију ДТ, као и смањен број регулаторних Т ћелија, што доводи до дисрегулације ефекторских Т ћелија, укључујући Th1 и Th17 одговоре, уз истовремено смањење регулаторних Т ћелија (52, 53, 54). Код пацијената са системским лупус еритематозусом (SLE) примећено је да плазмоцитоидне дендритске ћелије имају кључну улогу кроз појачану продукцију интерферона типа I (пре свега IFN- $\alpha$ ), што представља централни механизам у патогенези болести (55). Мишји модели SLE указују на повећан број мијелоидних ДТ (56). Повећана концентрација ДТ детектована је и у зглобовима пацијената са реуматоидним артритисом, док је анализа синовијалне течности ових пацијената открила присуство прекурсора ДТ и фактора раста мијелоидних ДТ, попут GM-CSF, TNF и IL-13, што указује да инфламаторна микросредина у синовијуму подстиче активацију дендритских ћелија и одржава хронични аутоимуни одговор (57). Код пацијената са мултиплом склерозом уочени су повишени нивои IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-17, што указује на учешће Th1 и Th17 механизма, као и дисбаланс у секрецији металопротеиназа и њихових инхибитора од стране моноцитних ДТ (58). Постоје бројни докази о улози дендритских ћелија у патогенези Шегреновог синдрома и аутоимуних болести штитне жлезде, посебно кроз презентацију аутоантигена и продукцију проинфламаторних цитокина (59, 60).

### 1.1.2.3. Трансплантација органа: улога дендритских ћелија

Дендритске ћелије имају централну улогу у иницирању и регулацији алоимунског одговора током трансплантације органа. Оне које потичу од донора мигрирају у Т ћелијске зоне лимфоидног ткива примаоца. Овај процес омогућава директно препознавање алогених МНС антигена који се налазе на мембрани ДТ донора од стране Т ћелија примаоца, што доводи до снажне активације Т лимфоцита и представља доминантни механизам раног, акутног одбацивања трансплантата. Док су ДТ донора кључне за директно алопрепознавање, ДТ примаоца такође имају кључну улогу у хроничном одбацивању трансплантата и одржавању алоимунског одговора путем индиректног алопрепознавања. Индиректно препознавање подразумева да Т ћелије примаоца идентификују комплекс пептида донора и МНС молекула примаоца које презентују ДТ примаоца. Поред директног и индиректног пута, описан је и semi-direct пут алопрепознавања, у коме дендритске ћелије примаоца преузимају интактне МНС молекуле донора (тзв. „cross-dressing“) и презентују их Т ћелијама, чиме додатно доприносе активацији алореактивних лимфоцита (61). Иако је директни пут доминантан у раној фази након трансплантације, релативни допринос директног и индиректног алопрепознавања варира у зависности од типа ткива, времена након трансплантације и имунолошког статуса примаоца (62, 63).

### 1.1.2.4. Дендритске ћелије и имунолошка толеранција

Имунотолеранција представља активно регулисан процес којим имунски систем спречава одговор на сопствене и безопасне антигене, уз очување способности реаговања на патогене. Када специфични лимфоцит ступи у контакт са антигеном, може бити активираан, али и инактивираан или елиминисан, што доводи до развоја толеранције. Толеранција на сопствене антигене (аутотолеранција) представља кључну карактеристику здравог имунског система и може бити централна или периферна.

**Централна и периферна толеранција:** Централна толеранција успоставља се у примарним лимфоидним органима, тимусу и коштаном сржи. Током сазревања у тимусу, Т ћелије стичу способност препознавања антигенских пептида у оквиру сопствених МНС молекула. Оне које испољавају високу афинитетну везу за сопствене пептиде бивају елиминисане механизмом негативне селекције. Овај процес се одвија путем клонске делеције (апоптозе) или функционалне инактивације (анергије). С друге стране, Т ћелије са нискоафинитетним рецепторима преживљавају и прелазе у периферију кроз позитивну селекцију. Тимусне епителне ћелије играју кључну улогу у позитивној селекцији, док у негативној селекцији учествују како тимусне дендритске ћелије, тако и епителне ћелије тимуса, уз кључну улогу AIRE (autoimmune regulator) протеина у презентацији ткивно-специфичних антигена у тимусу (64).

Периферна толеранција обухвата механизме који спречавају зреле Т ћелије да реагују на сопствене антигене ван примарних лимфоидних органа. Ови механизми укључују делецију Т ћелија, анергију и супресију коју посредују регулаторне Т ћелије (Treg). ДТ такође имају значајну улогу у периферној толеранцији. Оне могу индуковати анергију Т ћелија презентујући антигене без довољне експресије костимулационих молекула, или могу директно изазвати индукцију регулаторних Т ћелија (65).

**Толерогене дендритске ћелије (tolDC):** Истраживања указују да ДТ које нису потпуно сазреле или су изложене специфичним инхибиторним цитокинима имају умањену способност активирања Т ћелија. Оне могу спречити Т ћелијски одговор на стране антигене и на тај начин индуковати специфичну имуно толеранцију (25). Ова могућност је основа за развој стратегија које користе ДТ у терапији аутоимуних болести, преосетљивости и спречавању одбацивања трансплантата.

Толерогени ефекат дендритских ћелија пре свега укључује индукцију регулаторних Т ћелија (Treg), анергију и делецију ефекторских Т ћелија (66, 67).

**Молекуларни механизми толерогености дендритских ћелија:** а) **Костимулација и коинхибиција:** ДТ које имају високу експресију МНС класе II и костимулационих молекула попут CD40, CD80 и CD86 као и експресију коинхибиторних молекула као што су PD-L1, ILT3 и ILT4, су снажни активатори наивних Т ћелија. Њихово смањење или одсуство може трансформисати ДТ у толерогене ћелије, доводећи до анергије Т ћелија уместо њихове активације (68). Овај ефекат је потврђен у моделима трансплантације, где је продужено преживљавање трансплантата остварено блокирањем B7-CD28 пута (69) или спречавањем потпуне сазрелости ДТ (70). Сличан ефекат је уочен у моделима експерименталног енцефаломијелитиса (ЕАЕ), где су ДТ без CD80 и CD86 спречавале развој болести (65).

Интеракција незрелих дендритских ћелија, код којих је снижена експресија костимулаторних молекула, са Т лимфоцитима може довести до њихове диференцијације у правцу регулаторних Т ћелија. Овај процес су потврдили Јонулеит и сарадници, који су показали да поновљена изложеност алогеним људским Т лимфоцитима незрелим моДТ доводи до индукције IL-10 продукујућих регулаторних Т ћелија (Tr1) (66, 71).<sup>7</sup>

б) **Индукција регулаторних Т ћелија:** Дендритске ћелије такође могу активно индуковати диференцијацију регулаторних Т ћелија (Treg), пре свега путем продукције имуносупресивних цитокина као што су IL-10 и TGF- $\beta$ , чиме доприносе одржавању периферне толеранције. Поред тога, толерогене дендритске ћелије карактерише стабилан фенотип који фаворизује одржавање Treg популације и спречава диференцијацију ефекторских Т ћелија, чак и у присуству инфламаторних сигнала (72).

в) **Апоптоза и инхибиторни рецептори:** Један од механизма имуно толеранције је способност ДТ да индукују апоптозу Т ћелија. Показано је да

мијелоидне ДТ, иако изражавају МНС класе II и костимулационе молекуле, слабо индукују апоптозу Т ћелија. Међутим, блокирање костимулационих путева значајно повећава апоптозу (68). Поред Fas-FasL механизма, у индукцији апоптозе учествују и TNF/TNF-R и TRAIL/TRAIL-R путеви. CD11+ДТ, које експримирају TRAIL, могу убити ћелије које изражавају TRAIL рецепторе, док IL-3Rα+ субпопулација ДТ, која не експримира TRAIL, не изазива апоптозу (73).

**г) Метаболички механизми (IDO, NO):** Азот-оксид (NO) се производи метаболизмом аргинина уз дејство ензима NO синтазе (NOS). Овај молекул може инхибирати активацију и пролиферацију Т ћелија, као и ензим индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), који катаболизмом триптофана инхибира пролиферацију Т ћелија и подстиче развој Treg (74). У студијама са мишевима третираним LPS-ом, показано је да NO произведен од стране ДТ може бити одговоран за апоптозу тимоцита (75). Такође, NO директно утиче на ДТ, смањујући њихову способност презентације антигена и индукујући њихову апоптозу (76, 77). NO се уплиће и у регулацију Th1/Th2 имуног одговора. Утврђено је да при нижим концентрацијама подстиче Th1 реакцију, док при вишим концентрацијама доводи до њене супресије. Овај инхибиторни утицај на Th1 одговор вероватно је повезан са смањеном продукцијом IL-12. Поред тога, имunosупресивни медијатори које продукују дендритске ћелије, укључујући NO и индоламин 2,3-диоксигеназу, могу допринијети индукцији и одржавању регулаторних Т ћелија, чиме се додатно јача периферна толеранција (78).

**д) NF-κB и сигнализација:** NF-κB је транскрипциони фактор који контролише експресију гена укључених у имунске и инфламаторне реакције (78). Његова активација је неопходна за сазревање и активацију ДТ (2). Блокада NF-κB, било специфичним инхибиторима (79) или CsA (80), доводи до смањења експресије костимулационих молекула и слабљења алостимулаторне активности ДТ и тако спречава њихово сазревање и промовише њихов толерогени фенотип. NF-κB олигодезоксинуклеотиди (ODN), који се специфично везују за NF-κB, инхибирају експресију костимулационих молекула без утицаја на МНС експресију (81).

Ови механизми представљају основу за разумевање улоге ДТ у имунотолеранцији и њихов потенцијал за терапијску примену у лечењу аутоимуних обољења, алергија и толеранције трансплантата.

## 1.2. ЕЛЕКТРОМАГНЕТНА РАДИЈАЦИЈА

У физици, радијација представља емисију или пренос енергије у облику таласа или честица кроз простор или материју. Један од облика радијације је електромагнетна радијација, коју чине електромагнетни таласи – синхронизоване осцилације електричних и магнетних поља које се шире брзином светлости кроз вакуум.

Електромагнетни таласи могу се класификовати према фреквенцији и таласној дужини њихових осцилација, чиме се формира електромагнетни спектар. У смеру повећања фреквенције и смањења таласне дужине, спектар чине: радио-таласи, микроталаси, инфрацрвена радијација, видљива светлост, ултраљубичаста радијација, Х-зраци и гама-зраци.

У зависности од тога да ли имају довољно енергије да јонизују атоме и молекуле и прекидају хемијске везе у материји кроз коју пролазе, електромагнетна радијација се дели на јонизујућу и нејонизујућу. Гама-зраци, Х-зраци и високоенергетски део ултраљубичасте светлости чине јонизујући део електромагнетног спектра. Спектар ниже енергије и дуже таласне дужине – који обухвата видљиву светлост, инфрацрвену светлост, микроталасе и радио-таласе – спада у нејонизујућу радијацију. Њихов главни ефекат у интеракцији са биолошким ткивом је загревање. Ултраљубичаста радијација има особине и јонизујуће и нејонизујуће радијације. Њен део који пролази кроз Земљину атмосферу је нејонизујући, али њени ефекти на молекуле биолошких система знатно су већи него што би се могло објаснити само загревањем. Најпознатији пример су опекотине од сунца. Таква оштећења настају због способности ултраљубичасте радијације да наруши хемијске везе, иако нема довољно енергије да јонизује атоме (82, 83).

### 1.2.1. Нејонизујућа радијација

Нејонизујућа радијација обухвата енергију која, уместо да производи наелектрисане јоне приликом проласка кроз материју, има само довољно енергије за екситацију. Ипак, познато је да узрокује биолошке ефекте.

Нејонизујућа радијација обухвата онај део електромагнетног спектра који карактеришу:

- дуга таласна дужина ( $>100 \text{ nm}$ ),
- ниска енергија фотона ( $<12,4 \text{ eV}$ ),
- фреквенција од  $1 \text{ Hz}$  до  $3 \times 10^{15} \text{ Hz}$ .

Сем уског видљивог дела спектра, нејонизујућа радијација није могуће перципирати ниједним људским чулом, осим ако њен интензитет није толико велики да се осети као топлота.

Нејонизујући део електромагнетног спектра подељен је на четири региона:

- Стално електрично и магнетно поље, 0 Hz;
- Поља екстремно ниске фреквенције, >0 Hz – 300 Hz;
- Радиофреквентна и микроталасна радијација, 300 Hz – 300 GHz;
- Оптичка радијација:
  - инфрацрвена, 760 – 10<sup>6</sup> nm;
  - видљива, 400 – 760 nm;
  - ултраљубичаста, 100 – 400 nm.

Извори нејонизујућег зрачења могу бити природни (Сунце, пражњење муње) или вештачки, настали као резултат људске активности (бежична комуникација, индустријска, научна и медицинска примена) (84, 85, 86).

### 1.2.2. Стално магнетно поље

Термин „стално“ магнетно поље, као стил научне редакције, а не као промена парадигме, замењује у дпмаћим научним круговима, термин „статичко“ магнетно поље, који се сматра англицизмом (static magnetic field) у српском језику и научној терминологији. Међутим, у општој употреби, може се рећи да постоји универзалност термина „статичко“ магнетно поље.

#### 1.2.2.1. Физичке величине и јединице

Као што у простору око сваке непокретне наелектрисане честице постоји електростатичко поље, тако и око сваке наелектрисане честице у покрету постоји магнетно поље. Дакле, магнетно поље постоји око проводника кроз које протиче електрична струја, као и око природних и вештачких магнета.

Магнетно поље делује физичком силом на електрични набој, али само када је он у покрету. Описује се као векторско поље и може се изразити на два начина:

- густина магнетног флуksа или магнетна индукција (***B***),
- јачина магнетног поља (***H***).

У стандардним (SI) јединицама, ***B*** и ***H*** мере се у теслима (T) и амперима по метру (A/m), респективно.

У вакууму и ваздуху, ове две величине су линеарно зависне:

$$\mathbf{B} = \mu \mathbf{H}$$

где је  $\mu$  магнетна пермеабилност средине (материје) и има нумеричку вредност  $4\pi \times 10^{-7}$ , изражену у хенријима по метру (H/m).

За описивање магнетног поља у ваздуху или немагнетним материјалима (укључујући биолошке материјале) довољно је користити једну од ових величина.

Јачина силе  $\mathbf{F}$  која делује на електрични набој  $q$ , који се креће брзином  $\mathbf{v}$  у правцу нормалном на густину магнетног флуksа  $\mathbf{B}$ , дата је формулом:

$$\mathbf{F} = q (\mathbf{v} \times \mathbf{B})$$

Правац силе (Лоренцова сила) одређен је производом вектора брзине набоја и густине магнетног флуksа, те је увек нормалан на правац кретања набоја. Због тога, интеракција магнетног поља са електричним набојем резултује променом правца кретања набоја, али никада променом брзине. Стално магнетно поље не депонује енергију у ткиво.

Густина магнетног поља, мерена у теслима, прихваћена је као најрелевантнија величина за опис ефеката магнетног поља. Преглед величина и јединица магнетног поља приказан је у Табели 1. Стандардне (SI) јединице су међународно прихваћене јединице за изражавање физичких величина у стручној литератури (87).

Табела 1. Физичке величине статичког магнетног поља и одговарајуће SI јединице

| Физичка величина          | Симбол  | Јединица                                  |
|---------------------------|---------|-------------------------------------------|
| Електрична струја         | $I$     | Ампер (A)                                 |
| Густина електричне струје | $J$     | Ампер по квадратном метру ( $A\ m^{-2}$ ) |
| Јачина магнетног поља     | $H$     | Ампер по метру ( $A\ m^{-1}$ )            |
| Магнетни флуks            | $\Phi$  | Вебер (Wb ili $T\ m^2$ )                  |
| Густина магнетног флуksа  | $B$     | Тесла (T)                                 |
| Пермеабилност             | $\mu$   | Хенри по метру ( $Hm^{-1}$ ).             |
| Пермеабилност у вакууму   | $\mu_0$ | $4\pi \times 10^{-7}$ ( $Hm^{-1}$ ).      |

### 1.2.2.2. Извори експозиције

Живи организми су константно изложени природном сталном магнетном пољу тзв. геомагнетном пољу, чија јачина је око 50  $\mu\text{T}$ , а у зависности од географског положаја, варира између 25 и 65  $\mu\text{T}$  (88,89). Током еволуције, одређене животињске врсте су развиле специфичне механизме за перцепцију природних електричних и магнетних таласа, на основу чега се базира њихова оријентација и миграција (90,91). Густина магнетног флукса од 20  $\mu\text{T}$  је присутна испод високонапонских далековаода. У будућности постоји реалан потенцијал за експозицију већим густинама магнетног поља због развоја нових транспортних технологија. Наиме, брзи путнички возови засновани на магнетној левитацији (MAGLEV возови), продукују релативно високе густине магнетног флукса у близини мотора. Међутим, и код возова са магнетном левитацијом, као и код конвенционалних електричних возова, поља у путничким кабинама су релативно слаба, испод 100  $\mu\text{T}$ , али локализована магнетна поља до неколико mT могу постојати због присуства индуктора испод пода вагона (89,92). Остали извори сталног магнетног поља у кућном и радном амбијенту су мали стални магнети у облику магнетних спојница или додатака (дугмад, магнетне огрлице и наруквице, магнетни каишеви, торбе, играчке и сл.), који стварају локално стално поље од 0,5 mT.

Највећа непрофесионална експозиција је присутна код пацијената који су подвргнути дијагностичком прегледу магнетном резонанцом (MR), процедуром која се користи за дијагностику, али све више и као водич за хируршке интервенције у телу. MR је заснована на принципу нуклеарно магнетне резонанце, а подразумева MR снимање и спектроскопију. У току MR процедура, густина магнетног флукса обично варира од 0,15 до 3 T, а експозиција је обично ограничена на мање од 1h, али може трајати и неколико часова (93). Инвазивне медицинске процедуре под директним контролом са MR постају све чешће. Овакве интервенције доводе до повећане професионалне експозиције, нарочито за медицинско особље (хирурзи, радиолози, медицинске сестре и техничари). Током оваквих процедура, медицинско особље може и по више часова дневно бити изложено магнетном пољу. Такође, повећана експозиција медицинског особља је и у хитним ситуацијама, када они морају бити поред пацијента и интервенисати. MR се сада широко користи и у академским и медицинским истраживањима функције људског мозга. MR системи који користе јача магнетна поља, до 10 T, се све више користе за истраживања у разним институтима широм света. Експозиција је могућа и код других медицинских примена сталног магнетног поља, као што је употреба магнета за придржавање различитих протеза.

Јака поља се такође стварају и у високо-енергетским технологијама као што су термонуклеарни реактори, магнетно-хидродинамички системи и суперкондуктивни генератори. Истраживачки центри који користе акцелераторе честица, суперкондуктивне спектрометре и јединице за одвајање изотопа, такође производе високе густине магнетног флукса око ових уређаја. Индустрија у којој је такође присутна изложеност високом магнетном пољу је и производња алуминијума и хлора,

као и производња сталних магнета и магнетних материјала, где је типична експозиција за највећи део радног дана од неколико mT до неколико десетина mT (87).

### 1.2.2.3. Механизми интеракције

Утврђена су три механизма којима стално магнетно поље делује на живу материју, а то су магнетна индукција, магнетно-механички ефекти и електрична интеракција.

**Магнетна индукција:** Овај механизам се остварује преко два типа интеракција.

**а) Електродинамичка интеракција са електролитима који се крећу:** Стално поље делује на јоне као носиоце наелектрисања које се креће тако што индукује електрична поља и струју. Управо овај механизам је био основа за теоретске анализе потенцијала магнетне индукције на крв која циркулише (94). Наиме, сугерише се да синоатријални чвор, који контролише срчани ритам, је потенцијално најосетљивије место на дејство струје, те је израчунато да је при изложености пољу од 5 T, густина струје у овој области  $100 \text{ mA m}^{-2}$ , што је око 10% од максималне ендogene струје која се ствара током срчане електричне активности, да би та вредност износила и 20% при изложености од 10 T. Детаљна процена ефекта електричног поља на срчану функцију, користећи компјутеризоване моделе електрофизиологије срца, је показала да поља до 8 T вероватно не могу утицати на срчану фреквенцу и ритам, док се то не би могло тврдити за јача поља (95).

**б) Индукована електрична поља и струја:** Обртно магнетно поље у ткиву индукује електричну струју у складу са Фарадејевим законом индукције. Међутим, струја може бити индукована и кретањем у сталном магнетном пољу, нарочито при покретима окретања. Јачина индуковане струје, као и одговарајућег електричног поља, повећава се са брзином кретања у магнетном пољу, али и са густином тог поља. Процене указују да би тако индукована електрична поља била реална током кретања у пољу од 2–3 T (96), те би могла бити одговорна за бројне извештаје о вртоглавици и мучнини коју осете људи који се крећу у таквим пољима (97, 98, и 99). Мерењем на лицу места електричног поља на површини људског организма, које је индуковано магнетним пољем кроз које се тело креће или окреће, показало се да МР апарати дају  $0,15$  и  $0,077 \text{ Vm}^{-1}$  на горњем абдомену, односно глави (100). Најјаче електрично поље од  $30 \text{ Vm}^{-1}$  измерено је на грудима. Брзина кретања у овој студији није одређивана. За тело које се креће брзином од 0,5 мс у магнетном пољу од 4 T, Crozier и Liu су проценили да би максимална јачина индукованог електричног поља била око  $2 \text{ Vm}^{-1}$ , што би било довољан праг за окидање нервних потенцијала фреквенције од 10 Hz до 1 kHz (88). Међутим, ипак фреквенције које се стварају кретањем човека кроз

магнетно поље вероватно су ниже од 10 Hz, те њихово присуство смањује надражљивост нерва, због споре инактивације волтажно-зависних Na канала (101). На пример, фреквенције које се стварају покретањем и окретањем главе током хода су између 0,4 и 4 Hz (102, 103 и 104).

**Магнетно-механички ефекти:** Ови ефекти се остварују преко следећа два механизма:

**а) Магнетна оријентација:** У сталном магнетном пољу, молекули на које магнет делује привлачном силом (парамагнетици) оријентишу се у пољу на тај начин да је њихова слободна енергија у пољу најмања. Овај ефекат испитиван је и код макромолекула различите осетљивости на магнет, које магнетно поље одбија (дијамагнетици). Међутим, ове силе се сматрају малим да би изазвале биолошки ефекат *in vivo*, због веома мале осетљивости ткива на овакав вид интеракције (105). Ипак, показано је да геомагнетно поље утиче на детекцију правца при оријентацији и миграцији одређених животињских врста (89, 106). Штавише, показано је да јака магнетна поља (око 17 T) могу да изазову реоријентацију митотичког апарата, нпр. промену оријентације делова ембриона жабе у току првог до трећег циклуса деобе (107).

**б) Магнетно-механичка транслација:** Градијент сталног магнетног поља производи резултантну силу која изазива транслационо кретање и дијамагнетних и парамагнетних материјала. Правац те силе исти је као градијент поља за парамагнетне материјале, односно супротан градијенту за дијамагнетне. Сила је једнака производу густине магнетног флукса (B) и његовог градијента ( $dB/dx$ ). Оваква сила усмерена на феромагнетне објекте високе магнетне осетљивости, као што су метални (гвожђе и одређене врсте челика) предмети, представља потенцијалну опасност за њихово покретање у јаком градијенту магнетног поља. За биолошке материјале, сила је једнака сили гравитације када је  $BdB/dx > 1.000 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$  (89).

Показано је да магнет од 8 T са градијентом од  $50 \text{ T m}^{-1}$  може да спусти ниво воде која тече хоризонтално у кориту кроз магнетно поље, раздвајајући воду и гурајући је ка крајевима корита који се налазе ван магнета (108). Ефекат 10 T на промену притиска је мањи од 40 mm H<sub>2</sub>O, што се сматра недовољним да би утицало на системску циркулацију човека (109). Међутим, Ichioka et al. су регистровали редукцију протока крви кроз кожу у сталном магнетном пољу од 8 T, којем је био изложен цели пацов; производ густине магнетног флукса и градијента поља варирао је између 200 и  $400 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$  (110).

**Електрична интеракција:** Одређене метаболичке реакције као интермедијере стварају парове радикала, који су обично у ексцитованом стању са спином једног неупареног електрона антипаралелним од спина другог (111, 112, 113, 114, 115, 89). Ови парови радикала са спиновима рекомбинирају да би створили производ реакције;

примењено магнетно поље утиче на степен и обим у којем ће се пар радикала претворити у стање триплета (стабилније, али још увек ексцитирано стање са дислоцираним електроном, али сада паралелног спина), у којем даља рекомбинација није могућа. Иако су презентовани експериментални докази оваквих ефеката у биохемијским системима (116, 117), њихов биолошки значај није до сада разјашњен. За „Механизам парова радикала“ сугерисано је (118) да га неке животиње, нарочито птице, користе као средство за оријентацију у магнетном пољу Земље током миграције, за шта и постоји одређена експериментална потпора (119).

#### 1.2.2.4. *In vivo* и *in vitro* студије

**Лабораторијске *in vitro* студије:** Различити видови биолошке организације на ћелијском нивоу су испитивани (мембране, ензими или биохемијске реакције), као и различити ћелијски системи (бактеријске и ћелије сисара). Студије су испитивале ћелијску оријентацију, раст и метаболичку активност, физиологију мембрана и генску експресију, а представљени су и позитивни и негативни резултати. Добијени ефекти су прилично разноврсни, а примећивани су у широком спектру густине магнетног флуksа (до 8 Т). Прагови регистровања ефекта су показани у неким студијама, док су друге студије показале нелинеарни одговор на дејство магнета, без јасне празне вредности. Такође, добијени резултати углавном нису конзистентни и не могу водити ваљаним закључцима. Горе поменути ефекат на митотички апарат (107) представља један од конзистентнијих резултата, што је потврђено и новијим истраживањима која указују на утицај јачих сталних магнетних поља на организацију цитоскелета и деобу ћелија (119). Што се тиче ефеката на метаболичке процесе у којима су укључени слободни радикали, до сада спроведене студије сугеришу да не постоји већа вероватноћа за физиолошке последице или дуготрајнији мутагени потенцијал, евентуалне промене у концентрацији слободних радикала под дејством магнетног поља (115). До сада је ограничен број савремених студија које су систематски испитивале генотоксичност сталних магнетних поља, уз примену осетљивијих метода за детекцију оштећења ДНК (120). Већина новијих истраживања не показује значајан генотоксичан или епигенетски ефекат чак ни при високим интензитетима сталног магнетног поља, укључујући опсег до неколико тесла, иако резултати могу зависити од експерименталних услова и типа ћелија (121), осим у појединачним моделима са оштећеним механизмима поправке ДНК. Један од најчешће разматраних механизма деловања сталних магнетних поља укључује тзв. *radical pair* механизам, који може утицати на кинетику реакција слободних радикала и тиме посредно модификовати ћелијске сигналне путеве (122).

**Лабораторијске студије са животињама:** Најконзистентније су студије понашања, које показују да кретање лабораторијских пацова у пољу од око 4 Т и јачем може довести до аверзивног понашања и условног избегавања (123, 124, 125). Савременији радови додатно потврђују да су ови ефекти повезани са активацијом вестибуларног

система и магнето-хидродинамичким утицајем на ендолимфу у полукружним каналима (126). Међутим, у пољу од 2 Т и ниже, мало је убедљивих доказа о ефектима на учење или условно, односно безуслово понашање, што је потврђено и новијим експерименталним моделима (127). У контексту ових налаза, експерименталне студије указују да изложеност сталном магнетном пољу јачине до 2 Т не доводи до значајних промена у електричној екситабилности нервног ткива, иако суптилни ефекти на неуронску сигнализацију не могу бити у потпуности искључени (128, 129). Један од јасно утврђених ефеката сталног магнетног поља јачег од 0,1 Т на животиње је индукција потенцијала у крвотоку срца и других већих крвних судова (130, 131). Ово је такође показано и код људи, али без доказаних нежељених ефеката таквог дејства (видети испод). Присуство овако индукованог напона је потврђено и у новијим експерименталним моделима са продуженом експозицијом, без значајних функционалних последица по миокард (132). Међутим, значај ових ефеката на здравље је остао нејасан. Обимна мерења код паса и мајмуна изложених пољу до 1,5 Т нису показала промене у протоку крви, крвном притиску или кардиоваскуларној динамици, што је потврђено и у каснијим студијама са напреднијим методама мерења (131). Експозиција од неколико часова пољу од 8 Т није имала ефекта на кардиоваскуларну функцију код свиња (133). Неколико других студија на пацовима изложених пољима од неколико мТ до 10 Т показало је мање промене у кардиоваскуларним параметрима, као што су крвни притисак или проток, али без јасног клиничког значаја (110, 134, 135). Међутим, закључци ових студија су прилично лабилни и осетљиви на евентуално садејство других фактора као што је анестезија, тако да се чврсти закључци не могу донети без независних поновљених истраживања. Експозиција сталном пољу до 1 Т није показала ефекте на фетални раст и постнатални развој код миша (136, 137). Друге студије нису показале ефекат на фетални развој миша током кратке експозиције (2–7 дана) у периоду органогенезе, са пољима јачине 4,7 Т, односно 6,3 Т (138, 139). Постоји ограничен број новијих студија о могућем генотоксичном и карциногеном ефекту сталног магнетног поља код лабораторијских животиња (140, 141). Међутим, и даље недостају дуготрајне студије које би пратиле карциногенезу, тако да није могуће донети коначне закључке о дугорочним ефектима на здравље. Неколико других студија о ефектима на хематопоезу, ендокрини систем или састав крви такође није показало убедљиве доказе значајних биолошких ефеката (89).

**Испитивање ефеката статичког магнетног поља код људи:** Опширне студије у којима су испитивани разни физиолошки параметри, као што су телесна температура (сублингвална), фреквенца дисања, пулс, крвни притисак и сатурација кисеоника, нису показале значајне ефекте експозиције сталном магнетном пољу до 8 Т (142). Међутим, примећено је да индуковани потенцијали у близини срца доводе до дисторзије ЕКГ сигнала, нарочито при јачим пољима, што може отежати њихову интерпретацију, иако срчана функција остаје непромењена. Једини параметар који показује конзистентну, мада благу промену је повећање систолног крвног притиска, које се објашњава магнетно-хидродинамичким ефектом и остаје у границама физиолошке варијабилности (89). Моделска истраживања указују да би клинички

значајне промене протока крви могле настати тек при екстремно високим пољима ( $>15$  Т). Нема убедљивих доказа о значајном утицају на друге кардиоваскуларне параметре код људи. Показано је да експозиција добровољаца магнетном пољу до 8 Т не доводи до промене телесне температуре (142, 143). Ови налази су потврђени и у новијим студијама са ултра-високим пољима ( $\sim 9,4$  Т), где није уочен значајан утицај на срчану фреквенцију, крвни притисак или терморегулацију (144). Неуробихејвиоралне студије нису показале значајне промене у когнитивним функцијама, укључујући краткотрајну и радну меморију, говор и време реакције (98, 132, 145). Међутим, студије са покретањем главе у јачим магнетним пољима ( $\approx 7$  Т) указују на пролазне поремећаје координације око-рука и визуелног праћења, што је повезано са активацијом окуло-вестибуларног рефлекса (146–149). Јачина ових ефеката зависи од брзине кретања кроз магнетно поље, односно промене магнетног флуksа. Неколико студија показало је да изложеност пољима  $>2-3$  Т може изазвати пролазне сензације као што су вертиго, мучнина, метални укус или фосфени, нарочито при покретима главе или очију (97, 99, 144, 147). Учесталост и интензитет ових симптома могу се значајно смањити контролом кретања испитаника (98). Савремена истраживања указују да је основа ових ефеката магнетна стимулација вестибуларног апарата, вероватно путем утицаја на ендолимфу и отолитне структуре (150).

У закључку, досадашњи експериментални и клинички подаци не указују на постојање озбиљних штетних ефеката излагања сталном магнетном пољу јачине до 8 Т. Ипак, могу се јавити пролазне субјективне сензације, као што су вертиго, мучнина или фосфени, као и привремено смањење способности извођења појединих неуробихејвиоралних задатака, нарочито током покрета главе или тела у магнетном пољу.

**Епидемиолошке студије:** Мало је доступних епидемиолошких студија које се баве изложеношћу сталном магнетном пољу, а већина је спроведена на радницима изложеним умереној снази поља до неколико десетина mT, као што су радници у топионицама алуминијума, погонима за производњу хлоралкалних супстанци или као вариоци. Међутим, овакви радници су често истовремено изложени другим потенцијално штетним хемијским супстанцама или физичким факторима, што може утицати на добијене резултате. Поред тога, индустријска стална магнетна поља се производе у не тако прецизним уређајима, чиме су присутни и електромагнетни таласи екстремно ниске фреквенције, па је процена експозиције магнетном пољу неконзистентна. У неким студијама учесничка база је била веома мала, што додатно ограничава валидност закључака (88).

## ***2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА***

Подаци у литератури који се односе на континуирано дејство сталног магнетног поља умереног интензитета на имунски систем су релативно ограничени, док су подаци о потенцијалним ефектима различитих полова таквог поља веома оскудни. Према доступним сазнањима, до сада постоји мали број *in vitro* студија које се баве дејством сталног магнетног поља на имуне ћелије, док су истраживања усмерена на Т лимфоците активирание посредством дендритских ћелија недовољно заступљена.

Полазећи од наведеног, у овом раду постављене су следеће претпоставке:

1. Стално магнетно поље умереног интензитета може утицати на пролиферацију хуманих Т лимфоцита и продукцију цитокина *in vitro*, у културама које се састоје од пречишћених хуманих Т лимфоцита и дендритских ћелија добијених из моноцита, као физиолошки релевантном моделу активације Т лимфоцита.
2. Наведени ефекти могу зависити од оријентације (пола) магнетног поља којем су ћелије изложене.
3. Ефекти магнетног поља могу зависити од типа имунолошке стимулације, односно природе активационог сигнала, при чему се разлике очекују између поликлонске, митогеном посредоване стимулације моноклеарних ћелија периферне крви и алогене, дендритским ћелијама посредоване активације Т лимфоцита.
4. Израженији ефекти магнетног поља очекују се у условима дендритским ћелијама посредоване активације Т лимфоцита, док у условима поликлонске стимулације митогеном промене у продукцији цитокина могу бити ограничене или одсутне.

За проверу наведених хипотеза, циљ овог истраживања био је да се испитају ефекти дуготрајне изложености сталним магнетним пољима умерене јачине (1 mT и 56 mT) различитих оријентација на:

1. пролиферацију и вијабилност хуманих Т лимфоцита у ко-култури са дендритским ћелијама добијеним из моноцита, као моделу дендритским ћелијама посредоване активације;
2. продукцију цитокина у културама хуманих Т лимфоцита и дендритских ћелија, укључујући Th1, Th2 и Th17 профил, као и одабране проинфламаторне цитокине, у циљу процене функционалне активације и поларизације Т лимфоцита;
3. пролиферацију и продукцију проинфламаторних цитокина моноклеарних ћелија периферне крви стимулираних митогеном, ради поређења са поликлонским моделом стимулације и процене зависности ефеката од типа имунске стимулације.

### ***3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ***

Студија је изведена као део пројекта „Функционални аспекти модулације имуногених и толерогених својстава дендритских ћелија“, одобреног од стране Етичког одбора Војномедицинске академије, Београд, Србија (број пројекта: МФВМА/10/12-14, датум одобрења Етичког одбора: 18. април 2013. године), којом је руководио проф. др. Саша Василијић.

Студија је одобрена и од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Београду, Србија (број одлуке: 29/IV-1), од 25. 04. 2016. године.

### 3.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

У циљу испитивања ефеката сталног магнетног поља (СМП) на пролиферацију, вијабилност, активацију и поларизацију Т лимфоцита, експериментални дизајн обухватао је три типа ћелијских култура:

- (1) кокултуре Т ћелија стимулираних са незрелим ДЋ
- (2) кокултуре Т ћелија стимулираних са зрелим ДЋ
- (3) културе моноклеарних ћелија периферне крви (МНЋ) стимулираних фитохемаглутинином (РНА)

Кокултуре са дендритским ћелијама представљају модел антиген-специфичне, и физиолошки посредоване активације Т лимфоцита, која обухвата специфичне ТCR клонове. Насупрот томе, РНА-индукована активација представља директну, снажну поликлоналну стимулацију Т лимфоцита, независну од презентације антигена.

Кокултуре Т ћелија и ДЋ су биле изложене СМП-у различите јачине — 1 mT (*слабо СМП, cСМП*) и 56 mT (*јако СМП, jСМП*) — као и различите оријентације (нагоре оријентисано, *СМП-горе*; надолу оријентисано, *СМП-доле*).

На тај начин дефинисани су следећи експериментални услови:

1. контролне незреле ДЋ/Т културе, без излагања СМП-у
2. контролне зреле ДЋ/Т културе, без излагања СМП-у
3. незреле ДЋ/Т културе изложене нагоре оријентисаном 1 mT СМП-у (*cСМП-горе, незреле ДЋ/Т*)
4. незреле ДЋ/Т културе изложене надолу оријентисаном 1 mT СМП-у (*cСМП-доле, незреле ДЋ/Т*)
5. зреле ДЋ/Т културе изложене нагоре оријентисаном 1 mT СМП-у (*cСМП-горе, зреле ДЋ/Т*)
6. зреле ДЋ/Т културе изложене надолу оријентисаном 1 mT СМП-у (*cСМП-доле, зреле ДЋ/Т*)
7. незреле ДЋ/Т културе изложене нагоре оријентисаном 56 mT СМП-у (*jСМП-горе, незреле ДЋ/Т*)

8. незреле ДЋ/Т културе изложене надоле оријентисаном 56 mT СМП-у (jСМП-доле, незреле ДЋ/Т)
9. зреле ДЋ/Т културе изложене нагоре оријентисаном 56 mT СМП-у (jСМП-горе, зреле ДЋ/Т)
10. зреле ДЋ/Т културе изложене надоле оријентисаном 56 mT СМП-у (jСМП-доле, зреле ДЋ/Т)

Културе МНЋ стимулисане са РНА су такође биле изложене СМП-у јачине 1 mT (сСМП) и 56 mT (jСМП), како нагоре оријентисаном (СМП-горе), тако и надоле оријентисаном (СМП-доле), уз одговарајуће контролне културе (control МНЋ/РНА) без излагања.

Овако дефинисан дизајн омогућио је процену ефеката СМП-а на:

- (i) пролиферацију и вијабилност Т лимфоцита,
- (ii) њихову активацију и функционалну поларизацију (Th1, Th2 и Th17 профил), као и
- (iii) продукцију проинфламаторних цитокина, у различитим моделима активације имунског одговора.

## 3.2. РЕАГЕНСИ

### 3.2.1. Медијуми и раствори

За изолацију мононуклеарних ћелија (МНЋ) из хумане периферне крви коришћен је RPMI 1640 медијум (ICN-Flow, USA или ICN, Costa Mesa, CA, USA) уз додатак 0,02% Na-EDTA (Апотека ВМА).

За култивацију ћелија коришћен је комплетан медијум који се састојао од RPMI 1640 медијума (ICN-Flow, USA), коме је додаван фетални телећи серум (FCS; ICN-Flow, USA), инактивисан топлотом током 30 минута на 56°C, у концентрацији од 10%, као и 2-меркаптоетанол (2-ME). Комплетан медијум је такође садржао 1% L-глутамина, 50 IU/mL пеницилина и 50 µg/mL стрептомицина и био је пуферован помоћу 7,5% NaHCO<sub>3</sub> (Апотека ВМА).

Компоненте RPMI 1640 медијума укључивале су редестиловану воду (Апотека ВМА), L-глутамин (200 mmol/L; Serva), 7,5% натријум-бикарбонат (Апотека ВМА), гарамидин (40 mg/mL; ICN) и 1N хлороводоничну киселину (Зорка, Шабац) за подешавање pH медијума.

Фосфатом пуферован физиолошки раствор (PBS; *phosphate-buffered saline*) припреман је у дејонизованој води по следећој рецептури: 14 mL 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Serva, Немачка), 36 mL 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Serva, Немачка), 50 mL 16% NaCl (Зорка, Шабац) и 900 mL дестиловане воде.

За припрему ћелија за проточну цитофлуориметрију коришћени су модификовани PBS пуфери: PBS1 (PBS + 0,01%  $\text{NaN}_3$ ) и PBS2 (PBS + 0,01%  $\text{NaN}_3$  + 2% FCS).

Пуфер за магнетно сортирање припреман је додавањем 2 mM EDTA и 0,5% говеђег серум-албумина (BSA; Sigma-Aldrich, Немачка) у PBS.

K-PBS пуфер, коришћен за испирање у ELISA тестовима, састојао се од 137 mM NaCl (Зорка), 2,7 mM KCl (Serva), 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Serva) и 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Serva), са подешеним pH на 7,2–7,4.

### 3.2.2. Цитокини

Рекомбинантни хумани GM-CSF (rh GM-CSF; Leucomax, Sandoz-Schering Plough, Швајцарска), специфичне активности  $4,44 \times 10^6$  IU, растваран је под стерилним условима у дестилованој води и RPMI 1640 медијуму и чуван у концентрацији од 100  $\mu\text{g/mL}$  на  $-20^\circ\text{C}$  до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 100 ng/mL.

Рекомбинантни хумани IL-4 (rh IL-4; Roche Diagnostics GmbH, Немачка) растваран је под стерилним условима у RPMI 1640 медијуму са 1% FCS и чуван у концентрацији од 2  $\mu\text{g/mL}$  на  $-20^\circ\text{C}$  до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 5 ng/mL.

### 3.2.3. Стимулатори сазревања дендритских ћелија и пролиферације лимфоцита

Poly(I:C) (Sigma-Aldrich, Немачка) растворен је у RPMI 1640 медијуму до концентрације од 10  $\text{mg/mL}$  и чуван на  $-20^\circ\text{C}$  до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацији од 10  $\mu\text{g/mL}$ .

7-thia-8-oxoguanosine (immunosine; Sigma-Aldrich, Немачка) растворен је у PBS до концентрације од 20 mM. Раствор је складиштен у малим аликвотима на  $-20^\circ\text{C}$  до употребе. У експериментима је коришћена концентрација од 250 nM.

Фитохемаглутинин (PHA-M) (Sigma-Aldrich, Germany) растворен је у стерилном PBS-у до концентрације од 1 mg/mL и чуван у аликвотима на  $-20^{\circ}\text{C}$  до употребе. Радни раствори су припремани свежим разблажењем у комплетном RPMI 1640 медијуму непосредно пре употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 30  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.2.4. Остале супстанце

2-меркаптоетанол (2-ME; Fluka, Немачка) разблаживан је у комплетном медијуму до концентрације  $5 \times 10^{-2}$  M и чуван на  $+4^{\circ}\text{C}$ , заштићен од светлости. У културама је коришћен у финалној концентрацији од  $5 \times 10^{-5}$  M.

Трицијумом обележени тимидин ( $[^3\text{H}]$ -тимидин; Amersham International, Велика Британија), специфичне активности 5  $\mu\text{Ci/mM}$ , коришћен је у тестовима пролиферације у концентрацији од 1  $\mu\text{Ci}$  по бунару плоче са 96 места.

Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Норвешка), комерцијални градијент густине 1,077 g/mL, коришћен је за изолацију МНТ из хумане периферне крви.

## 3.3. ИЗОЛАЦИЈА И КУЛТИВАЦИЈА ЋЕЛИЈА

### 3.3.1. Мононуклеарне ћелије

Мононуклеарне ћелије су изоловане из „buffy coat“-а здравих добровољних давалаца крви добијених на Институту за трансфузиологију ВМА. Buffy coat је одмах по добијању разблажен RPMI 1640 медијумом са 0,02% Na-EDTA у односу 1:4. Разблажена суспензија (9 mL) нанета је на 3 mL Lymphoprep-а и центрифугирана 20 минута на 1200 обртаја на собној температури.

Након центрифугирања уклоњен је горњи слој плазме, а МНТ из интерфазног прстена пажљиво су сакупљене. Ћелије су затим испране три пута (800 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ): два пута у RPMI 1640 са 0,02% Na-EDTA и трећи пут у RPMI 1640 са 2% FCS. Након испирања, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму.

### 3.3.2. Дендритске ћелије

Од укупних МНЋ, моноцити су изоловани методом адхеренције за пластику. У сваки бунар плоче са 6 места (Flow, Шкотска) распоређено је по  $10 \times 10^6$  ћелија ресуспендованих у 2 mL комплетног медијума. Ћелије су инкубиране 1 сат на  $37^\circ\text{C}$  у атмосфери са 5%  $\text{CO}_2$ , чиме је омогућена адхеренција моноцита за површину пластике.

Након инкубације, бунари су испрани топлим медијумом ( $37^\circ\text{C}$ ) у циљу уклањања неадхерентних ћелија, које су представљале лимфоцитну фракцију МНЋ. Адхерентни моноцити су затим култивисани у комплетном медијуму у запремини од 2 mL по бунару, уз додатак рекомбинантног хуманог GM-CSF (100 ng/mL) и IL-4 (5 ng/mL), током 6 дана на  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ .

После 3 дана култивације, додат је свеж медијум са одговарајућим концентрацијама цитокина, како би се обезбедили оптимални услови за диференцијацију моноцита у дендритске ћелије. После 6 дана култивације, добијена је популација незрих моноцитно-деривисаних дендритских ћелија (МоДЋ), које су карактерисане губитком адхерентности и променама у морфологији.

За индукцију сазревања, незреле МоДЋ су након шестодневне култивације покупљене као неадхерентна популација и распоређене у нове плоче са свежим медијумом. У зависности од експерименталног услова, ћелијама су додати цитокини сами или у комбинацији са стимулаторима- агонистима TLR (TLR-3: Poly(I:C) и TLR-7: 7-thia-8-oxoguanosine). Ћелије су затим култивисане додатна 2 дана, након чега су сакупљене и коришћене у функционалним тестовима. Култивацијом у присуству GM-CSF и IL-4 добијена је популација незрих МоДЋ (незреле ДЋ), док је накнадном стимулацијом добијена популација зрих МоДЋ (зреле ДЋ), способних да индукују снажну активацију Т лимфоцита.

### 3.3.3. Т лимфоцити

За постављање културе мешане леукоцитне реакције, као и за утврђивање Th цитокинског профила, коришћене су  $\text{CD4}^+$  Т ћелије које су добијене као негативна фракција из МНЋ применом технике имуно-магнетног сортирања.

Из алогених МНЋ, добијених претходно описаним поступком, издвојено је  $1 \times 10^8$  ћелија, након чега је изведена процедура изолације  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцита коришћењем комерцијалног кита ( $\text{CD4}^+$  T Cell Isolation Kit II, MACS, Miltenyi Biotec, Немачка), у складу са упутством произвођача.

Укратко,  $10^7$  МНТ је ресуспендовано у 80  $\mu\text{L}$  пуфера за сортирање, након чега је додато 20  $\mu\text{L}$  коктеља хаптен-антитела. При изолацији  $\text{CD4}^+$  Т ћелија, коктел је садржао антитела усмерена против маркера не- $\text{CD4}^+$  ћелија, укључујући CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 и CD56. Мешавина МНТ и коктеља антитела инкубирана је 10 минута на температури од 6–12°C.

Након инкубације, ћелије су опране 2–3 пута у пуферу за сортирање, а затим је  $10^7$  ћелија поново ресуспендовано у 80  $\mu\text{L}$  истог пуфера. У овако припремљену суспензију додато је 20  $\mu\text{L}$  анти-хаптен микрочестица, односно колоидних намагнетисаних микрочестица коњугованих са моноклонским анти-хаптен антителима.

После инкубације у трајању од 15 минута на хладном, ћелије су поново опране 2–3 пута у пуферу за сортирање и ресуспендоване у 500  $\mu\text{L}$  истог пуфера. Тако припремљена ћелијска суспензија пропуштена је кроз сепарациону колону постављену у магнетно поље (MidiMACS магнет), при чему су задржане ћелије обележене микрочестицама, док је елуат, односно негативна фракција, сакупљен и садржао обогаћену популацију  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцита.

Чистоћа изолованих  $\text{CD4}^+$  Т ћелија била је већа од 95%, што је потврђено проточном цитофлуориметријом коришћењем анти-CD3 и анти-CD4 моноклонских антитела.

### 3.3.4. Алогена активација Т-лимфоцита

Активација Т лимфоцита алогеног порекла испитивана је применом теста мешане леукоцитне реакције, у којем су незреле и стимулисане МоДТ коришћене као стимулаторске ћелије, док су  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцити од алогеног даваоца коришћени као респондерске ћелије.

У плоче са 96 бунара и „U“-дном (Sarstedt, Немачка) додавани су стимулатори у виду МоДТ, постављени као триплекати серијских двоструко опадајућих разблажења у распону од  $1 \times 10^4$  до  $0,125 \times 10^4$  ћелија по бунару. У сваки бунар додат је константан број  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцита ( $1 \times 10^5$  ћелија), у укупној запремини од 200  $\mu\text{L}$  комплетног медијума.

Ћелије су култивисане 6 дана у термостату на 37°C у атмосфери са 5%  $\text{CO}_2$ . Осамнаест сати пре завршетка култивације, у сваки бунар додат је радиоактивно обележени [ $^3\text{H}$ ]-тимидин (Amersham International, UK) у концентрацији од 1  $\mu\text{Ci}$  по бунару, како би се омогућило мерење пролиферације Т ћелија.

Након истека културе, ћелије су сакупљене аутоматским скидачем културе (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, USA), а инкорпорација [ $^3\text{H}$ ]-тимидина измерена је сцинтилационим  $\beta$ -бројачем (LKB-1219 Rackbeta, Финска). Резултати су изражени

као број откуцаја у минути (енгл. *counts per minute*, cpm), што представља индиректну меру пролиферације Т лимфоцита.

### 3.3.5. Поликлонска активација моноклеарних ћелија

Дејство статичког магнетног поља (СМП) на пролиферацију моноклеарних ћелија (МНЋ) испитивано је култивисањем МНЋ ( $2-3 \times 10^5$  ћелија/200  $\mu\text{L}$ ) у присуству фитохемаглутинаина (РНА; Sigma-Aldrich, Germany) у финалној концентрацији од 30  $\mu\text{g/mL}$ , у плочама са 96 бунара, током 72 часа. Шеснаест сати пре истека култивације, ћелијама је додат [ $^3\text{H}$ ]-тимидин, након чега је инкорпорација радиоактивности измерена на  $\beta$ -сцинтилационом бројачу како је напред описано.

## 3.4. ПРОДУКЦИЈА ЦИТОКИНА

Концентрација цитокина одређивана је у супернатантима култура алогених  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцита и МоДЋ, као и МНЋ.

У културама са МоДЋ, у плоче са 96 бунара и „U“-дном (Sarstedt, Немачка) додато је по  $1 \times 10^4$  незрелих или зрелих МоДЋ. У исте бунаре додати су  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцити у броју од  $1 \times 10^5$  ћелија по бунару, у укупној запремини од 200  $\mu\text{L}$  комплетног медијума. Након петодневне инкубације, у сваки бунар додати су форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА; Sigma-Aldrich, Немачка) у концентрацији од 20  $\text{ng/mL}$  и јономицин (Sigma-Aldrich, Немачка) у концентрацији од 500  $\text{ng/mL}$ , чиме је омогућена максимална стимулација продукције цитокина. Ћелије су инкубиране још 24 часа, након чега су супернатанти сакупљени и коришћени за даљу анализу.

У културама са МНЋ, ћелије су стимулисане са РНА 72 сата. Након култивације, супернатанти ћелијских култура су сакупљени из бунара плоче са 96 места и чувани на  $-20^\circ\text{C}$  до даље анализе.

Испитивања су изведена на ћелијама укупно шест несродних, здравих добровољних давалаца крви, при чему су све ћелијске културе постављане у трипликатима.

Концентрације цитокина у супернатантима ћелијских култура (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-17) одређиване су коришћењем комерцијалних ELISA китова (DuoSet® ELISA Development Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), као и методом заснованом на имунофлуоресцентним куглицама и проточној цитофлуориметрији (Human Th1/Th2 11-plex

FlowCytomix™ Ready-to-Use Kit; eBioscience/Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria), према упутству произвођача.

### 3.4.1. Одређивање цитокина методом ELISA

Микротитар плоче високе везивне способности обложене су одговарајућим *capture* антителом и инкубиране преко ноћи на 4°C. Након инкубације, плоче су опране (PBS + 0,05% Tween-20) и блокиране одговарајућим блокирајућим раствором (нпр. 1% BSA у PBS) током 1–2 сата на собној температури, како би се спречило неспецифично везивање.

Након блокирања, узорци и серијски разблажени стандарди додавани су у дупликатима у одговарајуће јажице и инкубирани током 2 сата на собној температури. Након прања, додавано је биотиниловано детекционо антитело специфично за циљани цитокин и инкубирано током 2 сата. Након следећег циклуса прања, додат је стрептавидин–horseradish peroxidase (HRP) коњугат и инкубиран током 20 минута у мраку.

За развој сигнала коришћен је супстрат тетраметилбензидин (TMB), који након ензиматске реакције развија колориметријски сигнал пропорционалан концентрацији анализата. Реакција је заустављена додатком стоп раствора (нпр. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), а оптичка густина (OD) мерена је на таласној дужини од 450 nm, уз референтно читавање на 540 или 570 nm, коришћењем микроплочног читача.

Стандардне криве су генерисане коришћењем серијских разблажења познатих концентрација рекомбинантних цитокина, а концентрације у узорцима израчунате су интерполацијом из стандардне криве, применом нелинеарне регресије (четворопараметарски логистички модел, 4-PL). Све вредности су кориговане за бланк и изражене у pg/mL.

### 3.4.2. Одређивање цитокина методом проточне цитофлуориметрије (FlowCytomix)

За потребе мултиплекс анализе, 25 µL узорка или серијски разблаженог стандарда инкубирано је са 25 µL суспензије флуоресцентних микрочестица обложених моноклонским антителима специфичним за појединачне цитокине, уз додатак 25 µL биотинилованих детекционих антитела. Инкубација је спровођена током 2 сата на собној температури. Након инкубације, микрочестице су опране два пута ради уклањања невезаних компоненти, а затим инкубиране са 50 µL стрептавидин–фикоеритрина (PE) током 1 сата, чиме је омогућена флуоресцентна детекција везаног анализата.

Аквизиција података вршена је на проточном цитометру EPICS-XL MCL flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Инструмент је калибрисан помоћу стандардних калибрационих микрочестица, док су FSC и SSC параметри оптимизовани за идентификацију микрочестица и елиминацију детритуса и агрегата. Интерна флуоресценција микрочестица детектована је у каналу FL4 (675 nm) и коришћена за класификацију популација, док је интензитет PE флуоресценције (FL2, 575 nm) коришћен за квантификацију концентрације анализата. За сваки узорак анализирано је најмање 3.000 догађаја по популацији микрочестица специфичној за дати анализат.

FlowCytomix™ систем заснива се на присуству две основне популације микрочестица различите величине, означених као кластер А (микрочестице пречника 5  $\mu\text{m}$ ) и кластер В (микрочестице пречника 4  $\mu\text{m}$ ). Ове популације су иницијално раздвојене на основу FSC/SSC карактеристика и флуоресцентног сигнала, чиме је омогућена јасна дискриминација од детритуса и неспецифичних догађаја.

Унутар сваке од наведених популација, појединачне подпопулације микрочестица разликују се на основу интензитета интерне флуоресцентне боје детектоване у far-red спектру (FL4 канал), што омогућава симултану идентификацију више анализата у једном узорку. Идентификација сваког анализата заснива се на хијерархијској анализи која обухвата:

1. одређивање припадности кластеру микрочестица (А или В), и
2. раздвајање специфичне флуоресцентне подпопулације унутар тог кластера.

У софтверу FlowCytomix™ Pro, ове популације се приказују у одвојеним приказима („Fluorescence cluster A“ и „Fluorescence cluster B“), при чему су појединачне подпопулације раздвојене аутоматски дефинисаним границама („gates“), уз могућност њихове ручне корекције. Квантификација концентрације цитокина заснива се на медијани интензитета PE флуоресценције за сваку подпопулацију микрочестица.

Добијени проточно-цитометријски подаци (FCS фајлови) даље су анализирани у софтверу FlowCytomix™ Pro (верзија 2.1, Bender MedSystems, Austria), који омогућава интеграцију информација о идентитету микрочестица и интензитету флуоресценције у квантитативну процену концентрације анализата. Софтвер аутоматски идентификује кластере А и В, раздваја њихове подпопулације и генерише стандардне криве за сваки појединачни анализат.

Стандардне криве су генерисане коришћењем 8-тачкастог серијског разблажења у опсегу од 27,44 до 20.000 pg/mL, а апроксимација криве вршена је методом нелинеарне регресије, уз могућност примене алтернативних модела интерполације („point-to-point“) ради побољшања тачности у појединим сегментима криве.

Контрола квалитета укључивала је примену уграђених функција софтвера, као што су „back-calculation“ стандардних концентрација и процена одступања (bias) за сваку тачку стандардне криве. Дефинисан је праг прихватљивог

одступања (cut-off), при чему су вредности које прелазе задати праг аутоматски означене као непоуздане. Посебна пажња посвећена је сегментима стандардне криве са малим нагибом, који могу довести до повећане несигурности у процени концентрације.

У циљу оптимизације апроксимације криве, екстремне вредности стандарда су по потреби искључиване из анализе. У даљу обраду укључени су само резултати који се налазе унутар валидираног динамичког опсега и изван региона означених као непоуздани. Доња граница детекције износила је између 0,8 и 20 pg/mL, у зависности од анализе.

### 3.5. ТЕСТОВИ ВИЈАБИЛНОСТИ

Вијабилност Т лимфоцита испитивана је након дуготрајне култивације у условима изложености статичким магнетним пољима јачине 56 mT различитих оријентација, у циљу процене потенцијалних ефеката ових физичких фактора на преживљавање ћелија и индукцију ћелијске смрти.

Т ћелије су култивисане у плочама са 96 бунара округлог дна (Sarstedt, Germany), у комплетном RPMI 1640 медијуму, у густини од  $3 \times 10^5$  ћелија по бунару, током 6 дана. Овај временски интервал је изабран тако да одговара условима у којима су ћелије биле изложене дендритским ћелијама у експериментима за одређивање продукције цитокина, чиме је омогућено директно поређење функционалних параметара и вијабилности ћелија.

По завршетку култивације, ћелије су сакупљене благим пипетирањем, пребачене у епрувете за анализу и центрифугиране ради уклањања супернатанта (300–400×g, 5 min). Добијени ћелијски талог је ресуспендован у одговарајућим пуферима за бојење пропидијум-јодидом (PI; Sigma-Aldrich, Germany), у зависности од типа анализе.

За процену апоптозе, ћелије су бојене PI у финалној концентрацији од 50 µg/mL у хипотоничном раствору који је садржао 0,1% натријум-цитрат и 0,1% Triton X-100. Овај поступак доводи до пермеабилizације ћелијске мембране и омогућава PI да се веже за ДНК. Услед фрагментације ДНК, карактеристичне за апоптозу, долази до смањења укупног садржаја ДНК, што се детектује као појава суб-G1 (хиподиплоидне) популације при анализи проточном цитофлуориметријом. Апоптотичне ћелије су дефинисане као ћелије са смањеним PI сигналом у односу на диплоидну популацију.

За процену некрозе, ћелије су бојене PI у финалној концентрацији од 50 µg/mL у PBS-у (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), без присуства детергента. У овим условима PI улази искључиво у ћелије са оштећеном ћелијском мембраном, што представља карактеристику некротичних ћелија. PI-позитивне ћелије су, стога, сматране некротичним.

Након додавања PI, ћелије су инкубиране 5–10 минута у мраку на собној температури, након чега су узорци одмах анализирани методом проточне цитофлуориметрије.

Анализа је изведена на проточном цитофлуориметру EPICS-XL MCL flow cytometer (Beckman Coulter, USA). За сваки узорак прикупљено је најмање 10.000 догађаја (енгл. *events*) у популацији интереса. Ћелије су иницијално дефинисане на основу параметара forward scatter (FSC) и side scatter (SSC), ради искључивања ћелијског детритуса и агрегата.

Даљом анализом PI сигнала омогућено је раздвајање популација живих (PI-негативних), апоптотичних (суб-G1) и некротичних (PI-позитивних) ћелија. Анализа података изведена је коришћењем одговарајућег софтвера за проточну цитометрију (Beckman Coulter).

Резултати су изражени као проценат апоптотичних и некротичних ћелија у односу на укупан број анализираних ћелија, док су PI-негативне ћелије сматране вијабилним. Укупна вијабилност ћелијске популације дефинисана је као удео PI-негативних ћелија.

Сви експерименти су извођени у најмање три независна понављања, при чему су сва мерења извођена у техничким дупликатима или трипликатима.

### 3.6. МАГНЕТНО ПОЉЕ

#### 3.6.1. Извор сталног магнетног поља

Два извора СМП, са различитим јачинама поља (1 mT и 56 mT) коришћена су за проучавање ефекта континуираног излагања СМП-у. Сваки од два извора магнетног поља био је постављен на два начина; у првом распореду ћелијске културе су били постављене у нагоре оријентисано СМП, а у другом распореду ћелијске културе су биле у надоле оријентисаном СМП-у. Излагање је било континуирано и започето је на почетку култивације моноцита. Контрола није била изложена СМП-у. Пошто је експеримент изведен на Северној хемисфери, геомагнетно поље је углавном усмерено наниже. Интензитет геомагнетног поља износио је приближно 48 микротесла ( $\mu\text{T}$ ).

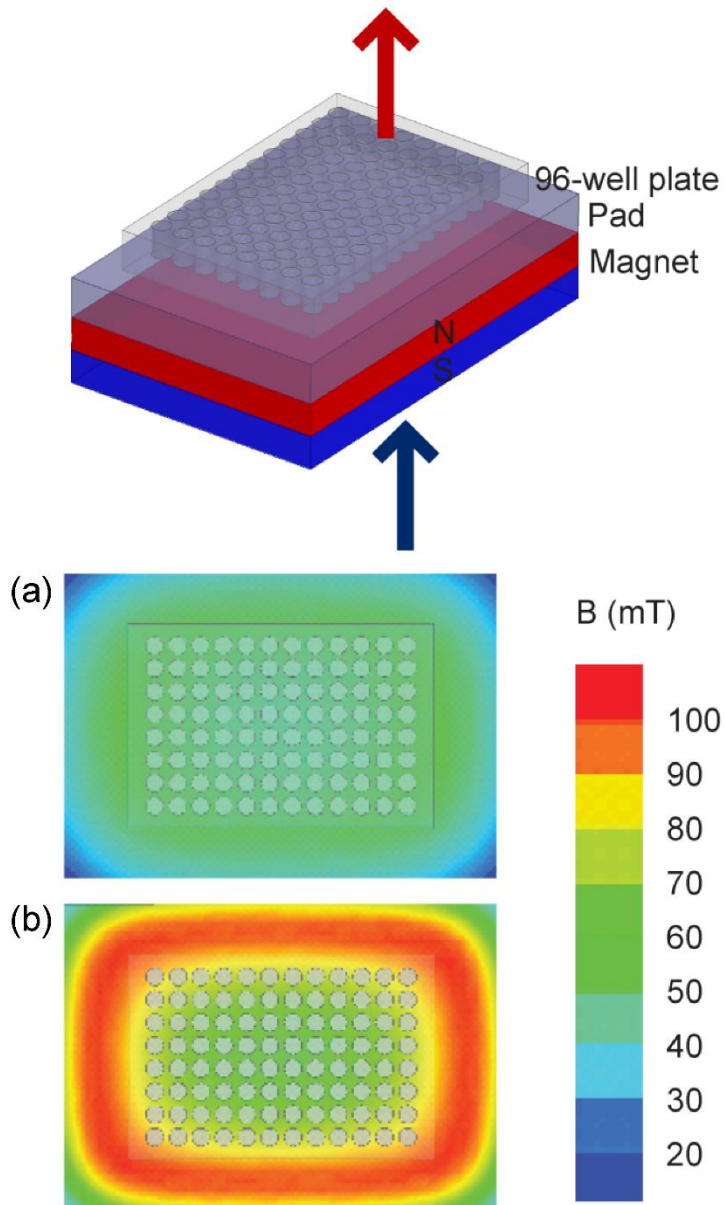
Коришћена су два стална нехомогена магнетна поља, једно које потиче од једног великог трајног магнета (феритни блок магнет B150-100-25FA, GAUS Group, Пожаревац, Србија), а друго од низа од двадесет малих трајних магнета (МАДУ трака, Институт Михајло Пупин, Београд, Србија; патент број YU 48907/02, Завод за интелектуалну својину Републике Србије, Београд, Србија; патент број WO 99/60581, Светска организација за интелектуалну својину, Брисел, Белгија, ЕУ). Траке од гумене основе у коју су уграђени ситни стални магнети, су дизајниране тако да обезбеде преносиво, једноставно за употребу магнетно поље, које може продирати дубље у ткиво када се постави на површину човека или животиње.

Као резултат коришћења ових магнета, обезбеђује се да вредности оба поља флукутирају унутар експерименталног волумена, без промене током времена. Резултујуће магнетно поље овако дизајнираних магнетних плоћа је веома хомогено на одређеном окомитом растојању од њих, у хоризонталној равни која је паралелна плочама. Постављањем пластичних плоча одговарајуће дебљине, између ћелијских култура и самих магнетних плоча, омогућено је да ћелијске културе буду на одређеној удаленост од површине магнета, где је магнетно поље најхомогеније. Тачна вредност магнетног поља је измерена коришћењем тесламетра резолуције 0.005 mT (Digital Teslameter DTM-151, Group 3 Technology, Auckland, New Zealand).

Експериментални распоред за велики магнетни блок је изгледао овако - плоча са 96 места (ћелијске културе), подупрта пластичним подметачем дебљине 1,5 cm (да би се добио ефекат да ћелије буду у најхомогенијем делу магнетног поља), постављена је изнад трајног магнета величине 10 cm  $\times$  15 cm  $\times$  2,5 cm. Плоча са 96 места има димензије 8 cm  $\times$  12 cm  $\times$  1,5 cm. Код експеримент групе „горе“, горњи пол магнета је северни пол; сходно томе, доњи пол је јужни пол. У експерименталном распореду групе „доле“, трајни магнет је окренут тако да је горњи пол био јужни, а доњи пол северни (Слика 1).

Експериментални распоред за магнетну плочу је изгледао овако - плоча са 96 места са пластичним подметачем дебљине 4 cm постављена је на матрицу од 4  $\times$  5 трајних магнета, од којих је сваки величине 24 mm  $\times$  5 mm  $\times$  5 mm. Магнети су уграђени у еластичну пластику. Плоча са 96 места је величине 8 cm  $\times$  12 cm  $\times$  1,5 cm. Код експеримент групе „горе“, односно горњи полови магнетних елемената су

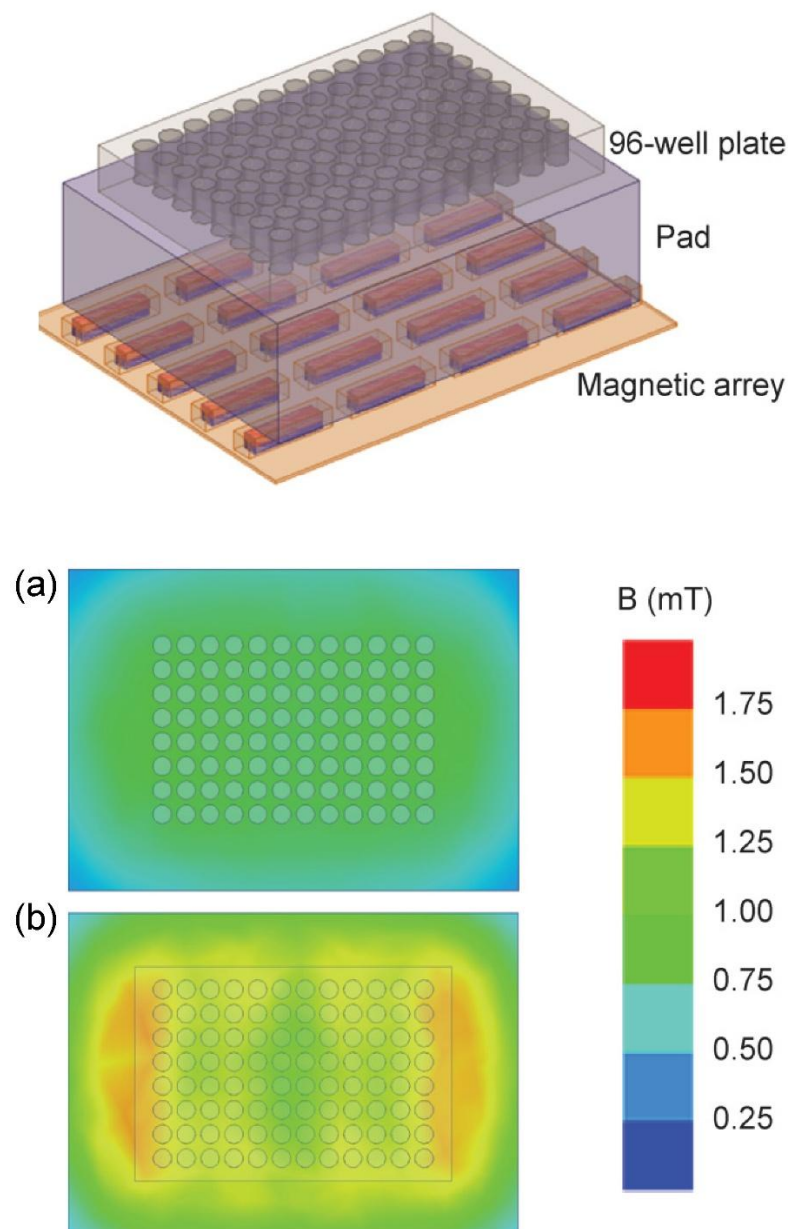
северни полови. Просечна вредност јачине магнетног флуksа у експерименталном волумену износи 1,0 mT (Слика 2).



**Слика 1. Перманентни магнетни блок**

Експериментална поставка приказана је у горњем делу слике. Плоча са 96 јамица (96-well plate), постављена на пластични подметач (pad) дебљине 1,5 cm, налази се изнад перманентног магнета димензија 10 cm × 15 cm × 2,5 cm. На слици је приказана поставка експеримента групе “горе”, односно горњи пол магнета је северни пол и означен је црвеном бојом; сходно томе, доњи пол је јужни пол и означен је плавом бојом. У поставци експеримента групе “доле”, перманентни магнет је обрнут тако да је горњи пол био јужни, а доњи северни пол. Треба напоменути да је магнетно поље увек усмерено

ка јужном полу, а од северног пола. Плоча са 96 јамица има димензије 8 cm × 12 cm × 1,5 cm. У доњем делу слике приказан је интензитет магнетног поља. Интензитет магнетног поља на горњој и доњој површини плоче са 96 јамица приказан је на панелима (a) и (b), респективно. Интензитет магнетног флукса у експерименталном волумену, односно унутар плоче са 96 јамица, варира између минималне и максималне вредности од 40,7 и 97,4 mT, док је његова средња вредност 56,0 mT.



**Слика 2. Перманентна магнетна плоча**

Експериментална поставка приказана је у горњем делу слике. Плоча са 96 јамица (96-well plate), са пластичним подметачем (pad) дебљине 4 cm, постављена је на низ 4 × 5 перманентних магнета, од којих сваки има димензије 24 mm × 5 mm × 5 mm. Магнети су уграђени у еластичну пластику. На слици је приказана поставка експеримента групе

“горе”, односно горњи полови магнетних елемената су северни полови и означени су црвеном бојом. Плоча са 96 јамица има димензије  $8\text{ cm} \times 12\text{ cm} \times 1,5\text{ cm}$ . У доњем делу слике приказан је интензитет магнетног поља. Магнетно поље на горњој и доњој површини плоче са 96 јамица приказано је на панелима (a) и (b), респективно. Минимална, максимална и средња вредност интензитета магнетног флукса у експерименталном волумену износе 0,6, 1,5 mT и 1,0 mT, респективно.

### 3.7. СТАТИСТИЧКЕ АНАЛИЗЕ

Једномерна ANOVA и Kruskal–Wallis тест, праћени Dunn-овим тестом вишеструких поређења, као и двосмерна ANOVA, праћена Bonferroni-јевим тестом вишеструких поређења и t-тестом (параметријским), изведени су коришћењем софтвера GraphPad Prism (верзија 10.0.0 за Windows, GraphPad Software, Boston, MA, USA). Све p-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним. За статистичку анализу резултата између контролних и третираних група коришћен је Студентов t-тест. Концентрација цитокина у супернатантима МоДТ контролних и третираних поређене су применом анализе варијансе (ANOVA). Разлика је сматрана статистички значајном када је  $p < 0,05$ .

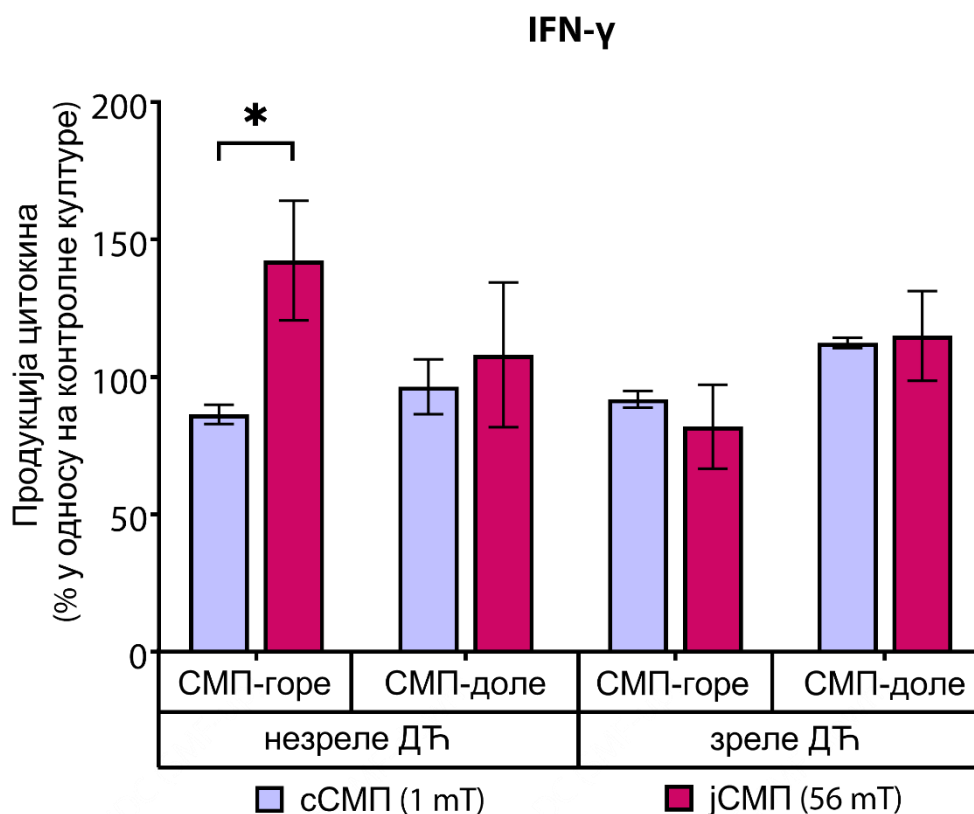
## ***4. РЕЗУЛТАТИ***

#### 4.1. ЕФЕКАТ СТАЛНОГ МАГНЕТНОГ ПОЉА НА ХУМАНЕ CD4<sup>+</sup> Т ЛИМФОЦИТЕ

У циљу процене ефеката СМП на функционалну активацију Т лимфоцита у условима ДЋ-посредоване стимулације, анализирани су резултати добијени у ко-културама Т ћелија са незрелим и зрелим ДЋ. Овај модел омогућава испитивање антиген-неспецифичне, али физиолошки релевантне активације Т лимфоцита, која обухвата више ТЋР клонова и укључује костимулаторне сигнале и цитокинско окружење. Ефекти СМП-а испитивани су у зависности од јачине (1 mT — cСМП и 56 mT — jСМП) и оријентације поља (СМП-горе и СМП-доле), при чему су анализирани параметри продукције цитокина, пролиферације, и вијабилности, као показатељи степена активације и функционалне поларизације Т лимфоцита.

##### 4.1.1. Продукција цитокина

Ефекти СМП на продукцију цитокина Т ћелија индуковану од стране ДЋ, варирали су између тестираних цитокина, у зависности од јачине СМП и стадијума активације ДЋ (незреле/зреле ДЋ). Т ћелије стимулисане од стране незрелих ДЋ у присуству нагоре оријентисаног СМП јачине 56 mT производеле су више нивое IFN- $\gamma$ , који су били повећани за 42,35% у поређењу са контролним, неизложеним ћелијама. Са друге стране, излагање ових ћелија СМП-у од 1 mT исте оријентације праћено је нижом продукцијом IFN- $\gamma$ , која је била смањена за 13,62% у односу на контролне ћелије. Поређење вредности промена, изражених као однос нивоа цитокина између изложених и неизложених ћелија, показало је да је повећање IFN- $\gamma$  било значајно веће када су ћелије биле изложене нагоре оријентисаном СМП од 56 mT у односу на 1 mT ( $p < 0.5$ ). Међутим, значајни ефекти на продукцију IFN- $\gamma$  нису показани када су ћелије биле изложене надолу оријентисаним СМП различитих јачина, нити када су Т ћелије биле стимулисане зрелим ДЋ (Графикон 1).

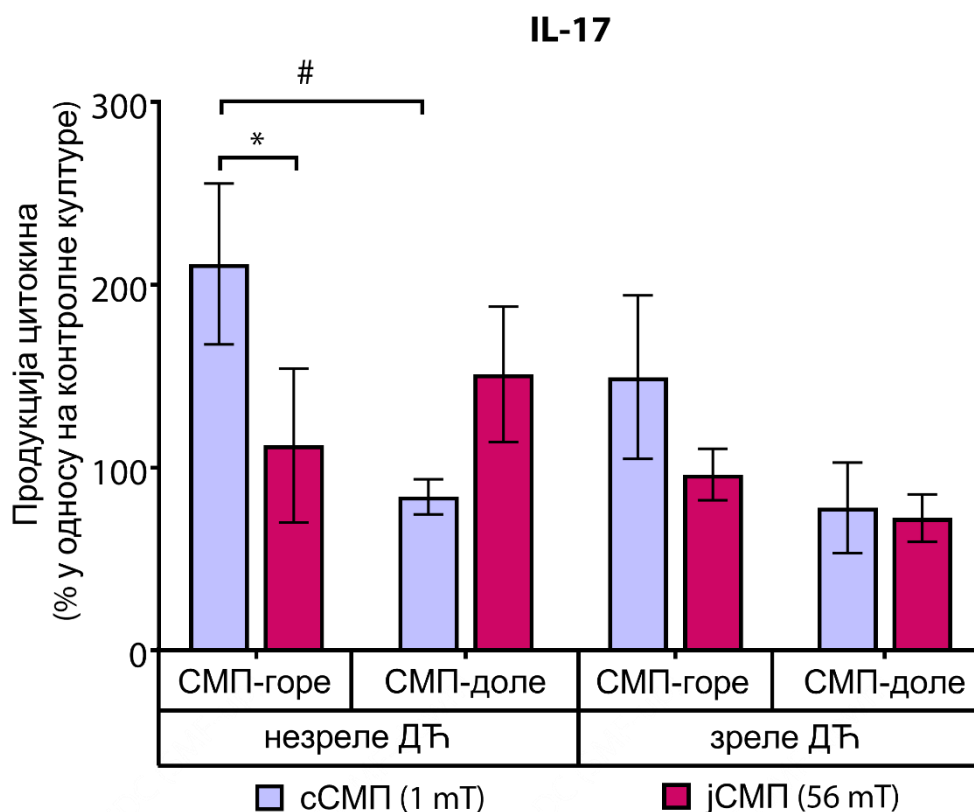


**Графикон 1. Продукција цитокина IFN- $\gamma$**

Продукција IFN- $\gamma$  од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија, стимулираних ДТ у културама које су биле континуирано изложене СМП-у од 1 mT или 56 mT. Резултати су изражени као проценат продукције цитокина у контролним културама, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента; \* $p < 0,05$ .

ДТ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП.

Супротно томе, нивои IL-17 су били повећани за 111,37% у поређењу са контролном културом ћелија када су Т ћелије и незреле ДТ биле изложене нагоре оријентисаном слабијем СМП-у (1 mT). Пораст продукције IL-17 био је значајно већи када су ћелије биле изложене СМП-у од 1 mT и у односу на 56 mT ( $p < 0,05$ ). Занимљиво је да је супротан, али не и значајан ефекат уочен када су Т ћелије и незреле ДТ биле изложене надоле оријентисаном СМП-у. Поређење вредности промене IL-17 код ћелија изложених нагоре и надоле оријентисаним СМП-овима од 1 mT показало је значајан супротан ефекат различито оријентисаних СМП-ова ( $p < 0,05$ ) (Графикон 2).



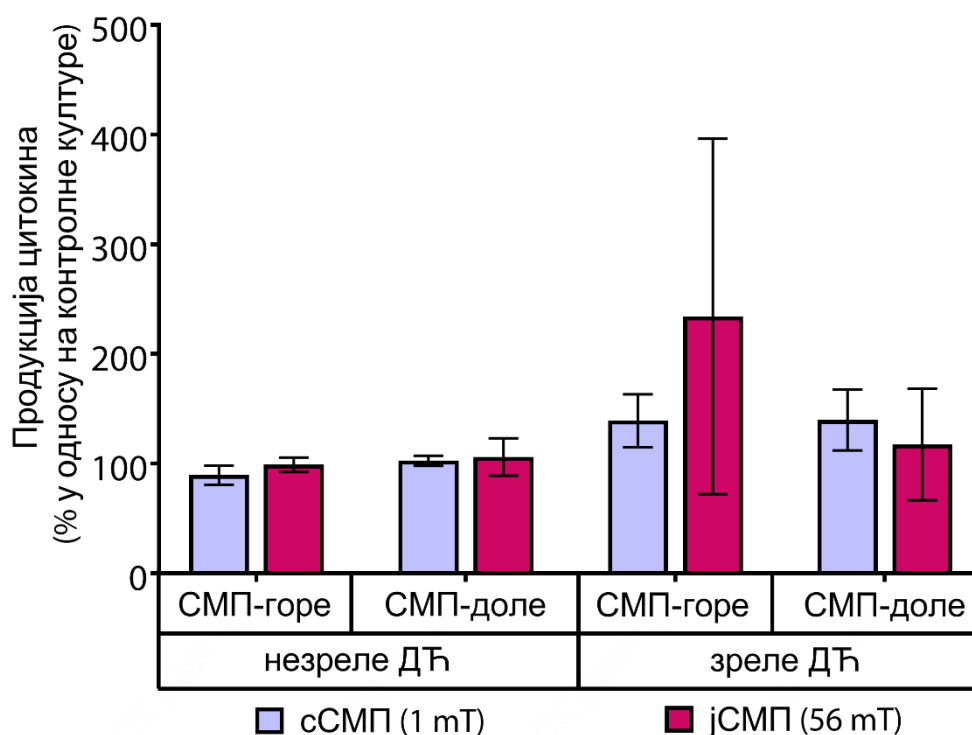
**Графикон 2. Продукција цитокина IL-17**

Ослобађање IL-17 од стране CD4+ Т ћелија стимулираних ДТ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента; \*  $p < 0,05$ , незреле ДТ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим ДТ (56 mT СМП-горе); #  $p < 0,05$ , незреле ДТ (1 mT СМП-доле) у поређењу са незрелим ДТ (1 mT СМП-горе).

ДТ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП.

Продукција IL-5 није била значајно измењена ни у једном од тестираних услова (Графикон 3).

## IL-5

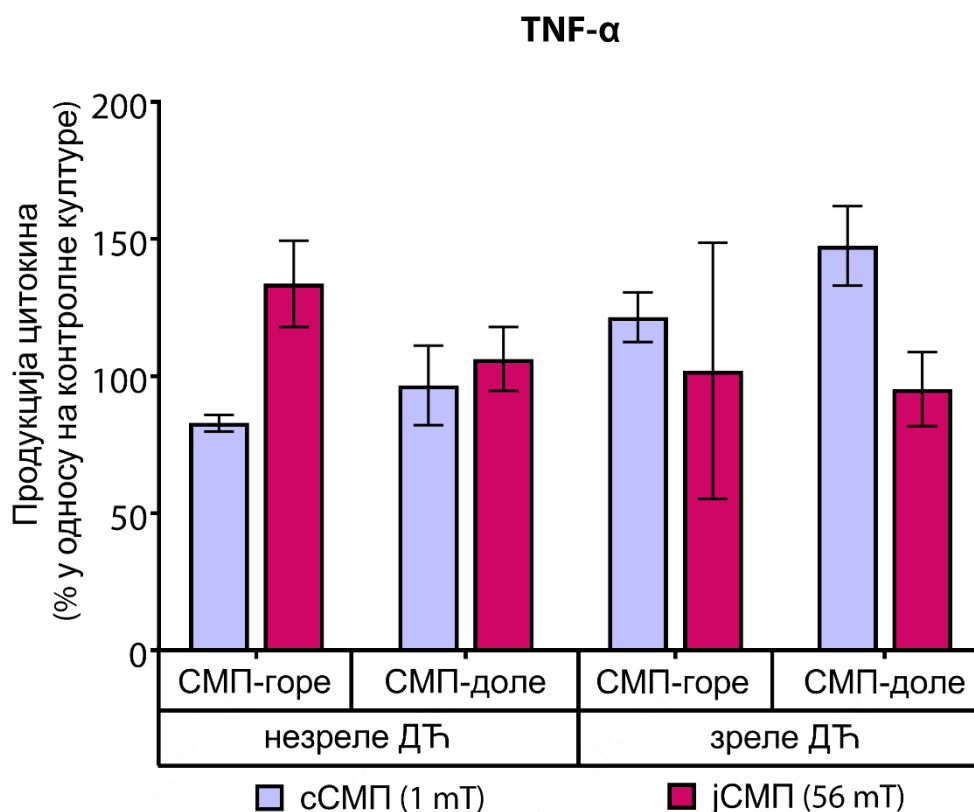


Графикон 3. Производња цитокина IL-5

Ослобађање IL-5 од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних Дћ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат производње цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента;  $p < 0,05$ , незреле Дћ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим Дћ (56 mT СМП-горе).

Дћ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП.

Анализа проинфламаторних цитокина показала је да су Т ћелије стимулиране са незрелим Дћ и изложене нагоре оријентисаном 56 mT СМП-у производеле повишене нивое TNF- $\alpha$  (повећање од 21,53%) у односу на ћелије изложене 1 mT СМП-у исте оријентације (смањење од 17,15%). Занимљиво је да је супротан тренд уочен када су Т ћелије биле стимулиране са зрелим Дћ и изложене надоле оријентисаном СМП-у. Нивои TNF- $\alpha$  били су повећани за 47,50% у поређењу са неекспонираним контролним ћелијама када су оне биле изложене 1 mT СМП-у. Истовремено, вредности су остале непромењене или благо смањене након излагања 56 mT. Уочена разлика у вредностима промене TNF- $\alpha$  забележена за 1 mT и 56 mT приближила се критеријуму за значајност ( $p = 0,075$ ) (Графикон 4).

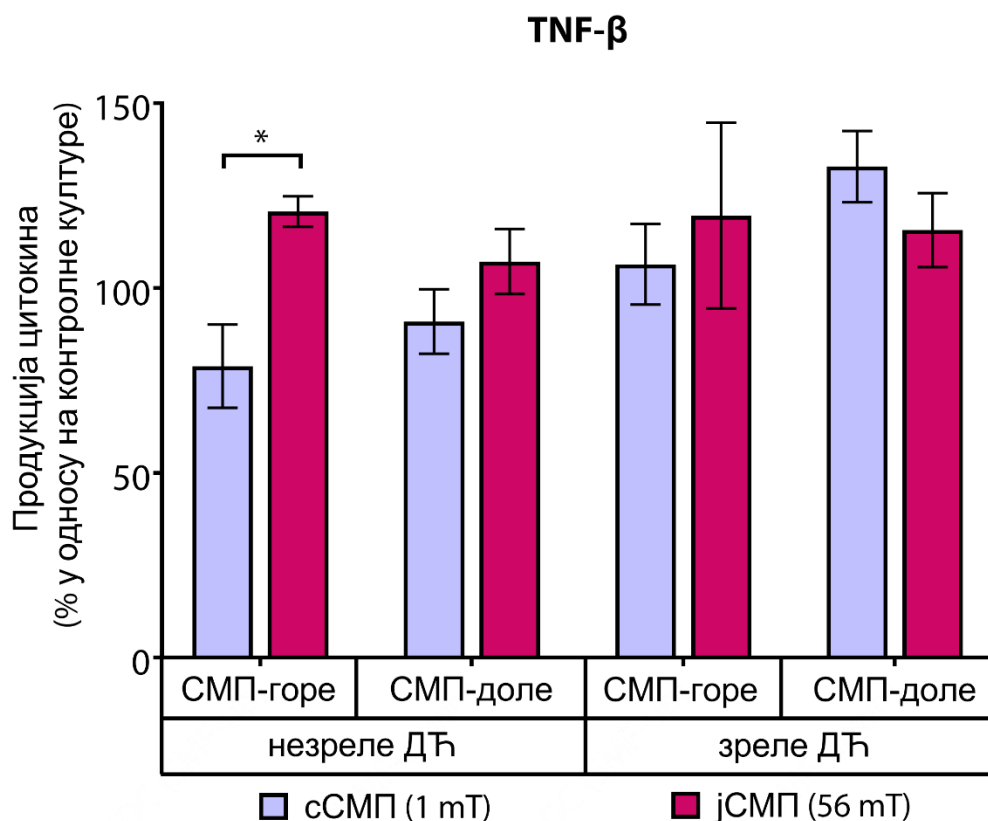


**Графикон 4. Продукција цитокина TNF- $\alpha$**

Ослобађање TNF- $\alpha$  од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних ДТ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за n = 3 независна експеримента.

ДТ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП.

Продукција TNF- $\beta$  је била повишена у културама Т ћелија и незрелих ДТ, изложених нагоре оријентисаном 56 mT СМП-у (повећање од 20,69%), док је била смањена када су ћелије биле изложене нагоре оријентисаном 1 mT СМП-у (смањење од 21,13%). Уочене разлике у релативним вредностима које одражавају секрецију TNF- $\beta$  биле су значајне ( $p < 0,05$ ) (Графикон 5).

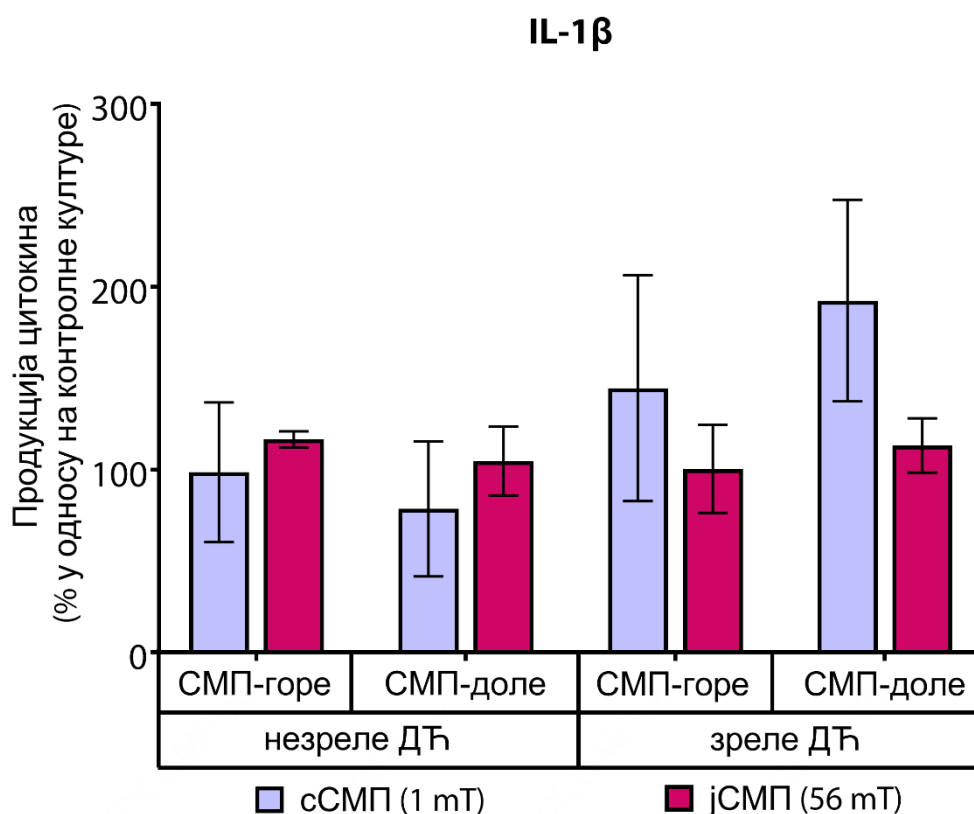


**Графикон 5. Продукција цитокина TNF- $\beta$**

Ослобађање TNF- $\beta$  од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних ДТ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента;  $p < 0,05$ , незреле ДТ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим ДТ (56 mT СМП-горе).

ДТ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП.

За друге тестиране цитокине, укључујући IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и антиинфламаторни цитокин IL-10, није утврђена статистичка значајност у поређењу са ћелијама које нису биле изложене (Графикони: 6-9).

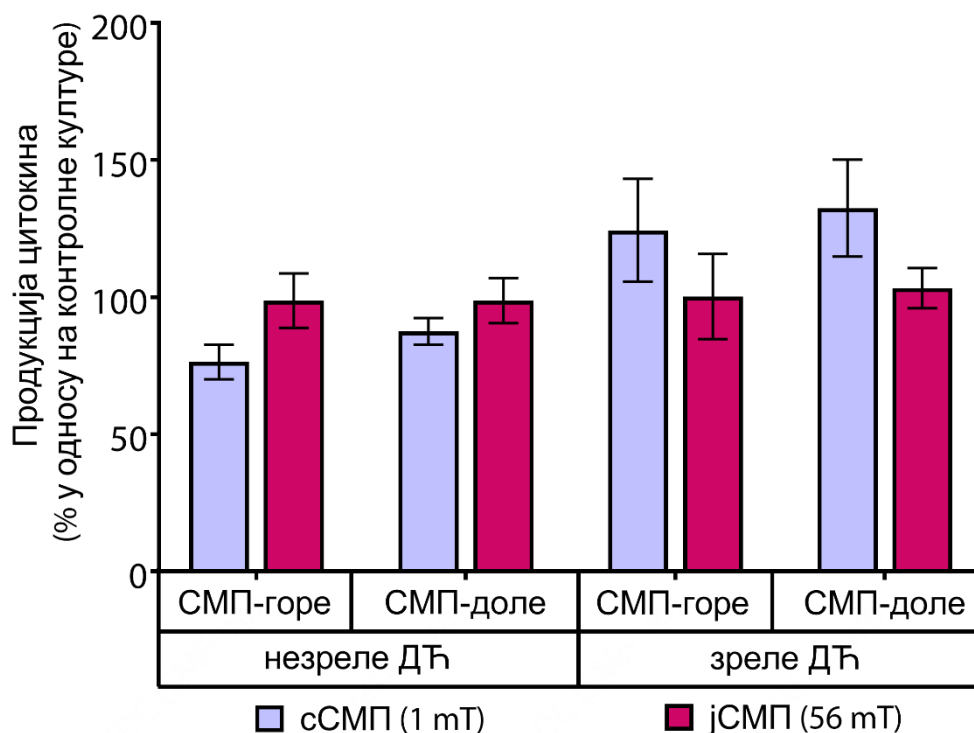


**Графикон 6. Продукција цитокина IL-1 $\beta$**

Ослобађање IL-1 $\beta$  од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних Дћ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за n = 3 независна експеримента; p < 0,05, незреле Дћ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим Дћ (56 mT СМП-горе).

Дћ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП.

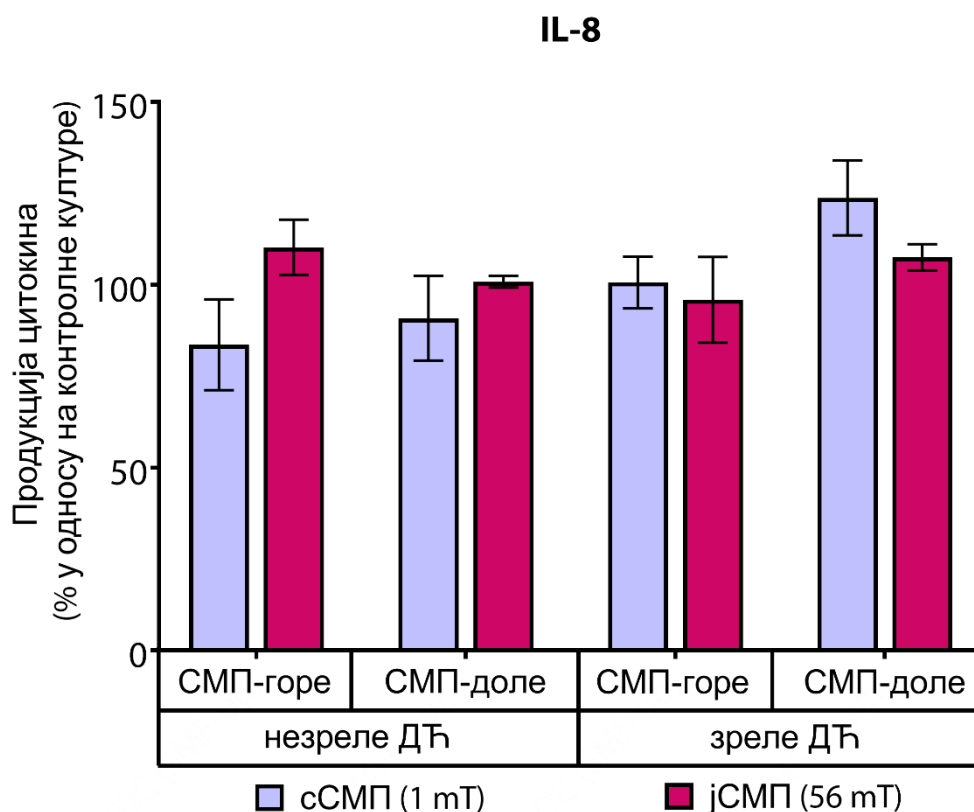
## IL-6



Графикон 7. Производња цитокина IL-6

Ослобађање IL-6 од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних Дћ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат производње цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента;  $p < 0,05$ , незреле Дћ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим Дћ (56 mT СМП-горе).

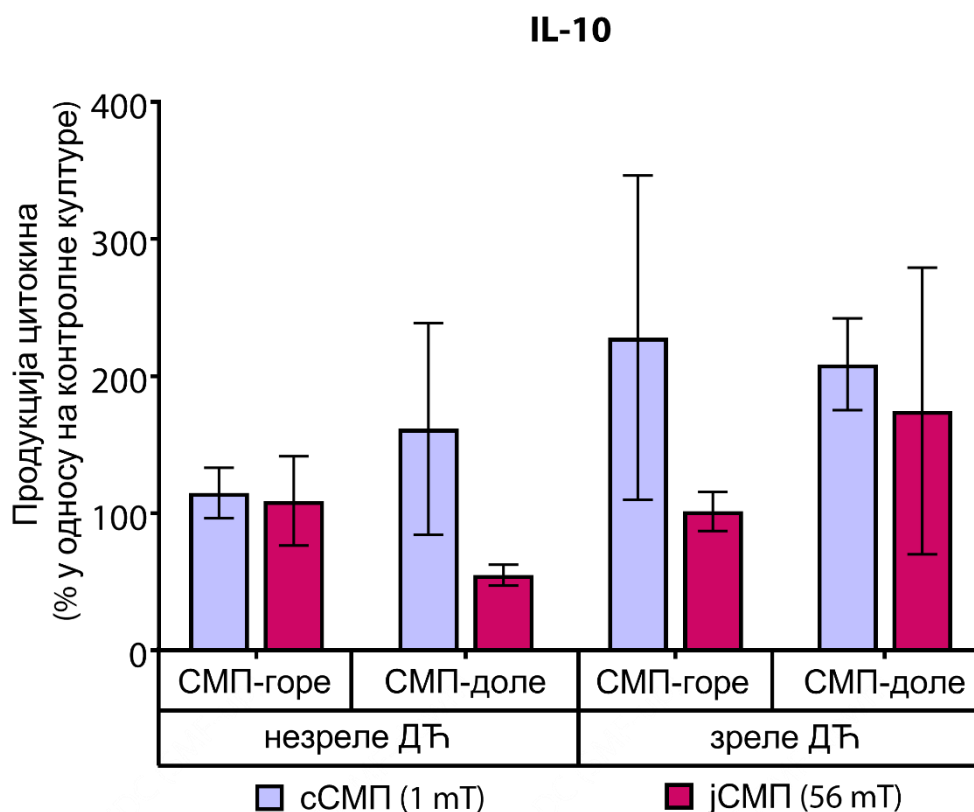
Дћ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП.



**Графикон 8. Производња цитокина IL-8**

Ослобађање IL-8 од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних Дћ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат производње цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента;  $p < 0,05$ , незреле Дћ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим Дћ (56 mT СМП-горе).

Дћ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП.



**Графикон 9. Производња цитокина IL-10**

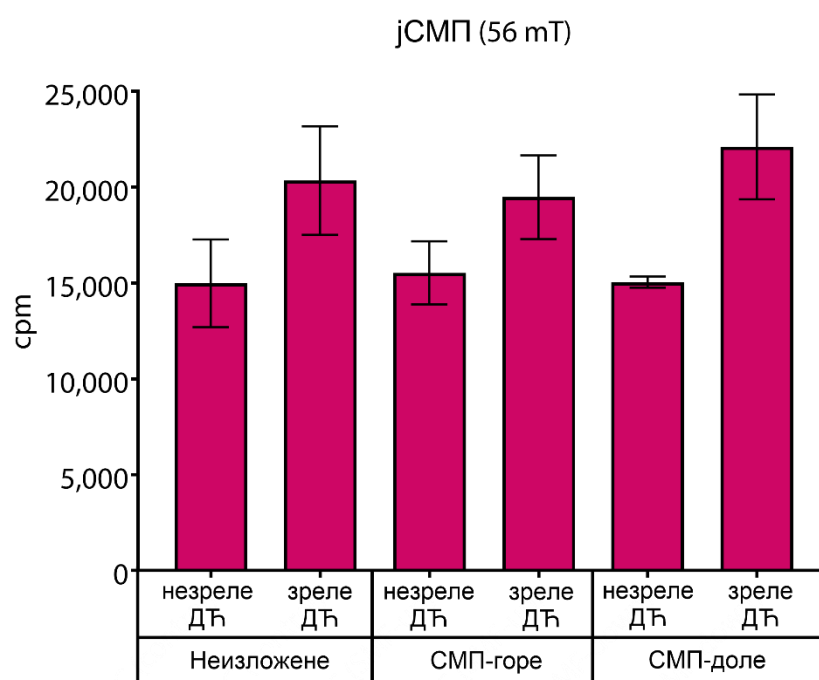
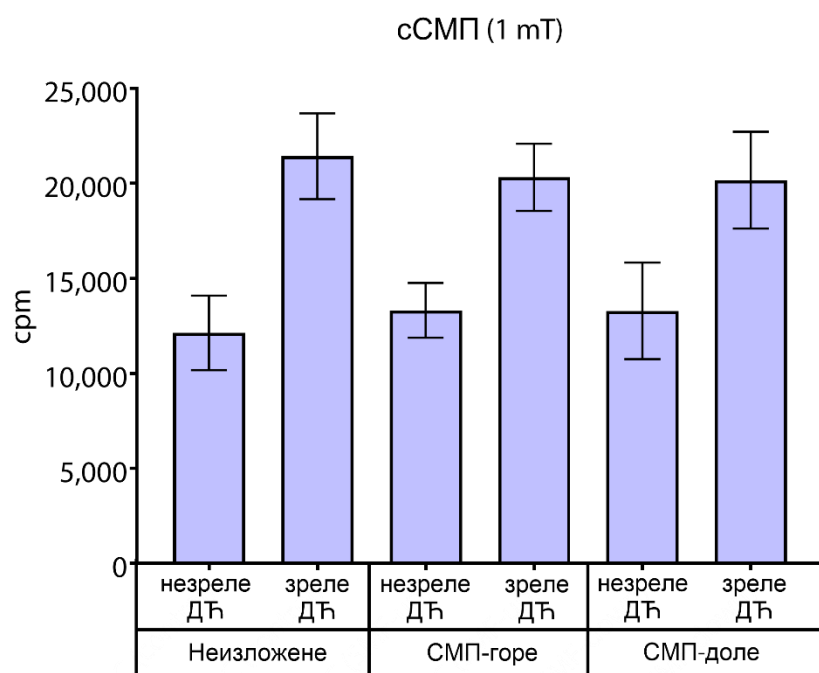
Ослобађање IL-10 од стране CD4<sup>+</sup> Т ћелија стимулираних Дћ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат производње цитокина контролних култура, а линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности за  $n = 3$  независна експеримента;  $p < 0,05$ , незреле Дћ (1 mT СМП-горе) у поређењу са незрелим Дћ (56 mT СМП-горе).

Дћ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП.

#### 4.1.2. Пролиферација и вијабилност ћелија

Да би се додатно проценило да ли уочене разлике у нивоу цитокина могу бити повезане са различитим степеном активације и виталношћу стимулираних Т ћелија, квантитативно је одређена пролиферација и анализирана смрт Т ћелија.

Пролиферација ћелија је анализирана у алогеној мешовитој лимфоцитној реакцији, одвојено за ћелије које су биле изложене 1 mT и 56 mT CMF-у. Као што се очекивало, добијени резултати су показали већу пролиферативну реакцију када су Т ћелије биле стимулисане са зрелим ДТ. Међутим, није било значајних промена у пролиферацији стимулираних ћелија без обзира на јачину и оријентацију СМП-а коме су биле изложене, што указује да степен активације Т ћелија није био погођен тестирањем СМП-ом (Графикон 10).

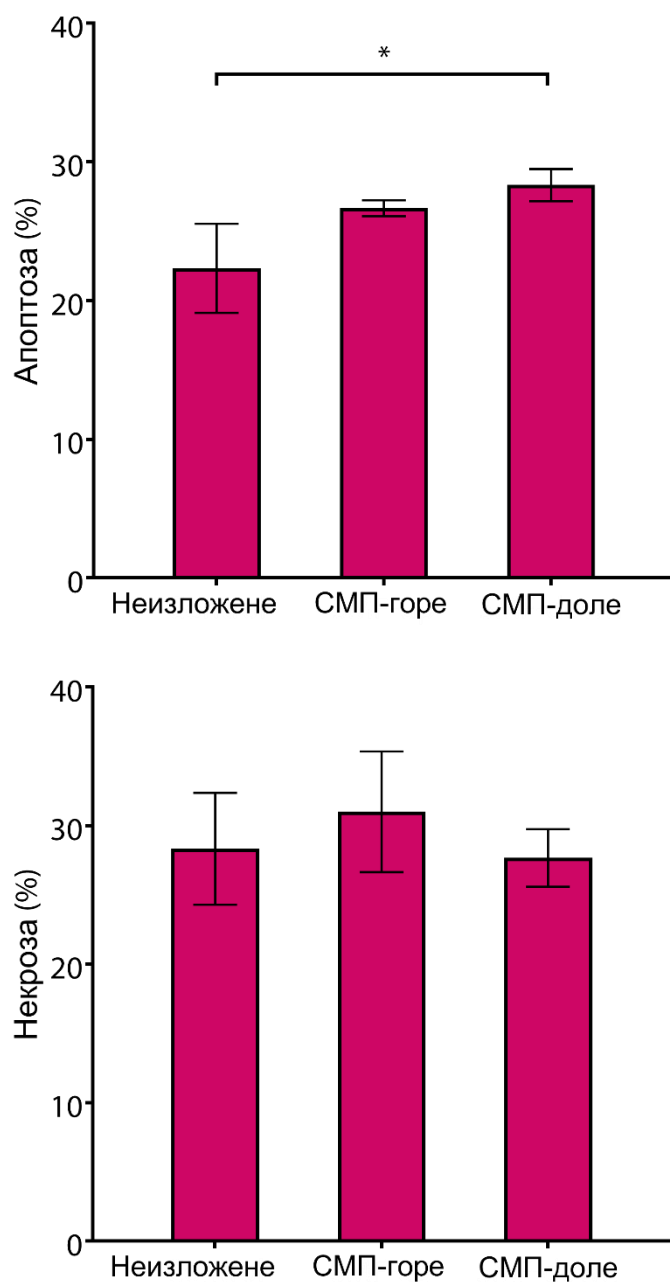


### Графикон 10. Пролиферација Т лимфоцита

Пролиферација Т ћелија стимулираних од стране ДТ у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су изражени као број откуцаја у минути (срп), а линије на стубићима представљају стандардне девијације средњих вредности за  $n = 3$  независна експеримента.

ДЋ: дендритске ћелије, СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

Ћелијска смрт је анализирана применом проточне цитометрије, квантитативним одређивањем броја ћелија са хиподиплоидним једрима и ћелија са оштећеним ћелијским мембранама, које представљају апоптотске и некротичне ћелије, респективно. После 6 дана изложености Т ћелија 56 mT СМП-у различитих оријентација, број апоптотских и некротичних ћелија је износио око или испод 30% укупних ћелија, што указује на одсуство цитотоксичног ефекта СМП-а. Благо, али статистички значајно повећање је уочено само између контролних ћелија и ћелија изложених наниже оријентисаном СМП-у, где је забележен већи број апоптотских ћелија у културама изложеним СМП-у (контрола према наниже оријентисани СМП:  $22.33 \pm 3.21$  према  $28.33 \pm 1.15$ ;  $p < 0.05$ ). Међутим, анализа некротичних ћелија није показала разлике у вијабилности Т ћелија између тестираних услова (Графикон 11).



**Графикон 11. Вијабилност Т лимфоцита**

Вијабилност Т ћелија континуирано изложених 56 mT СМП-у. Резултати су приказани као проценат апоптотских и некротичних ћелија, а линије на стубићима представљају стандардне девијације средњих вредности за  $n = 3$  независна експеримента.  $p < 0.05$ , у поређењу са контролним ћелијама.

СМП: стално магнетно поље, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

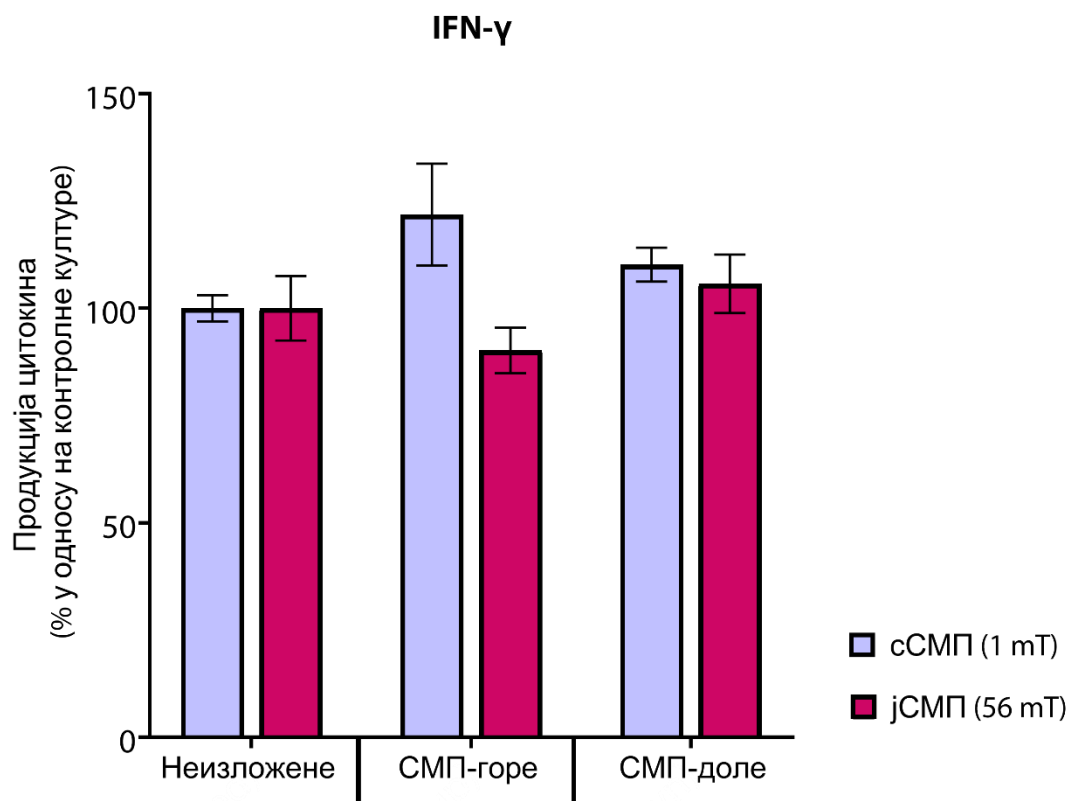
## 4.2. ЕФЕКАТ СТАЛНОГ МАГНЕТНОГ ПОЉА НА МОНОНУКЛЕАРНЕ ЋЕЛИЈЕ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ

У циљу процене директног ефекта сталног магнетног поља (СМП) на поликлонално активирани Т лимфоците, анализирани су резултати добијени у културама мононуклеарних ћелија периферне крви (МНЋ) стимулираних фитохемаглутинином (РНА). За разлику од кокултура са дендритским ћелијама, овај модел представља снажну, директну поликлоналну стимулацију Т лимфоцита, независну од презентације антигена. Културе су биле изложене СМП-у различите јачине (1 mT — сСМП и 56 mT — јСМП) и оријентације (СМП-горе и СМП-доле), а ефекти су процењивани анализом пролиферације, вијабилности и продукције цитокина, са циљем да се утврди да ли СМП делује директно на Т лимфоците у условима максималне активације.

### 4.2.1. Продукција цитокина

У културама МНЋ периферне крви стимулираним са РНА, експозиција сталним магнетним пољима истих јачина и оријентација није довела до значајних промена у продукцији испитиваних цитокина (Графикони 12–20). Ипак, детаљнија анализа указала је на присуство одређених трендова у продукцији цитокина у зависности од јачине и оријентације поља.

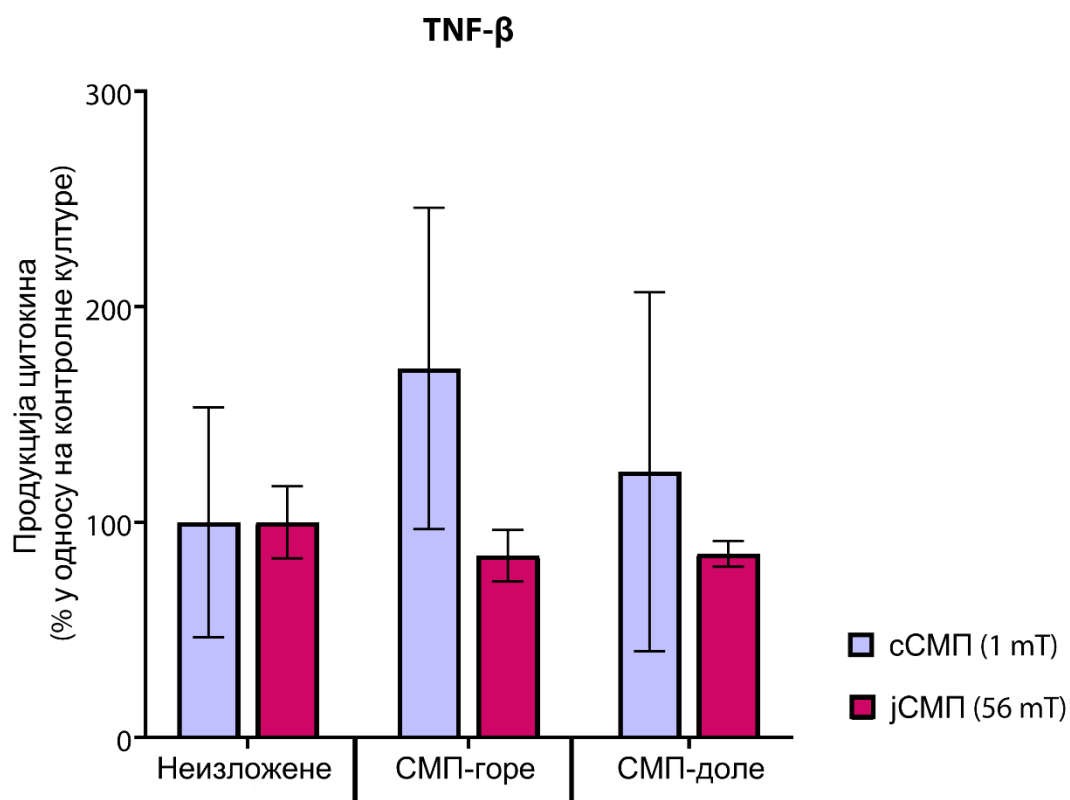
На основу уочених образаца промене, анализирани цитокини могу се сврстати у три групе. У првој групи, коју чине IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-8 (Графикони 12–16), уочено је да је нагоре оријентисано јаче поље (СМП-горе, 56 mT) повезано са нижим вредностима продукције цитокина у односу на 1 mT, док су у условима СМП-доле разлике биле мање изражене и вредности су остајале блиске контролним или умерено повишене. Конкретно, на примеру IFN- $\gamma$ , у условима нагоре оријентисаног поља (СМП-горе), изложеност СМП-у јачине 1 mT довела је до повећања продукције на 121,82% у односу на контролне културе (повећање од 21,82%). Насупрот томе, при излагању 56 mT (јСМП-горе) уочено је смањење продукције на 90,17% у односу на контролу (смањење од 9,83%), као и изражен пад у односу на 1 mT услов (разлика од приближно 31,65 процентних поена). У условима на доле оријентисаног поља (СМП-доле), продукција IFN- $\gamma$  била је умерено повећана при обе јачине поља, са вредностима од 110,17% при 1 mT и 105,71% при 56 mT у односу на контролне културе, уз мању разлику од приближно 4,46 процентних поена (Графикон 12).



**Графикон 12. Продукција цитокина IFN- $\gamma$**

Ослобађање IFN- $\gamma$  од стране МНТ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

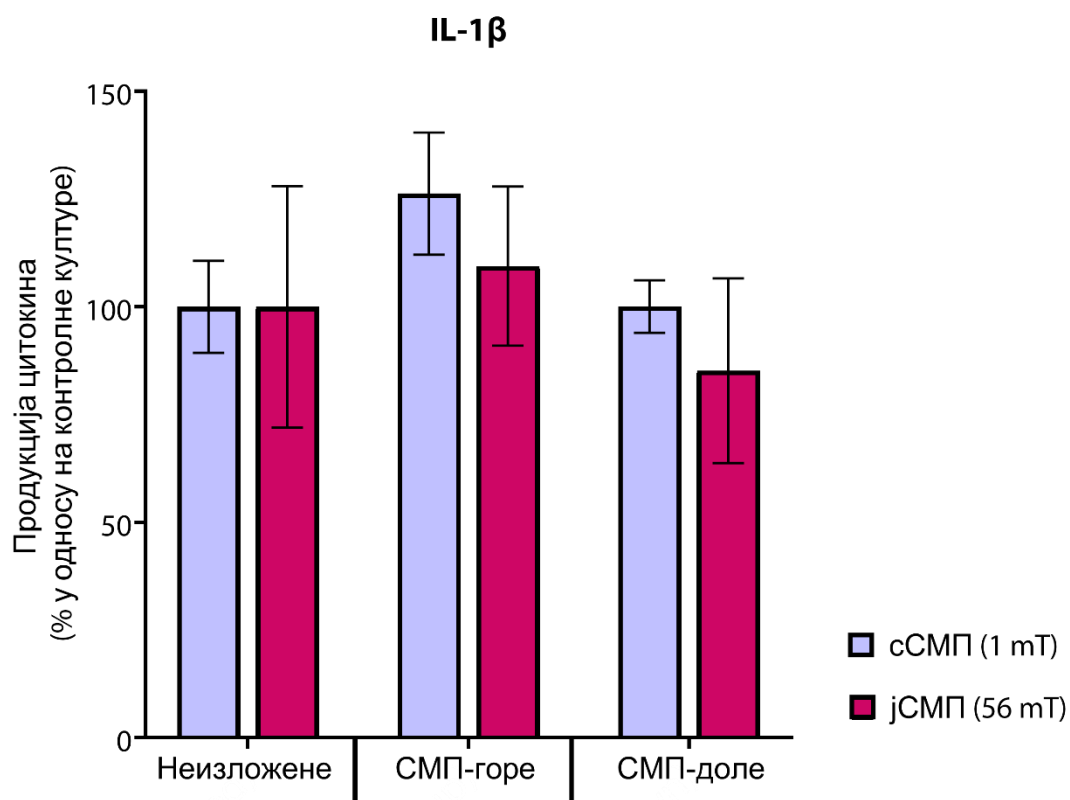
СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.



**Графикон 13. Продукција цитокина TNF- $\beta$**

Ослобађање TNF- $\beta$  од стране МНТ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

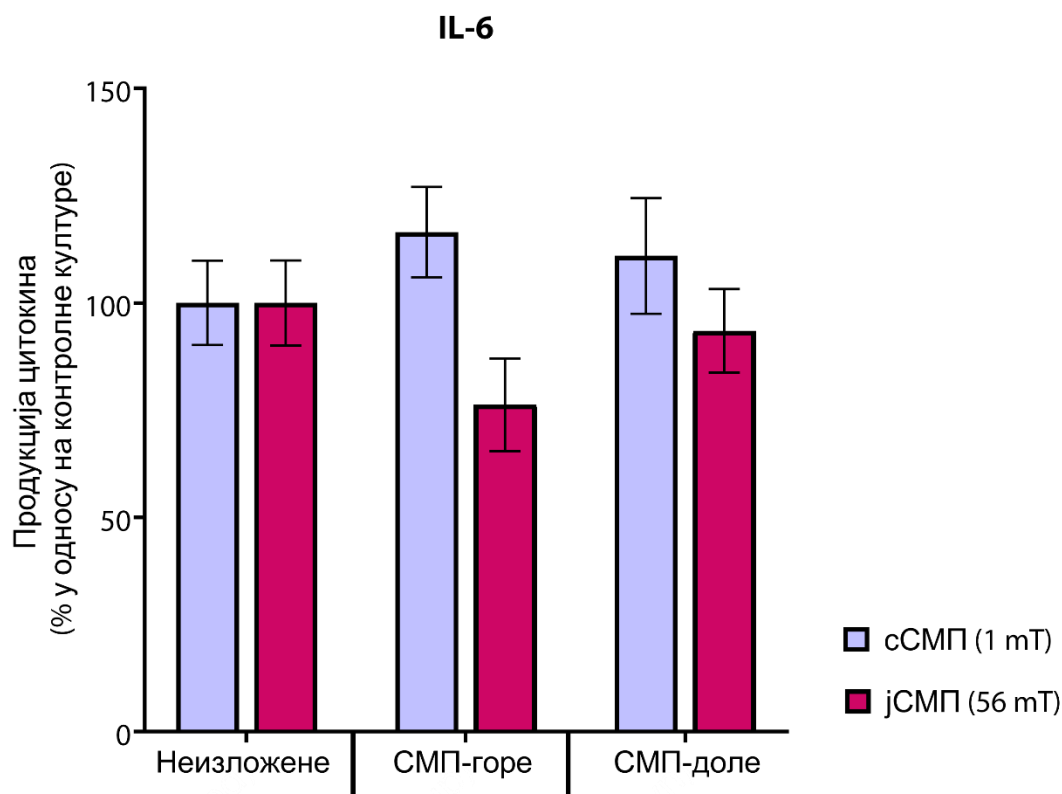
СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.



**Графикон 14. Продукција цитокина IL-1 $\beta$**

Ослобађање IL-1 $\beta$  од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат производње цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

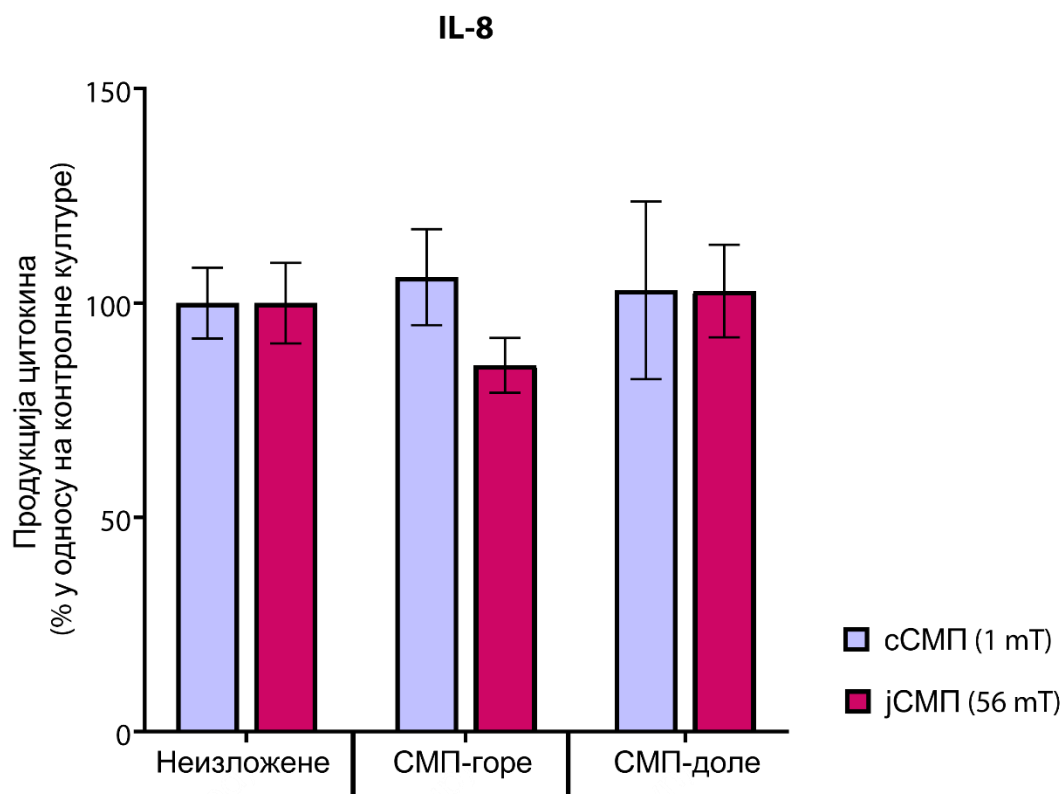
СМП: стално магнетно поље, cСМП: слабо СМП, jСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.



**Графикон 15. Продукција цитокина IL-6**

Ослобађање IL-6 од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

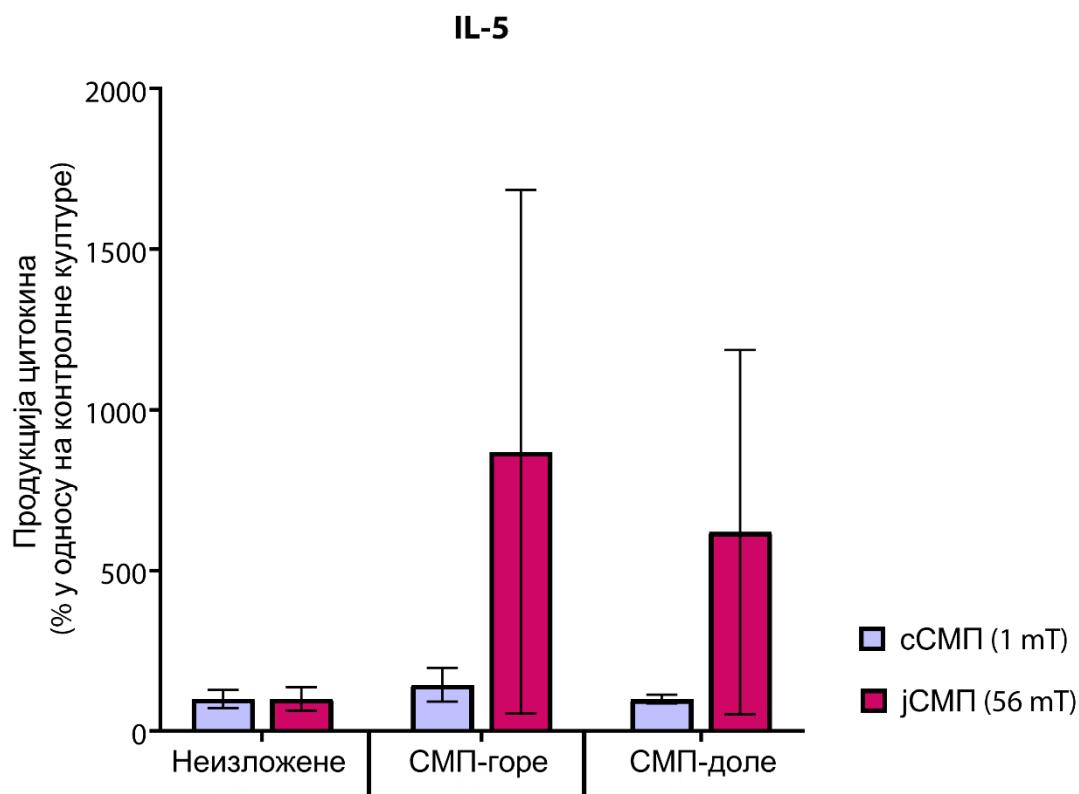


**Графикон 16. Продукција цитокина IL-8**

Ослобађање IL-8 од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

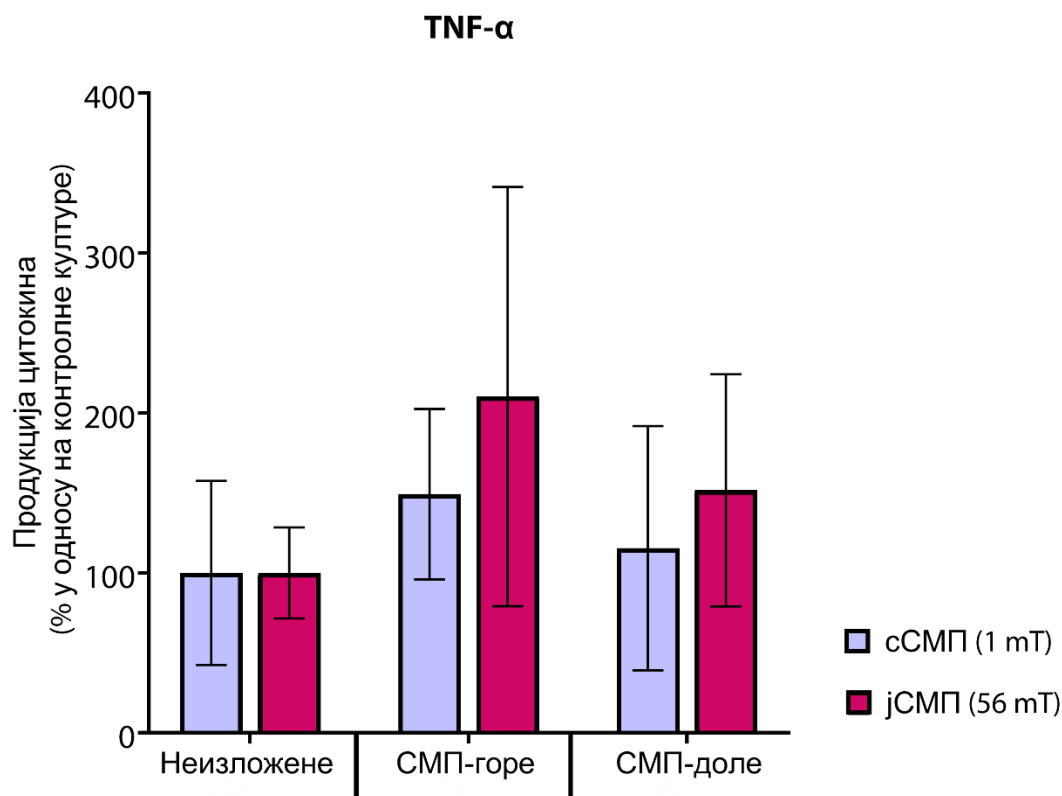
За разлику од претходне групе, у другој групи цитокина, коју чине IL-5 и TNF- $\alpha$  (Графикони 17 и 18), изложеност МНЋ стимулираних са РНА нагоре оријентисаном јачем пољу (СМП-горе, 56 mT) била је праћена повећаном продукцијом у односу на 1 mT и контролне услове. Међутим, услед варијабилности између донора, ове промене нису достигле статистичку значајност.



**Графикон 17. Продукција цитокина IL-5**

Ослобађање IL-5 од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

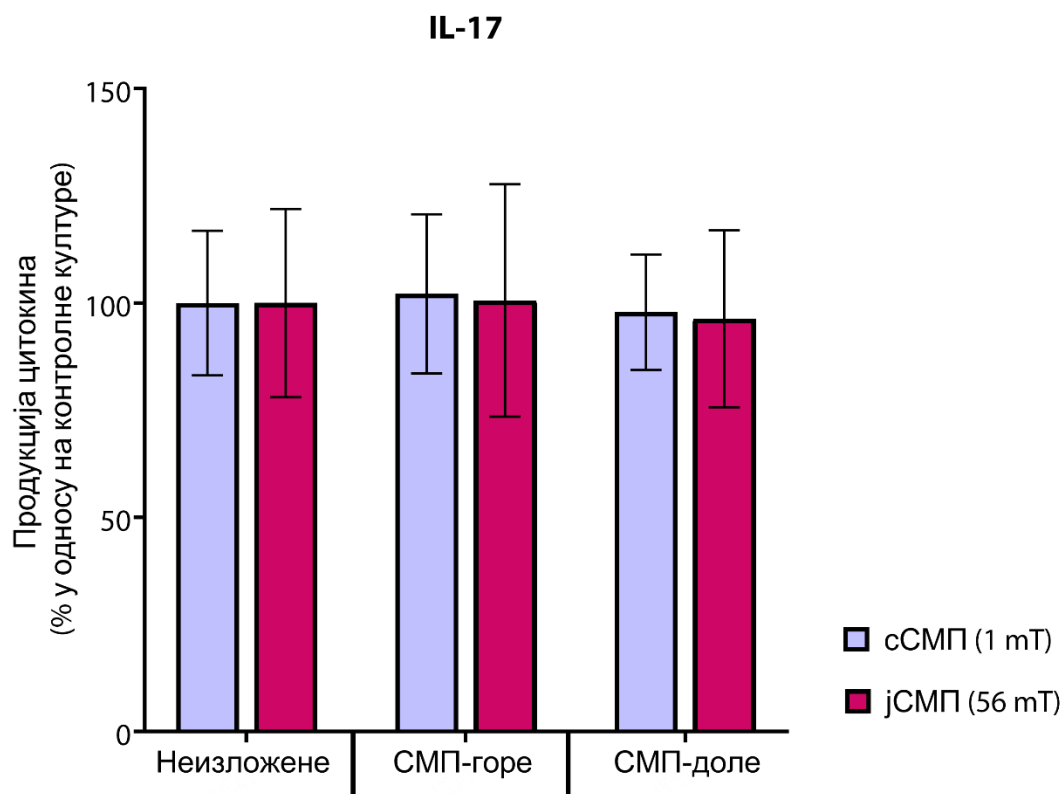


**Графикон 18. Продукција цитокина TNF- $\alpha$**

Ослобађање TNF- $\alpha$  од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

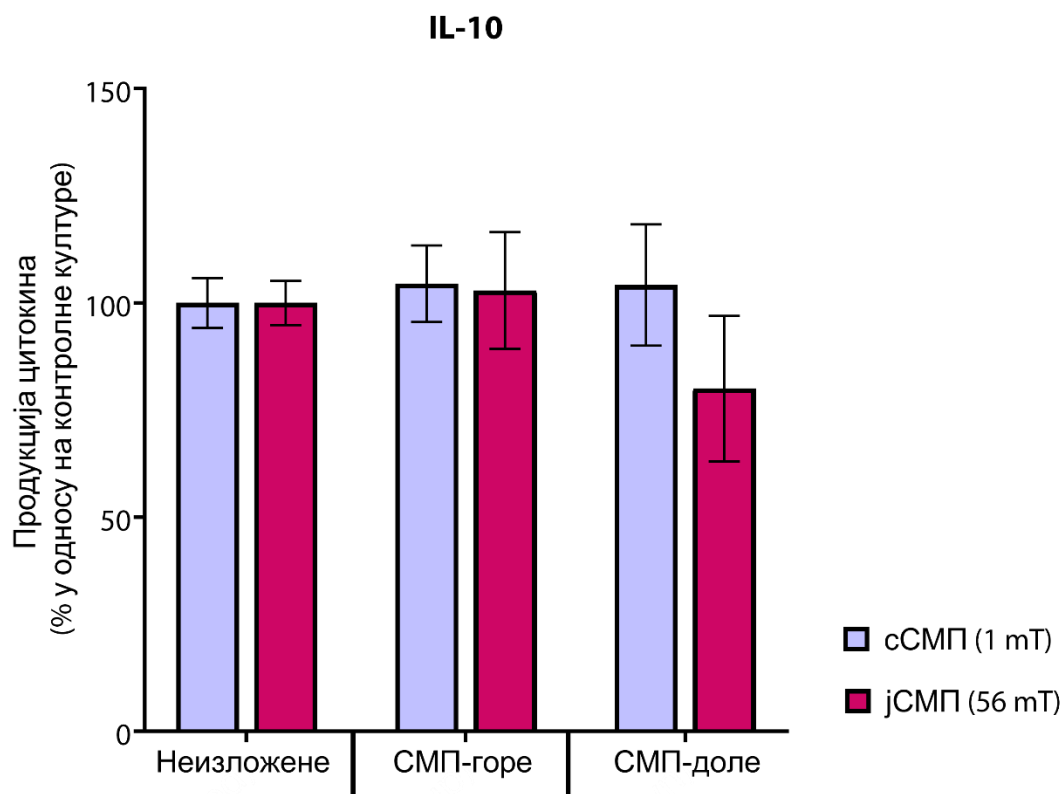
Трећу групу чине IL-10 и IL-17, код којих су уочене минималне промене у нивоу продукције. Продукција IL-10 (Графикон 19) остала је стабилна у свим испитиваним условима, док је код IL-17 (Графикон 20) уочена тенденција благог смањења при експозицији јаком магнетном пољу оријентације надоле (СМП-доле, 56 mT).



**Графикон 19. Продукција цитокина IL-17**

Ослобађање IL-17 од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.



**Графикон 20. Продукција цитокина IL-10**

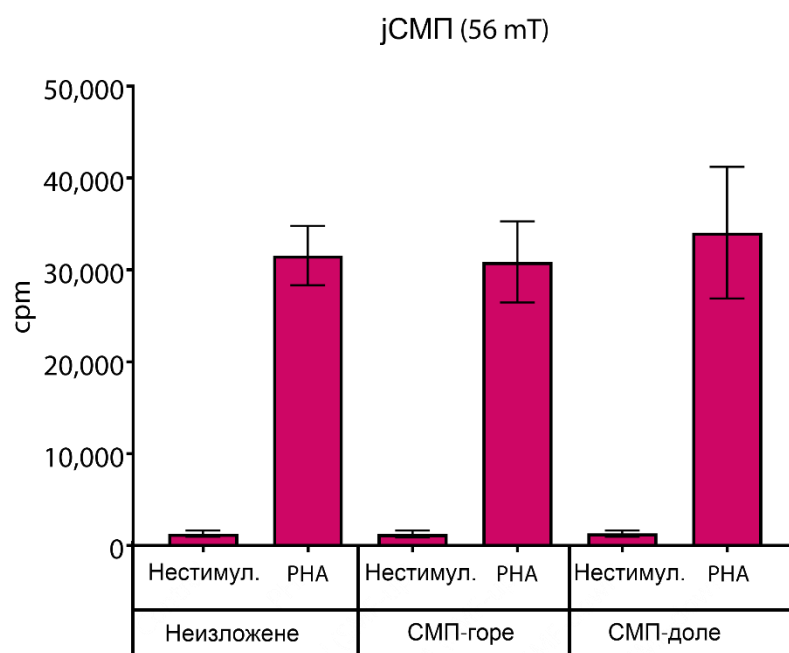
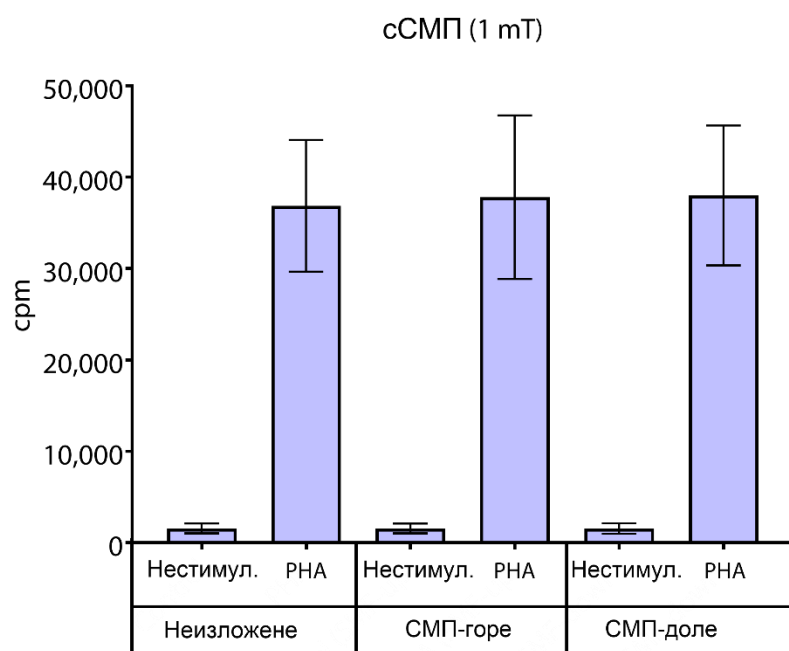
Ослобађање IL-10 од стране МНЋ стимулираних РНА у културама континуирано изложеним СМП јачине 1 mT или 56 mT. Резултати су приказани као проценат продукције цитокина у односу на одговарајуће контролне културе, док линије на стубићима представљају стандардну грешку средње вредности (SEM) за  $n = 3$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП.

#### 4.2.2. Пролиферација МНЋ

Анализа пролиферације МНЋ стимулираних са РНА показала је да експозиција сталном магнетном пољу (СМП) јачине 1 mT и 56 mT није довела до значајних промена у односу на неекспониране контролне културе (Графикон 21). Вредности пролиферације у свим испитиваним условима остале су у уском опсегу око контроле, без јасног обрасца зависног од јачине или оријентације поља.

При излагању СМП-у јачине 1 mT, уочена су минимална одступања у односу на контролу, са благим варијацијама између СМП-горе и СМП-доле услова, без конзистентног тренда повећања или смањења пролиферације. Слично томе, при јачини од 56 mT, вредности пролиферације остале су блиске контролним, уз нешто већу варијабилност између појединачних мерења, али без систематског ефекта оријентације поља (Графикон 21).



### Графикон 21. Пролиферација МНЋ

Пролиферација МНЋ стимулираних са РНА у културама које су биле континуирано изложене 1 mT или 56 mT СМП-у. Резултати су изражени као број откуцаја у минути (срт), а линије на стубићима представљају стандардне девијације средњих вредности за  $n = 6$  независна експеримента.

СМП: стално магнетно поље, сСМП: слабо СМП, јСМП: јако СМП, Неизложене: контролна култура која није била изложена деловању СМП. Нестимул.: култура МНЋ без стимулације са РНА.

Заједно, ови налази указују да у условима максималне, антиген-неспецифичне активације, као што је РНА модел, СМП има ограничен утицај на функционални одговор Т лимфоцита. То сугерише да потенцијални ефекти СМП-а могу бити суптилнији и вероватно зависни од физиолошки релевантнијих механизма активације, као што је сигнализација посредована дендритским ћелијама.

## ***5. ДИСКУСИЈА***

Све већа употреба напредне технологије праћена је променама физичког окружења у радном и животном простору људи. О дејству електромагнетног поља савремених електричних уређаја и бежичне компјутерске технологије на здравље човека објављен је велики број научних радова (88). Међутим, поред електромагнетних поља (поља која се мењају у времену), човек може бити изложен деловању сталних магнетних поља (поља која се не мењају у времену). Стално магнетно поље (СМП) се користи у одређеним индустријама, модерном путничком транспорту заснованом на магнетној левитацији, али и у медицини, где су пацијенти, особље и истраживачи изложени његовом дејству, емисијом из апарата који раде на принципу магнетне резонанце. Упркос његовој великој употреби, још увек постоји мало интересовања за нежељена дејства изложености СМП. Стално магнетно поље се, на основу биолошких ефеката до којих доводи, може поделити на слабо ( $<1\text{ mT}$ ), умерено ( $1\text{ mT}$  до  $1\text{ T}$ ), јако ( $1$  до  $5\text{ T}$ ) и веома јако ( $>5\text{ T}$ ). Литературни подаци о дејству СМП углавном су ограничени на акутну изложеност веома високим јачинама ( $>1\text{ T}$ ), које обично представљају еквивалент изложености пацијената апаратима магнетне резонанце. Са друге стране, мало је података о биолошким дејствима хроничне изложености магнетном пољу умереног интензитета, а посебно о дејству на ћелије имунског система (89,151).

Осим испитивања нежељених дејстава изложености сталном магнетном пољу, могуће је разматрати и потенцијалне терапијске ефекте његовог деловања на биолошке системе. Могућа терапијска примена СМП заснива се превасходно на испитивањима континуираног дејства СМП мањег интензитета (152). Примена оваквог терапијског приступа била би нарочито интересантна код обољења која захтевају агресивно лечење, јер би се комбиновањем више терапијских модалитета и применом нижих појединачних доза могао постићи жељени терапијски ефекат, уз смањење потребе за високо дозном монотерапијом праћеном бројним нежељеним дејствима. Пример оваквог приступа представља испитивано синергистичко дејство СМП и хемотерапијских лекова на пролиферацију туморских ћелија (153, 154).

Међутим, подаци о дејству СМП на функционалне карактеристике имунских ћелија су оскудни и недовољно јасни. Иако је испитивано дејство СМП на пролиферацију укупних лимфоцита стимулираних митогенима (155, 156), нисмо успели да пронађемо податке о његовом ефекту на функционалне карактеристике Т лимфоцита који су стимулирани дендритским ћелијама, као најважнијим антиген-презентујућим ћелијама.

Узимајући у обзир резултате *in vivo* студија које су показале да супротни смерови сталног магнетног поља могу имати различито дејство на одређене биолошке параметре (157), можемо претпоставити постојање различитих, па чак и дијаметрално супротних биолошких ефеката и на ћелије имунског система.

Данас у свету постоји велико интересовање за примену комбинације имуномодулаторних/имуносупресивних лекова са различитим механизмима дејства у лечењу аутоимуних болести и спречавању одбацавања алокалема. Циљ комбиноване терапије јесте постизање бољег терапијског ефекта и смањење нежељених дејстава применом субоптималних концентрација појединачних лекова. Због тога откриће имуномодулаторних својстава сталног магнетног поља већ почиње да се испитује у бројним инфламаторним и аутоимуним болестима (154).

Највише је испитиван ефекат сталног магнетног поља на туморске ћелије, односно инхибиторни утицај магнетног поља на пролиферацију туморских ћелија. У циљу смањења токсичности појединачних хемотерапијских лекова успешно је спроведен већи број *in vivo* студија, у којима је коришћен синергистички ефекат хемотерапијског лека и сталног магнетног поља. Иако основни механизам овог дејства још увек није у потпуности разјашњен, студије су показале значајнији ефекат комбинације магнетног поља и хемотерапијског лека на регресију тумора (158), време преживљавања миша (159), пролиферацију хуманих леукемијских ћелија (160), као и на ангиогенезу тумора (161), у поређењу са дејством самог лека.

Проблем представља чињеница да постоји широк распон јачина магнетног поља, при чему су до сада испитиване само поједине вредности, док ефекат супротног, надоле оријентисаног, смера магнетног поља (тзв. јужни пол) није систематски испитиван. У свим досадашњим студијама анализирана је експозиција искључиво нагоре оријентисаном тзв. северном полу магнетног поља, који је коришћен као стандард. Недавно је показано да континуирана изложеност супротним смеровима сталног магнетног поља различито утиче на хематолошке параметре и целуларност слезине миша, у зависности од тога којем полу магнетног поља су животиње биле изложене (157). Ови налази намећу претпоставку да би се слични, па чак и дијаметрално супротни ефекти могли очекивати и на ћелије имунског система, пре свега у погледу њихове пролиферације и продукције цитокина.

Међутим, са друге стране, уколико би се у терапијске сврхе користио неки специфичан ефекат изложености сталном магнетном пољу, на пример ефекат на продукцију одређених цитокина, било у смислу инхибиције или у смислу стимулације њихове продукције, пожељно би било да тај ефекат буде селективан, односно да одређена јачина сталног магнетног поља не утиче истовремено и на пролиферацију Т лимфоцита.

Испитивање пролиферације Т лимфоцита и продукције цитокина у досадашњим студијама углавном се заснивало на анализи ефеката акутне изложености високим јачинама сталног магнетног поља (155, 162). У тим истраживањима углавном су коришћене моноклеарне ћелије периферне крвне људи, док су пречишћени Т лимфоцити ретко били предмет испитивања, а стимулација пролиферације најчешће је изазивана митогенима. Тако је показано да способност периферних моноклеарних ћелија крви (МНЋ) да производе одређене цитокине може бити измењена акутном експозицијом снажном СМП од 0,5 Т помоћу MRI апарата (156). Акутна експозиција је ријетко испитивана на пречишћеним хуманим CD4<sup>+</sup> Т ћелијама, али су и ове ћелије биле активирани митогенима као што је фитохемаглутинин [163]. Фокусирали смо се на CD4<sup>+</sup> Т ћелије, а не на укупне CD3<sup>+</sup> Т ћелије, имајући у виду кључну улогу CD4<sup>+</sup> Т ћелија у

оркестрацији имунских одговора путем диференцијације у подтипове Т помоћних ћелија и секреције различитих скупова цитокина (164). Поред тога, CD4+ Т ћелије имају критичну улогу у патогенези имунски посредованих болести, а показивање модулације њихове функције магнетним пољем могло би отворити нови терапијски приступ у лечењу патолошких стања. Штавише, недавно је показано да су CD4+, али не и CD8+, Т ћелије са химерним антигенским рецептором (CAR) главни покретачи синдрома ослобађања цитокина, који је познат као нежељени ефекат CAR Т ћелијске имунотерапије и представља најзначајнију токсичност повезану са лечењем (165). Даље, CD4+ и CD8+ Т ћелије могу различито одговарати на алогену стимулацију, као што је одложена активација CD8+ Т ћелија у мешовитој леукоцитној реакцији (166), што указује да процена ефекта магнетног поља на пречишћене подгрупе Т ћелија има предност у односу на процену укупне популације Т ћелија.

Такође су ријетке студије у којима су се испитивали ефекти нижих јачина магнетног поља, али су и у тим истраживањима углавном коришћене хумане периферне мононуклеарне ћелије крви, док су пречишћени Т лимфоцити ретко били предмет испитивања, а стимулација пролиферације је изазивана такође митогенима. Тако су ефекти умереног сталног магнетног поља испитивани на фибробластима који су били стимулирани липополисахаридом и изложени СМП у трајању од 12 h (167). Уколико би била примењивана акутна експозиција, а инкубација ћелијских култура продужена тј. настављена без изложености магнетном пољу, уочени ефекти били би реверзибилни, односно испитивани параметри би се нормализовали (168).

Нисмо успели да пронађемо студије у којима је испитиван ефекат магнетног поља на хумане дендритске ћелије (ДТ), као најважније антиген-презентујуће ћелије, и њихову стимулаторну улогу у пролиферацији алогених Т лимфоцита.

Може се закључити да, иако је показано да стално магнетно поље поседује имуномодулаторна својства, механизми његовог деловања на нивоу пролиферације Т лимфоцита стимулираних алоантигенима, односно дендритским ћелијама, још увек нису разјашњени.

До недавно се сматрало да имуномодулаторни/имуносупресивни лекови првенствено делују на лимфоците, међутим све је већи број радова који указују на дејство ових лекова и на дендритске ћелије (169, 170). Ова сазнања су од великог значаја, с обзиром на то да дендритске ћелије, поред тога што су најефикасније ћелије у презентацији антигена наивним Т ћелијама и индукцији имунског одговора, могу такође да индукују и имунолошку толеранцију (171). Због тога је изузетно важно испитати имуномодулаторни ефекат сталног магнетног поља не само на лимфоците, већ и на алоstimулаторну функцију дендритских ћелија.

Тако да, према нашим сазнањима, не постоје објављени подаци о ефектима континуираног и умереног СМП на лимфоците активирание дендритским ћелијама, нити постоје студије у којима су лимфоцити били изложени СМП различитих поларитета. Стога смо у овој студији испитивали промене у *in vitro* продукцији цитокина у културама које су се састојале од пречишћених хуманих Т лимфоцита активираних из моноцита створеним дендритским ћелијама. Промене су анализиране након континуиране експозиције вертикалним хомогеним СМП умереног интензитета (1 mT и 56 mT) и различитих оријентација.

У нашем раду користили смо *in vitro* модел диференцијације моноцита периферне крви у дендритске ћелије у присуству GM-CSF и IL-4, који представља један од најприхваћенијих и најзаступљенијих модела у литератури. МоДЋ се могу добити из моноклеарних ћелија (МНЋ) периферне крви или из пречишћених CD14+ моноцита у присуству GM-CSF и IL-4 (22, 23, 172), као и из кондиционираног медијума у коме се налази коктел цитокина продукованих од стране моноцита. GM-CSF, за разлику од низа других цитокина, довољан је да индукује експресију маркера диференцијације дендритских ћелија CD1a, CD1b и CD1c. IL-4 самостално нема утицај на индукцију експресије наведених маркера, али у комбинацији са GM-CSF стабилизује експресију CD1 молекула (172, 173). Чини се да IL-4 представља главни фактор који усмерава олигопотентне CD14+ ћелије ка диференцијацији у дендритске ћелије, вероватно путем супресије развоја макрофага (174, 175, 176). GM-CSF и IL-4 заједно доводе до повећане експресије МНС молекула II класе и костимулаторних молекула на дендритским ћелијама (177).

У нашим експериментима смо за индукцију матурације незрелих МоДЋ, користили Полиинозинско-полицитидилинску киселину (Poly (I:C)) и Имунозин (7-thia-8-oxoguanosine).

Полиинозинско-полицитидилинска киселина (Poly (I:C)) је синтетички аналог дволанчане РНК који делује као лиганд *Toll-like* рецептора 3 (TLR3), имитирајући вирусну инфекцију и активирајући урођени имунски одговор. Стимулација незрелих дендритских ћелија Poly (I:C) доводи до њихове стабилне матурације, што се манифестује повећаном експресијом молекула HLA-DR, CD83 и CD86, редукцијом ендокитне активности и појачаном способношћу презентације антигена (178). Овако зреле дендритске ћелије продукују повећане количине IL-12 и ефикасно индукују Th1-поларисан адаптивни имунски одговор, што Poly (I:C) чини једним од најчешће коришћених експерименталних адјуванаса за индукцију функционалне матурације дендритских ћелија (178).

Имунозин (7-thia-8-oxoguanosine) је синтетички аналог гуанозина са израженим имуномодулаторним својствима. Ранија истраживања су показала да имунозин делује као кофактор у имунској активацији, стимулишући Т-ћелијску пролиферацију у присуству антиген-презентујућих ћелија (179). Код моноцит-деривисаних дендритских ћелија, 7-thia-8-oxoguanosine изазива дозно-зависну диференцијацију и матурацију, праћену повећаном експресијом костимулаторних молекула и појачаном продукцијом проинфламаторних цитокина, укључујући IL-12, IL-1 $\beta$  и IL-6. Комбинована примена имунозина и Poly (I:C) додатно појачава Th1 и Th17 имунске одговоре, указујући на синергистичко деловање различитих сигнала у обликовању функционално зрелог фенотипа дендритских ћелија (180).

За разлику од липополисахарида (LPS), класичног лиганда *Toll-like* рецептора 4 (TLR4), који снажно индукује матурацију дендритских ћелија, али је праћен израженом продукцијом проинфламаторних цитокина и потенцијалном системском токсичношћу, Poly (I:C) омогућава индукцију зрелог фенотипа дендритских ћелија уз физиолошки релевантнији, антивирусни тип имунске активације (181). Док LPS доводи до снажне NF- $\kappa$ B активације и често прекомерне продукције TNF- $\alpha$  и IL-6, Poly (I:C) путем TLR3 и TRIF-зависних сигналних путева фаворизује продукцију IL-12 и тип I интерферона, што резултира функционално зрелијим дендритским ћелијама са израженијом способношћу индукције Th1 и цитотоксичних Т-ћелијских одговора (181, 182).

Имунозин (7-thia-8-oxoguanosine), за разлику од LPS-a, не представља класични микробни образац, већ делује као синтетички нуклеозидни сигнал који модулише функцију дендритских ћелија без изражене цитотоксичности. Ова карактеристика имунозина посебно је значајна у експерименталним моделима где је потребна контролисана матурација дендритских ћелија, без ризика од преактивне инфламације која је често повезана са LPS-ом (180, 183).

Са клиничког аспекта, способност Poly (I:C) да индукује стабилну и функционално активну матурацију дендритских ћелија има значајне импликације у развоју дендритско-ћелијских вакцина, посебно у онкологији и антивирусним имунотерапијама. Poly (I:C) и његови деривати (нпр. poly-ICLC) већ су испитивани као адјуванси у клиничким студијама, где су показали способност да појачају специфичне Т-ћелијске одговоре уз прихватљив безбедносни профил (184). Комбинација Poly (I:C) са имунозином потенцијално омогућава фино подешавање степена и квалитета матурације дендритских ћелија, што може бити од посебне важности за персонализоване ДТ-базиране вакцине и имунотерапијске приступе усмерене ка индукцији снажног Th1 и CTL одговора (180, 184).

До сада смо видели, да смо нашим експерименталним моделом превазишли два значајна ограничења претходних студија. Прво је коришћење прочишћених Т лимфоцита, кључне ћелијске популације, што је од посебног значаја имајући у виду њихову централну улогу у регулацији стеченог имунског одговора. Као што смо видјели, досадашње студије су испитивале ефекте СМП на укупним популацијама лимфоцита или моноклеарних ћелија периферне крви, што значајно ограничава могућност прецизне интерпретације резултата. У таквим експерименталним системима одговор представља збирни ефекат више различитих ћелијских типова, укључујући Т лимфоците, В лимфоците, моноците и природне ћелије убице, при чему је немогуће разлучити директан ефекат магнетног поља на Т лимфоците од индиректних, посредованих ефеката путем паракриних механизма (185). Друго ограничење претходних студија, које смо превазишли, односи се на начин активације лимфоцита. Највећи број радова користио је митогене, као што су фитоHEMAГЛУТИНИН или КОНКАНАВАЛИН А, који изазивају неспецифичну, често супрафизиолошку активацију Т лимфоцита, заобилазећи природне механизме антиген-зависне активације (186). Такав приступ може прикрити суптилне, али биолошки релевантне ефекте статичког магнетног поља, посебно у погледу регулације продукције цитокина и функционалне поларизације Т лимфоцита. У том контексту, стимулација Т лимфоцита путем дендритских ћелија представља методолошки супериорнији модел, јер верније одражава услове који постоје *in vivo*, укључујући интеракције TCR-MHC комплекса, костимулаторне сигнале и утицај цитокиноског микромедијума (187). Међутим, посебна вредност нашег експерименталног приступа огледа се у коришћењу како незрелих, тако и зрелих дендритских ћелија као стимулатора Т лимфоцита. Познато је да незреле дендритске ћелије, услед ниског нивоа експресије костимулаторних молекула и специфичног цитокиноског профила, могу да индукују толеранцију или слаб функционални одговор Т лимфоцита, док зреле дендритске ћелије представљају снажне индукторе ефекторних имунских одговора (188, 189). Омогућавајући анализу ефеката статичког магнетног поља у ова два различита функционална контекста, наш модел пружа јединствену могућност да се сагледа како магнетно поље утиче на Т лимфоците у условима различитог степена и квалитета активације.

На тај начин, наш рад превазилази ограничења већине досадашњих студија и представља први систематски покушај да се испита дејство сталног магнетног поља на антиген-зависну активацију прочишћених хуманих Т лимфоцита посредовану дендритским ћелијама. Овакав приступ омогућава прецизније разумевање потенцијалних имуномодулаторних ефеката сталног магнетног поља и поставља основу за даља истраживања његове селективне примене у терапијском контексту.

Полазећи од претпоставке да експозиција СМП има потенцијал да измени продукцију интерлеукина од стране активираних Т ћелија, најпре смо тестирали ефекат на секрецију три интерлеукина који припадају различитим путевима активације Т ћелија: IFN- $\gamma$ , који је својствен Т помоћним ћелијама типа 1 (Th1), претежно укљученим у ћелијски имунски одговор; IL-5, који је обележје Т помоћних ћелија типа 2 (Th2), укључених у хуморални имунски одговор; и IL-17, који је карактеристичан за Т помоћне ћелије типа 17 (Th17), које играју кључну улогу у одржавању заштите мукозних баријера и укључене су у хроничне и аутоимуне инфламаторне поремећаје (190, 191). Даље смо испитивали про- и антиинфламаторне интерлеукине.

Показали смо да нагоре оријентисано СМП интензитета 56 mT значајно повећава продукцију IFN- $\gamma$  у културама у којима су ћелије биле стимулисане незрелим дендритским ћелијама. Насупрот томе, продукција IL-17 је била повећана када су ћелије биле изложене слабијем СМП (1 mT). Овај ефекат је, као и код продукције IFN- $\gamma$ , уочен у културама са незрелим ДЋ. Концентрација IL-5 није показала статистички значајне промене ни у једном од тестова.

Било је веома интригантно уочити да су Т ћелије активирани зрелим ДЋ производеле више TNF- $\alpha$  као одговор на надове оријентисано слабије СМП (1 mT). Када је СМП од 1 mT био усмерен нагоре, продукција TNF- $\beta$  у Т ћелијама активираним незрелим ДЋ била је значајно смањена у поређењу са ћелијама изложеним деловању СМП од 56 mT. Продукција IL-1, IL-6 и IL-8 није била измењена. Поред тога, продукција антиинфламаторног цитокина IL-10 није била значајно измењена.

Посебно интересантно је испитивање утицаја СМП на производњу проинфламаторних цитокина TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ , будући да је плејотропно деловање ових цитокина повезано са патогенетским механизмима многих имунских поремећаја. Будући да се придаје велики значај примени инхибитора TNF- $\alpha$  као терапијског средства, али и његовим значајним нежељеним дејствима приликом системске примене (192, 193, 194, 195), доказивање потенцијалног инхибиторног дејства СМП на производњу TNF- $\alpha$  отворило би могућност примене овог типа магнетног поља у терапији имунопатолошких стања. Смањење производње TNF- $\alpha$  цитокина под дејством СМП би могло учинити ова поља потенцијалним терапијским средством у имунопатолошким стањима. TNF- $\beta$ , познат и као лимфотоксин- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), је цитокин који припада фамилији фактора туморске некрозе. Примарно га луче активирани Т лимфоцити и, у мањој мери, В лимфоцити. Његова биолошка активност је блиска TNF- $\alpha$ , али за разлику од њега, TNF- $\beta$  има улогу у регулацији развоја лимфоидних органа, контролисању инфламаторних процеса и модулацији имунских одговора (196). TNF- $\beta$  се везује за исте рецепторе

као TNF- $\alpha$  (TNFR1 и TNFR2), што објашњава њихову делимичну преклапајућу функцију. Кључна улога TNF- $\beta$  је у индукцији апоптозе, регулацији имуног надзора, као и у одржавању хроничне инфламације. Његово прекомерно лучење доводи се у везу са аутоимуним болестима (реуматоидни артритис, мултипла склероза), док је смањена активност повезана са поремећајима у развоју лимфоидних структура (197, 198).

Претходна истраживања су показала да је излагање СМП од 0,5 Т у трајању од 2 h повећало продукцију IFN- $\gamma$  и IL-4 у МНТ. Овај ефекат је био умањен након стимулације РНА (199). Међутим, показано је да је излагање СМП од 0,5 mT у трајању од 2 h на подгрупе хуманих CD4+ Т ћелија (наивне и меморијске ћелије) смањило ослобађање IFN- $\gamma$ , а овај ефекат је био брзо реверзибилан када су анализе поновљене након продужене *in vitro* културе (167).

Краткотрајна изложеност високом СМП није променила стварање проинфламаторних цитокина (1–4 h) (199, 200). Међутим, ослобађање проинфламаторних цитокина IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$  из макрофага, као и IL-6 из лимфоцита, значајно је инхибирано континуираном изложеношћу снажном, нехомогеном СМП у трајању до 24 h. Количина антиинфламаторног цитокина IL-10 произведеног од стране лимфоцита и макрофага била је повећана (201).

Утврђено је да стална магнетна поља утичу на туморске ћелије, нарочито путем својих инхибиторних дејстава. Лечење канцера подразумева комбинацију више терапијских приступа због токсичности и резистенције појединачних антинеопластичних лекова. Једна од техника је интеракција магнетних поља са антинеопластичним лековима. Ова комбинација представља нову стратегију за ефикасно лечење канцера. Поред тога, с обзиром на то да се уместо проводника и спољашњег извора енергије може користити трајни магнет, стимулација СМП је погоднија за дуготрајно локално лечење. Благотворни ефекти СМП могли би имати и даље примене (202).

Све је више доказа да СМП могу утицати на ћелијску пролиферацију, иако су објављени различити резултати. Одређене студије указују да СМП немају утицај на ћелијску пролиферацију нити на ћелијски циклус (203). Друге, међутим, показују да СМП, било самостално или у комбинацији са хемотерапијским лековима или зрачењем, испољавају потенцијалне користи у инхибицији раста канцера. Штавише, раније је доказано да ултрајако СМП може изазвати имunosупресију нарушавањем периферне диференцијације В ћелија и, последично, појаву бројних имунолошких поремећаја (204, 205). Као резултат тога, још увек није сасвим јасно како дуготрајна изложеност СМП утиче на људски организам. Пријављено је да СМП од 4,75 Т значајно смањује пролиферацију леукемијских ћелија, али без утицаја на пролиферацију нормалних лимфоцита (200). Додатно, показано је да СМП од 7 Т има способност да инхибира пролиферацију одређених линија канцерских ћелија (206). Са друге стране, постоје студије које су показале да чак и СМП јачине 10 Т не изазивају очигледне промене у неканцерским ћелијама као што су ћелијске линије јајника кинеског хрчка или хумане фибробластне ћелије (207, 208, 209).

Поред тога, недавне студије су утврдиле да СМП, подстичући паракрини ефекат, убрзавају регенерацију коштаног ткива и побољшавају његов квалитет (210), поправљају различита исхемијска оштећења ткива промовишући ангиогенезу и регенерацију ткива (211), као и да унапређују поправку артритичне хрскавице подстицањем хондрогенезе и миграције матичних ћелија (212). Ови приступи имају широку примену у регенерацији коштаног и кожног ткива, лечењу исхемије екстремитета и оштећења миокарда, као и у терапији дијабетичних рана (211, 213). Ови налази показују да су различити ћелијски одговори на СМП у великој мери условљени типом ћелије.

Испитивање ефеката СМП од 1 Т на 15 различитих ћелијских линија, укључујући 12 хуманих ћелијских линија (5 неканцерских и 7 солидних канцерских) и 3 глодарске ћелијске линије, показало је да СМП од 1 Т нема уочљив утицај на ћелијски циклус нити на ћелијску смрт. Међутим, смањење броја ћелија уочено је у шест од седам солидних хуманих канцерских ћелијских линија при већој густини ћелија. И тип ћелије и густина ћелија имали су очигледан утицај на ефекте СМП. Резултати су показали да СМП од 1 Т може инхибирати раст већине хуманих солидних канцерских ћелијских линија, али не и неканцерских ћелијских линија (214). Продужена изложеност СМП од 0,5 Т у трајању од седам дана смањила је пролиферацију и продукцију цитокина (TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF) у матичним ћелијама добијеним из масног ткива (215). Изложеност СМП до 24 mT смањује стопу пролиферације мезенхималних матичних ћелија (216). Показано је да различити правци магнетног поља изазивају различите ефекте на број канцерских ћелија у 12 различитих ћелијских линија (5 хуманих солидних туморских ћелијских линија, 4 хумане неканцерске ћелијске линије и 2 хумане леукемијске ћелијске линије, као и ћелијска линија јајника кинеског хрчка), када су ћелије биле изложене СМП јачине 0,2–1 Т различитих оријентација (205). Показано је да СМП јачине 15 mT снижава експресију транскрипционих фактора специфичних за остеокласте у макрофагима миша добијеним из коштане сржи, и тим ефектом СМП може допринети инхибицији ресорпције кости и формирања остеокласта. Овај приступ се може применити у лечењу остеолитичких стања као што су остеопороза и реуматоидни артритис (217).

У нашој студији пролиферација ћелија је анализирана у алогеној мешовитој лимфоцитној реакцији, одвојено за ћелије које су биле изложене 1 mT и 56 mT СМП-

у. Као што се очекивало, добијени резултати су показали већу пролиферативну реакцију када су Т ћелије биле стимулисане са мДЋ. Међутим, није било значајних промена у пролиферацији стимулираних ћелија без обзира на јачину и оријентацију СМП-а коме су биле изложене, што указује да степен активације Т ћелија није био погођен тестираним СМП-ом.

Ћелијска смрт је анализирана применом проточне цитометрије, квантитативним одређивањем броја ћелија са хиподиплоидним једрима и ћелија са оштећеним ћелијским мембранама, које представљају апоптотске и некротичне ћелије, респективно. После 6 дана изложености Т ћелија 56 mT CMF-у различитих оријентација, број апоптотских и некротичних ћелија је износио око или испод 30% укупних ћелија, што указује на одсуство цитотоксичног ефекта СМП-а. Благо, али статистички значајно повећање је уочено само између контролних ћелија и ћелија изложених наниже оријентисаном СМП-у, где је забележен већи број апоптотских ћелија у културама изложеним СМП-у (контрола према наниже оријентисани СМП:  $22.33 \pm 3.21$  према  $28.33 \pm 1.15$ ;  $p < 0.05$ ). Међутим, анализа некротичних ћелија није показала разлике у вијабилности Т ћелија између тестираних услова.

Као резултат свега наведеног, тешко је директно упоређивати публикације које су овде цитиране због разлика у интензитету сталног магнетног поља, трајању експозиције и врсти изложених субјеката. Не само да се експериментални резултати у литератури разликују, већ су понекад и међусобно супротстављени. Ово је посебно интригантно јер су поједини извештаји показали разлике између супротних праваца магнетног поља (218, 219). Ометајући проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине, показано је да СМП имају и стимулаторне и инхибиторне ефекте на одговор имунског система. Докази такође указују на то да дуготрајна изложеност СМП може смањити адаптивне имунолошке одговоре, нарочито у Th1 фракцији ћелија (220).

Сходно томе, у паралелним културама моноклеарних ћелија периферне крви стимулираних фитохемаглутинином (РНА) није уочен значајан утицај СМП-а ни на пролиферацију, ни на продукцију проинфламаторних цитокина IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ . Ови резултати показују да ефекти тестираних СМП услова зависе од релевантног имунолошког модела и подстичу прелаз на специфичније културе Т лимфоцита стимулираних хуманим дендритским ћелијама. У нашем дизајну, укључивање два модела – Т лимфоцити са незрелим и зрелим ДЋ (незреле ДЋ/зреле ДЋ) и моноклеари PBL – омогућило је да се истовремено провери утицај СМП на класичан, широко коришћен митогенски модел, као и на комплекснији и клинички релевантнији Т Lu–ДЋ модел. Док резултати са моноклеарима служе као потврда да СМП не делује на опште лимфоцитне одговоре, Т Lu–ДЋ модел је омогућио идентификацију специфичних, поларитетски зависних ефеката на продукцију цитокина од стране Т лимфоцита, што представља јасан научни допринос ове студије.

Како бисмо боље разумели биолошке утицаје СМП, сада смо показали да је важно узети у обзир и различите поларитете СМП у односу на продукцију цитокина. Ипак, наша студија је имала одређена ограничења. Пре свега, признајемо да је она углавном ограничена на ELISA податке и да недостаје механистички увид, што

може ограничити могућност ефикасне валидације резултата. Ипак, ово је први пут да је доказано да различити правци СМП изазивају различите ефекте на продукцију цитокина од стране лимфоцита активираних хуманим дендритским ћелијама.

## ***6. ЗАКЉУЧЦИ***

На основу обављених истраживања и добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

- Сprovedена истраживања показују да стално магнетно поље (СМП) умереног интензитета и различите оријентације може селективно модулисати продукцију цитокина хуманих CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита активираних дендритским ћелијама, без значајног утицаја на њихову пролиферацију и вијабилност. Ови налази указују да имуномодулаторно дејство СМП може бити функционално усмерено, а не последица опште имуносупресије или цитотоксичности.
- Применом физиолошки релевантнијег *in vitro* модела антиген-зависне активације Т лимфоцита посредоване дендритским ћелијама омогућена је прецизнија анализа ефеката СМП у условима који делимично одражавају *in vivo* имунске интеракције, у поређењу са моделима заснованим на неспецифичној митогеној стимулацији.
- Истовремена употреба незрелих и зрелих дендритских ћелија као стимулатора показала је да ефекти СМП зависе од функционалног стања дендритских ћелија, односно степена и квалитета иницијалне активације Т лимфоцита, омогућавајући сагледавање дејства СМП у различитим имунолошким контекстима, од толерогеног до ефекторног одговора.
- Поређењем два експериментална модела (ко-културе дендритских ћелија и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, као модела антиген-зависне активације, и културе моноклеарних ћелија периферне крви стимулираних фитохемаглутинином, као модела снажне неспецифичне поликлоналне активације) показано је да ефекти СМП зависе од контекста и начина активације имунских ћелија. Док у моделу дендритским ћелијама посредоване активације долази до селективне модулације продукције цитокина без утицаја на пролиферацију Т лимфоцита, у условима РНА-стимулације МНЋ нису уочене значајне промене ни у пролиферацији ни у продукцији цитокина.
- Ови налази указују да имуномодулаторно дејство СМП није универзално, већ зависи од присуства специфичних ћелијско-ћелијских интеракција и ко-стимулаторних сигнала карактеристичних за антиген-презентујућу активацију. У том контексту, резултати сугеришу да СМП превасходно модулише квалитативне аспекте Т-ћелијског одговора, а не његов интензитет.
- Показано је да оријентација магнетног поља представља важан биолошки параметар његовог имуномодулаторног дејства, при чему различити правци поља могу довести до различитих, па и супротних ефеката на продукцију појединих цитокина.
- Резултати указују на могућност селективне модулације Th1 и Th17 одговора (нпр. IFN- $\gamma$  и IL-17), као и цитокина фамилије TNF, без истовременог утицаја на пролиферацију Т лимфоцита, што упућује на потенцијал фино подешене имуне регулације применом СМП.

- Показано је да стално магнетно поље може утицати на продукцију проинфламаторних цитокина TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ , чије је плејотропно деловање кључно у патогенези бројних аутоимуних и инфламаторних болести. Ови налази отварају могућност да се СМП у будућности разматра као комплементарни или алтернативни приступ у модулацији TNF-зависних имуних одговора, потенцијално уз мањи ризик од системских нежељених дејстава у односу на фармаколошку TNF инхибицију.
- Иако је студија ограничена недостатком директних механистичких анализа, добијени резултати пружају снажан експериментални оквир за даља истраживања која би обухватила анализу транскрипционих фактора, сигналних каскада и епигенетских промена, као и испитивање потенцијалних *in vivo* ефеката.
- Клинички значај ових налаза огледа се у могућности селективне имуномодулације без индукције неконтролисане пролиферације Т лимфоцита, што је од посебног значаја у контексту аутоимуних и инфламаторних болести, као и у трансплантационој медицини тј. превенцији одбацавања трансплантата. Додатно, показано различито дејство оријентације магнетног поља указује на потенцијалну примену сталног магнетног поља као помоћне, нефармаколошке терапијске стратегије у комбинацији са имуносупресивним или имуномодулаторним лековима, са циљем смањења њихове дозе и токсичности. Ови резултати представљају основу за даља пре-клиничка и клиничка истраживања усмерена ка развоју безбедних и контролисаних приступа физикалној имуномодулацији.
- У целини, резултати ове дисертације значајно проширују постојећа сазнања о биолошким ефектима сталног магнетног поља, указујући да оно може деловати као селективни имуномодулатор чији ефекат зависи од интензитета, трајања и оријентације поља, као и од функционалног стања циљних ћелија. Ови налази отварају нове перспективе за развој неинвазивних и прецизно усмерених терапијских стратегија у лечењу инфламаторних и аутоимуних болести.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2021.
2. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 10th ed. New York: Garland Science; 2022.
3. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008;112(5):1557–1569.
4. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, et al. The burgeoning family of unconventional T cells. Nature Immunology. 2015;16(11):1114–1123.
5. Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. Immunol Rev 1996;153:47–83.
6. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. Immunological Reviews. 2009;229(1):5–11.
7. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Current Opinion in Immunology. 2010;22(3):333–340.
8. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology. 1989;7:145–173.
9. C 'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science. 2010;327(5969):1098–1102.
10. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. Annual Review of Immunology. 2010;28:445–489.
11. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. Immunity. 2004;21(6):733–741.
12. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell. 2000;100(6):655–669.
13. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Reviews Immunology. 2003;3(12):984–993.
14. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from Th1 and Th2 cells. Nature Immunology. 2005;6(11):1123–1132.
15. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology. 1989;7:145–173.
16. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Reviews Immunology. 2003;3(12):984–993.
17. Sallusto F. Heterogeneity of human CD4(+) T cells against microbes. Annu Rev Immunol. 2016;34:317–334.
18. Walker J.A, McKenzie A.N.J. TH2 cell development and function. Nat Rev Immunol. 2018;18:121–133.
19. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. Nat Rev Immunol. 2017;17:535–544.
20. McGeachy M.J, Cua D.J, Gaffen S.L. The IL-17 family of cytokines in health and disease. Immunity. 2019;50:892–906.
21. Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells. International Immunology. 2014;26(1):7–12.
22. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. Current Opinion in Immunology. 2008;20(2):149–157.

23. Steinman RM and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-62.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
25. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 2014;14:571-8..
26. Zhou LJ and Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;154:3821-35.
27. Hart DN, Starling GC, Calder VL, Fernando NJ. B7/BB-1 is a leucocyte differentiation antigen on human dendritic cells induced by activation. *Immunology* 1993;79:616-20.
28. Steinman RM and Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999;66:205-8.
29. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
30. Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999;20:200-3.
31. Hatrmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:9305-10.
32. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189:821-9.
33. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994;179:1331-6.
34. Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 2001;102:255-62.
35. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998;28:2760-9.
36. O'Sullivan and Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-κB. *J Immunol* 2002;168:5491-8.
37. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 2017;356:eaah4573
38. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 2018;154:3-20
39. Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD141+ (BDCA3)+ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1273-81.
40. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 2015;41:9-22.
41. Kaplan DH. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nat Immunol* 2017;18:1068-75.
42. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471-85.

43. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Collonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-23.
44. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nature Immunol* 2001;1:919-23.
45. Facchetti F, Candiago E, Vermi W. Plasmacytoid monocytes express IL-3-receptor alpha and differentiate into dendritic cells. *Histopathology* 1999;35:88-9.
46. Palucka KA, Taquet N, Sanches-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160:4587-95.
47. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
48. G Sallusto F and Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by GM-CSF plus IL-4 and downregulated by TNF- $\alpha$ . *J Exp Med* 1994;179:1109-18. .
49. Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998;187:961-6.
50. Pulendran C, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 2001;22:41-7.
51. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419–426.
52. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmunity Reviews*. 2008;7(7):550–557.
53. Marwaha AK, Tan S, Dutz JP. Targeting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Clinical Immunology*. 2014;153(1):1–8.
54. Honkanen J, Otonkoski T. Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2014;14(3):1–8.
55. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2006;25(3):383–392.
56. Adachi Y, Taketani S, Toki J et al, Marked increase in number of dendritic cells in autoimmune-prone (NZW x BXSB) F1 mice with age. *Stem cells* 2002;20:61-72.
57. Cooles FAH, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011;23(3):233–240.
58. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485–517.
59. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013;9(9):544–556.
60. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(2):174–180.
61. Benichou G, Yamada Y, Yun SH, Lin C, Fray M, Tocco G. Immune recognition and rejection of allografts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(1):a025619.
62. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunity*. 2007;27(3):402–41.

63. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. Interplay between dendritic cells and T cells in transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2007;12(4):332–337..
64. Schwartz RH. T cell anergy. *Annual Review of Immunology*. 2003;21:305–334.
65. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 2003;21:685–711.
66. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of IL-10–producing regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(9):1213–1222..
67. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in Immunology*. 2010;108:111–165.
68. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance. *Immunological Reviews*. 2010;236:219–242.
69. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349-56.
70. Lin Y, Vandeputte M, Waer M. Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J Immunol* 1997;158:5658-67.
71. Lin Y, Sobis M, Vandeputte M, Waer M. Mechanism of leflonomide-induced prevention of xenoantibody formation and xenograft rejection in the hamster to rat heart transplatation model. *Transplan Proc* 1995;27:305-6.
72. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685–711.
73. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(5):353–363.
74. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 1999;190:1155-64.
75. Hoffman RA, Langrehr JM, Billiar TR et al. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 1990;145:2220-6.
76. Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 1995;155:2858-65.
77. Holt PG, Oliver J, Bilyk N et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993;177:397-407.
78. Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require NF-κB. *Immunity*. 2002;16(2):257–270.
79. Huang FP, Niedbaja W, Wei XQ et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 1998;28:4062-70.
80. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 1998;188:2175-80.
81. Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesuni R, Lederman S, Suci-Foca N. T suppressor lymphocytes inhibit NF-κB-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 1999;163:68-92.
82. G.A.G. Bennet. *Electricity and Modern Physics*. Edward Arnold (UK) (1974, 2nd ed.). ISBN 0-7131-2459.8.

83. Durney, Carl H. and Johnson, Curtis C. Introduction to modern electromagnetics. McGraw-Hill (1969). ISBN 0-07-018388-0.
84. Tipler, Paul. Physics for Scientists and Engineers: Electricity, Magnetism, Light, and Elementary Modern Physics. W.H.Freeman (2004, 5th ed.). ISBN 0-7167-0810-0.
85. Reitz, John; Milford, Frederick; Christy, Robert. Foundations of Electromagnetic Theory. Addison Wesley (1992, 4th ed.). ISBN 0-201-52624-7.
86. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Non-Ionizing Radiation – Sources Biological Effects, Emissions and Exposures. Health Physics. 2003;74:494-522.
87. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Exposure to static and low frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (0-100 kHz). Matthes R, Mc Kinlay AF, Bernhardt JH, Vecchia P, Veyret B, eds. Oberschleissheim, Germany: ICNIRP; Publication 13/2003; 2003.
88. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields. Health Phys 2009;96(4):504–14.
89. World Health Organization. Environmental Health Criteria 232. Static fields. Geneva: World Health Organization; 2006.
90. M. S. Markov. Biological windows. Environmentalist 2005;25(2-4): 67–74.
91. R. Saunders. Static magnetic fields: animal studies. Progress in Biophysics and Molecular Biology 2005;87(2-3):225–39.
92. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Statement on EMF - emitting new technologies. Health Phys 2008;94:376–92.
93. Gowland PA. Present and future magnetic resonance sources of exposure to static fields. Prog Biophys Mol Biol. 2005;87:175–83.
94. Kinouchi Y, Yamaguchi Y, Tenforde TS. Theoretical analysis of magnetic field interactions with aortic blood flow. Bioelectromagnetics 1966;17:21–32.
95. Holden AV. The sensitivity of the heart to static magnetic fields. Prog Biophys Mol Biol 2005;87:289–320.
96. Crozier S, Liu F. Numerical evaluation of the fields induced by body motion in or near high-field MRI scanners. Prog Biophys Mol Biol 2005;87:267–78.
97. Schenck JF, Dumoulin CL, Redington RW, Kressel HY, Elliott RT, McDougall IL. Human exposure to 4.0-tesla magnetic fields in a whole-body scanner. Med Phys 1992;19:1089–98.
98. Chakeres DW, de Vocht R. Static magnetic field effects on human subjects related to magnetic resonance imaging systems. Prog Biophys Mol Biol 2005;87:255–65.
99. de Vocht F, van Drooge H, Engels H, Kromhout H. Exposure, health complaints and cognitive performance among employees of an MRI scanners manufacturing department. J Magn Reson Imaging 2006;23:197–204.
100. Glover PM, Bowtell R. Measurement of electric fields induced in a human subject due to natural movements in static magnetic fields or exposure to alternating magnetic field gradients. Phys Med Biol 2008;53:361–73.
101. Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. Physiol Rev 2000;80:555–92.
102. Grossman GE, Leigh RJ, Abel LA, Lanska DJ, Thurston SE. Frequency and velocity of rotational head perturbations during locomotion. Exp Brain Res 1988;70:470–6.
103. Pozzo T, Berthoz A, Lefort L. Head stabilisation during various locomotor tasks in humans. Exp Brain Res 1990;82:97–106.

104. MacDougall HG, Moore ST. Marching to the beat of the same drummer: the spontaneous tempo of human locomotion. *J Appl Physiol* 2005;99:1164–73.
105. Schenck JF. Safety of strong, static magnetic fields. *J Magn Reson Imaging* 2000;12:2–19.
106. Kirschvink JL, Walker MM, Diebel CE. Magnetite-based magnetoreception. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:462–7.
107. Valles JM Jr, Wasserman SR, Schweidenback C, Edwardson J, Denegre JM, Mowry KL. Processes that occur before second cleavage determine third cleavage orientation in *Xenopus*. *Exp Cell Res* 2002;274:112–8.
108. Ueno S, Iwasaka M. Properties of diamagnetic fluid in high gradient fields. *J Appl Phys* 1994;75:7177–80.
109. Schenck JF. Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;87:185–204.
110. Ichioka S, Minegishi M, Iwasaka M, Shibata M, Nakatsuka T, Harii K, Kamiya A, Ueno S. High-intensity static magnetic fields modulate skin microcirculation and temperature in vivo. *Bioelectromagnetics* 2000;21:183–8.
111. Schulten K. Magnetic field effects in chemistry and biology. *Adv Solid State Phys* 1982;22:61–83.
112. McLauchlan KA, Steiner UE. The spin-correlated radical pair as a reaction intermediate. *Molecular Phys* 1991;73:241–263.
113. Grissom CB. Magnetic field effects in biology—a survey of possible mechanisms with emphasis on radical-pair recombination. *Chemical Reviews* 1995;95:3–24.
114. Nagakura S, Hayashi H, Azumi T. Dynamic spin chemistry: magnetic controls and spin dynamics of chemical reactions. Tokyo and New York: Kodansha and John Wiley; 1998.
115. Hore PJ. Rapporteur’s report: sources and interaction mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;87:205–12.
116. Eveson RW, Timmel CR, Brocklehurst B, Hore PJ, McLauchlan KA. The effects of weak magnetic fields on radical recombination reactions in micelles. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1509–22.
117. Liu Y, Edge R, Henbest K, Timmel CR, Hore PJ, Gast P. Magnetic field effect on singlet oxygen production in a biochemical system. *Chem Commun (Camb)* 2005;2:174–6.
118. Ritz T, Adem S, Schulten K. A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys J* 2000;78:707–18.
119. Zhang X, Yarema KJ, Xu A. Magnetic field effects on cytoskeleton organization and cell division: recent advances. *Bioelectromagnetics*. 2017;38(6):420–430.
120. Hore PJ, Mouritsen H. The radical-pair mechanism of magnetoreception. *Annu Rev Biophys*. 2016;45:299–344.
121. Wang C, Zhang X, Wang J. Biological effects of static magnetic fields on cells: a review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):2540.
122. Bradlaugh AA, Fedele G, Munro AL, et al. Essential elements of radical pair magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature*. 2023;615:111–116.
123. Hopt TA, Cassell MD. Magnetic field effects on rodent behavior and vestibular system. *Front Neurol*. 2021;87:223–45.
124. Roberts DC et al. High-field MRI-induced behavioral responses in rodents. *J Neurosci Methods*. 2020;21:367–81.
125. Mian OS, Li Y, Antunes A, Glover PM, Day BL. On the vertigo due to static magnetic fields. *Curr Biol*. 2021;31(1):R11–R12.

126. Ward BK, Roberts DC, Della Santina CC, Carey JP, Zee DS. Magnetic vestibular stimulation: mechanisms and clinical implications. *Curr Opin Neurol.* 2022;35(1):96–102.
127. Nguyen J et al. Low-field static magnetic fields and cognitive behavior in rodents. *Neurosci Lett.* 2020;14:287–97.
128. Zhang X, Yarema KJ, Xu A. Static magnetic fields and neuronal activity: experimental evidence. *Bioelectromagnetics.* 2021;42(4):285–295.
129. Wang H et al. Effects of static magnetic fields on synaptic transmission. *Front Cell Neurosci.* 2022;67:746–9.
130. Keltner JR, Roos MS, Brakeman PR, Budinger TF. Magnetohydrodynamics of blood flow in MRI. *Magn Reson Med.* 2020;84(2):1013–1024.
131. Chakeres DW, de Vocht F. Static magnetic field effects on circulation and physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2021;163:11–22.
132. Gupta SK, Singh R, Kumar A. Cardiac electrophysiological effects under strong static magnetic fields. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2022;69(5):1723–1731.
133. Kangarlu A, Robitaille PM. Biological effects and safety aspects of high-field MRI. *Magn Reson Imaging.* 2021;77:1–9.
134. Li Q, Chen G, Wang L. Blood flow dynamics under static magnetic fields. *Sci Rep.* 2020;10:12345.
135. Zhang L, Li H, Sun X. Hemodynamic responses to magnetic exposure in rats. *Physiol Meas.* 2022;43(3):035002.
136. Sikov MR, Mahlum DD, Montgomery LD, Decker JR. Development of mice after intrauterine exposure to direct-current magnetic fields. In: Phillips, RD, Gillis MF, Kaune WT, Mahlum DD, eds. *Biological effects of extremely low frequency electromagnetic fields, proceedings of the 18th Hanford Life Sciences Symposium.* Springfield, VA: National Technical Information Service; 1979: 462–473.
137. Konermann G, Monig H. Studies on the influence of static magnetic fields on prenatal development of mice. *Radiologe* 1986;26:490–7.
138. Okazaki R, Ootsuyama A, Uchida S, Norimura T. Effects of a 4.7 T static magnetic field on fetal development in ICR mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 2001;42:273–83.
139. Murakami J, Torii Y, Masuda K. Fetal development of mice following intrauterine exposure to a static magnetic field of 6.3 T. *Magn Reson Imaging* 1992;10:433–7.
140. Fedele G, Edwards MD, Bhutani S. Biological effects of magnetic fields: mechanisms and health impact. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4680.
141. SCHEER (EU Scientific Committee). *Health effects of static magnetic fields – update.* 2023; ISBN: 978-92-76.
142. de Vocht F, Stevens T, Glover P, et al. Cognitive effects of static magnetic fields: a review. *Occup Environ Med.* 2021;78(6):428–436.
143. Chakeres DW, Kangarlu A. Thermal and physiological effects of MRI exposure. *Magn Reson Imaging.* 2020;68:1–6.
144. Theysohn JM, Kraff O, Eilers K, et al. Subjective and objective effects of 9.4 T MRI on humans. *Magn Reson Med.* 2021;85(1):392–403.
145. Heinrich A, Szostek A, Meyer P. Cognitive performance in high magnetic fields. *Neuroimage.* 2020;220:117080.
146. Roberts DC, Marcelli V, Gillen JS, et al. MRI magnetic field stimulates vestibular system. *Curr Biol.* 2020;30(2):333–338.

147. Mian OS, Li Y, Antunes A, et al. The magnetic field of a 7 T MRI scanner induces vestibular stimulation and nystagmus in humans. *J Physiol*. 2020;598(23):5501–5515.
148. Ward BK, Roberts DC, Della Santina CC, Carey JP. Magnetic vestibular stimulation in humans: implications for MRI safety and neuroscience. *J Neurophysiol*. 2021;125(2):371–383.
149. Zu Eulenburg P, Caspers S, Roski C, Eickhoff SB. Meta-analysis of vestibular processing. *Neuroimage*. 2021;226:117612.
150. Glover PM, Cavin I, Qian W, Bowtell R, Gowland PA. Magnetic-field-induced vertigo: mechanisms. *Magn Reson Med*. 2022;87(3):1657–1668.
151. Ghadimi Moghadam A., Mortazavi S.M.J., Hosseini Moghadam A., Haghani M., Taeb S., Hosseini M.A., Rastegariyan N., Arian F., Sanipour L., Aghajari S., et al. Does Exposure to Static Magnetic Fields Generated by Magnetic Resonance Imaging Scanners Raise Safety Problems for Personnel? *J. Biomed. Phys. Eng*. 2018;8:333–336.
152. Markov MS. Magnetic field therapy: a review. *Electromagn Biol Med*. 2007;26(1):1-23.
153. Raylman R.R., Clavo A.C., Wahl R.L. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. *Bioelectromagnetics*. 1996;17:358–363.
154. Ghodbane S et al. Bioeffects of static magnetic fields: oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:602987. doi: 10.1155/2013/602987. Epub 2013 Aug 6.
155. Aldinucci C., Garcia J.B., Palmi M., Sgaragli G., Benocci A., Meini A., Pessina F., Rossi C., Bonechi C., Pessina G.P. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2003;24:109–117. doi: 10.1002/bem.10071.
156. Salerno S et al. Static magnetic fields generated by a 0.5 T MRI unit affects in vitro expression of activation markers and interleukin release in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Int J Radiat Biol*. 1999;75(4):457-63.
157. Djordjevich DM et al. Hematological parameters' changes in mice subchronically exposed to static magnetic fields of different orientations. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;81:98-105.
158. Gray J.R, Frith C.H, Parker J.D. In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields. *Bioelectro-magnetics* 2000;21(8):575–8.
159. Tofani S, Barone D, Berardelli M et al. Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cisplatin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma. *Pharmacological Research* 2003;48(1):83–90.
160. Sun R.G, Chen W.F, Qi H et al. Biologic effects of SMF and paclitaxel on K562 human leukemia cells. *General Physiology and Biophysics* 2012;31(1)1–10.
161. Strieth S, Strelczyk D, Eichhorn M.E et al. Static magnetic fields induce blood flow decrease and platelet adherence in tumor microvessels. *Cancer Biology&Therapy* 2008;7(5):814–9.
162. Onodera H, Jin Z, Chida S, Suzuki Y, Tago H, Itoyama Y. Effects of 10 T static magnetic field on human peripheral blood immune cells. *Radiat Res* 2003;159(6):775-9.
163. Vergallo C., Dini L., Szamosvölgyi Z., Tenuzzo B.A., Carata E., Panzarini E., László J.F. In vitro analysis of the anti inflammatory effect of inhomogeneous static magnetic field exposure on human macrophages and lymphocytes. *PLoS ONE*. 2013;8:e72374. doi: 10.1371/journal.pone.0072374.

164. O'shea J.J., Paul W.E. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science*. 2010;327:1098–1102. doi: 10.1126/science.1178334.
165. Boulch M., Cazaux M., Cuffel A., Ruggiu M., Allain V., Corre B., Loe-Mie Y., Hosten B., Cisternino S., Auvity S., et al. A major role for CD4+ T cells in driving cytokine release syndrome during CAR T cell therapy. *Cell Rep. Med.* 2023;4:101161. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101161.
166. Mangelinck A., Dubuisson A., Becht E., Dromaint-Catesson S., Fasquel M., Provost N., Walas D., Darville H., Galizzi J.-P., Lefebvre C., et al. Characterization of CD4+ and CD8+ T cells responses in the mixed lymphocyte reaction by flow cytometry and single cell RNA sequencing. *Front. Immunol.* 2024;14:1320481. doi: 10.3389/fimmu.2023.1320481.
167. Lin C.T., Lee S.Y., Chen C.Y., Chen C.A., Lin C.P., Huang H.M. Long term continuous exposure to static magnetic field reduces polysaccharide induced cytotoxicity of fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84:219–226. doi: 10.1080/09553000801902158.
168. Salerno S., La Mendola C., Casto A.L., Mamone G., Caccamo N., Cardinale A.E., Salerno A. Reversible effect of MR and ELF magnetic fields (0.5 T and 0.5 mT) on human lymphocyte activation pattern. *Int. J. Radiat. Biol.* 2006;82:77–85. doi: 10.1080/09553000600589131.
169. Lagaraine C, Lebranchou Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation* 2003;75:37S-42.
170. Sue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, Cyclosporin A, and dexamethasone) on dendritic cell-T interaction during antigen presentation. *J Immunol* 2002;169:3555-64.
171. Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. *Front Immunol* 2018;9:350.
172. Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1996;157:3850-9.
173. Lardon F, Snoeck HW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, Lenjou M, Henckaerts E, Boeckxtaens CJ, Vandenabeele P, Kestens LL, Van Bockstaele DR, Vanham GL. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology* 1997;91:553-9.
174. Jansen JH, Eientjens GJHM, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* 1989;170:577-82.
175. Te Velde AA, Klomp JP, Yard BA, de Vries JE, Figdor CG. Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4. *J Immunol* 1988;140:1548-54.
176. Heystec HC, Mudde GC, Ohler R, Kalthoff FS. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) has opposing effects on the capacity of monocyte versus monocyte-derived dendritic cells to stimulate the antigen-specific proliferation of a human T cell clone. *Clin Exp Immunol* 2000;120:440-7.
177. Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rossner S, Rollinghoff M, Schuler G, Gessner A. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol* 2002;169:3574-80.

178. Verdijk, P., van Veelen, P. A., de Ru, A. H., Hensbergen, P. J., Mizuno, D., Kooyk, Y., Ossendorp, F. Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 1999;163(1):57–61.
179. Colić, M., Stojić-Vukanić, Z., Pavlović, M., & Rakić, L. Immunostimulatory cofactor in vitro. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14(2):187–193.
180. Dzopalić, T., Rajković, J., Dragicević, A., Colić, M., & Božić, B. Dose dependent response of human monocyte-derived dendritic cells to 7-thia-8-oxo-guanosine. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012;237(10):1123–1133.
181. Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., & Ricciardi Castagnoli, P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 1998;188(11):2175–2180.
182. Kawai, T., & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373–384.
183. Colić, M., Pavlović, M., & Rakić, L. Nucleoside analogues as immunomodulators: Effects on antigen-presenting cells. *Immunopharmacology* 1997;35(3):231–239.
184. Caskey, M., Lefebvre, F., Filali-Mouhim, A., Cameron, M. J., Goulet, J.P., Haddad, E. K., Sekaly, R.P. Synthetic double stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 2011;208(12):2357–2366.
185. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557–1569.
186. Foletti A, Grimaldi S, Lisi A, et al. Magnetic fields and immune system: a review. *Electromagn Biol Med*. 2013;32(2):208–220.
187. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255–258.
188. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 2002;23(9):445–449.
189. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685–711.
190. Rosen A.D. Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. *Cell Biochem. Biophys*. 2003;39:163–174. doi: 10.1385/CBB:39:2:163.
191. Sadri M., Abdolmaleki P., Abrun S., Beiki B., Samani F.S. Static Magnetic Field Effect on Cell Alignment, Growth, and Differentiation in Human Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell. Mol. Bioeng*. 2017;10:249–262. doi: 10.1007/s12195-017-0482-y.
192. Ozer TE H, Ozbalkan Z. Clinical Efficacy of TNF- $\alpha$  Inhibitors: An Update. *Int J Clin Rheumatol* 2010;5(1):101-15.
193. Keyser McCluggage L. Safety of TNF inhibitors in adolescents and children. *Adolesc Health Med Ther* 2011;2:1–8.
194. Lona JM F et al. Tumor necrosis factor alfa in cardiovascular diseases: Molecular biology and genetics. *Gac Med Mex* 2013;149(5):521-30.
195. Fechtbaum M et al. Certolizumabpegol in rheumatoid arthritis: current update. *Expert Opin Biol Ther* 2014 Mar 22 (Epub ahead of print) PMID: 24654999.
196. Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:787–819.
197. Browning JL. Inhibition of the lymphotoxin pathway as a therapy for autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2008;223:202–220.

198. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012;119(3):651–665.
199. Ghibelli L, Cerella C, Cordisco S, Clavarino G, Marazzi S, De Nicola M, Nuccitelli S, D'Alessio M, Magrini A, Bergamaschi A, et al. NMR exposure sensitizes tumor cells to apoptosis. *Apoptosis*. 2006;11:359–365. doi: 10.1007/s10495-006-4001-1.
200. Kim E., Park J., Noh G., Park S., Noh K., Kwon I., Ahn S. Effects of moderate intensity static magnetic fields on osteoclastic differentiation in mouse bone marrow cells. *Bioelectromagnetics*. 2018;39:394–404. doi: 10.1002/bem.22126.
201. Vergallo C., Dini L., Szamosvölgyi Z., Tenuzzo B.A., Carata E., Panzarini E., László J.F. In vitro analysis of the anti-inflammatory effect of inhomogeneous static magnetic field exposure on human macrophages and lymphocytes. *PLoS ONE*. 2013;8:e72374. doi: 10.1371/journal.pone.0072374.
202. Zhang L., Yang X.X., Liu J.J., Luo Y., Li Z.Y., Ji X.M., Wang W.C., Zhang X. 1 T moderate intensity static magnetic field affects Akt/mTOR pathway and increases the antitumor efficacy of mTOR inhibitors in CNE-2Z cells. *Sci. Bull.* 2015;60:2120–2128. doi: 10.1007/s11434-015-0950-5.
203. Schiffer I.B., Schreiber W.G., Graf R., Schreiber E.M., Jung D., Rose D.M., Hehn M., Gebhard S., Sagemüller J., Spieß H.W., et al. No influence of magnetic fields on cell cycle progression using conditions relevant for patients during MRI. *Bioelectromagnetics*. 2003;24:241–250. doi: 10.1002/bem.10097.
204. Strelczyk D., Eichhorn M.E., Luedemann S., Brix G., Dellian M., Berghaus A., Strieth S. Static magnetic fields impair angiogenesis and growth of solid tumors in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 2009;8:1756–1762. doi: 10.4161/cbt.8.18.9294.
205. Tian X., Wang D., Zha M., Yang X., Ji X., Zhang L., Zhang X. Magnetic field direction differentially impacts the growth of different cell types. *Electromagn. Biol. Med.* 2018;37:114–125. doi: 10.1080/15368378.2018.1458627
206. Raylman R.R., Clavo A.C., Wahl R.L. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. *Bioelectromagnetics*. 1996;17:358–363.
207. Wang J., Xiang B., Deng J., Freed D.H., Arora R.C., Tian G. Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose Derived Stem Cells by Seven Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7168175.
208. Wiskirchen J., Grönewäller E.F., Heinzelmann F., Kehlbach R., Rodegerdts E., Wittau M., Rodemann H.P., Claussen C.D., Duda S.H. Human Fetal Lung Fibroblasts: In Vitro Study of Repetitive Magnetic Field Exposure at 0.2, 1.0, and 1.5 T. *Radiology*. 2000;215:858–862. doi: 10.1148/radiology.215.3.r00jn11858.
209. Zhao G.C., Zhao Y., Zhu L. Effects of 13T Static Magnetic Fields (SMF) in the Cell Cycle Distribution and Cell Viability in Immortalized Hamster Cells and Human Primary Fibroblasts Cells. *Plasma Sci. Technol.* 2010;12:123–128.
210. Мураев А.А., Манукян Г.Г., Салех К.М., Бонарцев А.П., Волков А.В. Magnetic field application in bone tissue regeneration: Issue current status and prospects for method

- development. Вестник Российского университета дружбы народов. Медицина. 2024;28:9–22.
211. Zhu S., Xu L., Zhang Y., Zheng Z., Lang Z., Zhang Q., Gao J., Ye M., Xu R.X. Magnetically Controlled Strategies for Enhanced Tissue Vascularization. *Adv. Funct. Mater.* 2024;2401856. doi: 10.1002/adfm.202401856.
  212. Sun Y., Fang Y., Li X., Li J., Liu D., Wei M., Liao Z., Meng Y., Zhai L., Yokota H., et al. A static magnetic field enhances the repair of osteoarthritic cartilage by promoting the migration of stem cells and chondrogenesis. *J. Orthop. Transl.* 2023;39:43–54. doi: 10.1016/j.jot.2022.11.007.
  213. Shang W., Chen G., Li Y., Zhuo Y., Wang Y., Fang Z., Yu Y., Ren H. Static Magnetic Field Accelerates Diabetic Wound Healing by Facilitating Resolution of Inflammation. *J. Diabetes Res.* 2019;2019:5641271. doi: 10.1155/2019/5641271.
  214. Strelczyk D., Eichhorn M.E., Luedemann S., Brix G., Dellian M., Berghaus A., Strieth S. Static magnetic fields impair angiogenesis and growth of solid tumors in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 2009;8:1756–1762. doi: 10.4161/cbt.8.18.9294.
  215. Zhang L, Zhang C, Liu Y, et al. Inhibition of viability, proliferation, cytokines secretion, surface antigen expression, and adipogenic and osteogenic differentiation of adipose derived stem cells by seven day exposure to 0.5T static magnetic fields. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):28.
  216. Zhang L., Ji X., Yang X., Zhang X. Cell type- and density dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. *Oncotarget.* 2017;8:13126–13141. doi: 10.18632/oncotarget.14480.
  217. Li Y, Zhang H, Wang Y, Zhang Y, Liu C, Liu L. Static magnetic field suppresses osteoclast differentiation by inhibiting RANKL-induced expression of c-Fos and NFATc1 in mouse bone marrow-derived macrophages. *Bioelectromagnetics.* 2018;39(5):394–404. doi:10.1002/bem.22115. PMID: 29709064.
  218. Djordjevic D.M., De Luka S.R., Milovanovich I.D., Jankovic S., Stefanovic S., Veskovc-Moracanin S., Cirkovic S., Ilic A.Ž., Ristic-Djurovic J.L., Trbovic A.M. Hematological parameters' changes in mice subchronically exposed to static magnetic fields of different orientations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012;81:98–105. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.04.025.
  219. Milovanovich I.D., Ćirković S., De Luka S.R., Djordjevic D.M., Ilić A., Popović T., Arsić A., Obradović D.D., Oprić D., Ristić-Djurović J.L., et al. Homogeneous static magnetic field of different orientation induces biological changes in subacutely exposed mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016;23:1584–1597. doi: 10.1007/s11356-015-5109-z.
  220. Zhu J., Yamane H., Paul W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:445–489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.

**Резултати приказани у дисертацији су објављени у следећем чланку:**

**Turuntaš V**, de Luka S, Ristić-Đurović JL, Ćirković S, Đorđević D, Ristić S, Lalović N, Marić V, Lazić B, Joksimović B, Stanojević I, Vasilijić S, Trbovich AM. **The effect of static magnetic fields of different strengths and polarities on cytokine production by human lymphocytes in vitro.** Bioengineering (Basel). 2024;11(8):749.  
doi:10.3390/bioengineering11080749

**БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА**

Владимир Турунташ је рођен 05.07.1977. године у Сарајеву, где је завршио основну школу. Гимназију је похађао у избеглиштву у Шапцу и Сокоцу. Дипломирао је 22. 9. 2003. године на Медицинском факултету Универзитета у Источном Сарајеву, као прворангирани стипендиста Владе Републике Српске, са просечном оценом 9,4. Током студија се бавио научно-истраживачким радом и активно учествовао на 5 домаћих и иностраних конгреса, међу којима су и два најпрестижнија у Каиру и Берлину.

Специјализирао је педијатрију у фебруару 2010. године, на матичном факултету, а након обављеног стажа у Универзитетској дечијој клиници, Београд.

У склопу израде магистарског рада боравио је шест месеци на Институту за медицинска истраживања, ВМА, Београд, код академика проф. др Миодрага Чолића, где је обавио експериментални део за магистарску тезу: „Ефекат статина на функцију Т лимфоцита *in vitro*“. Магистарску тезу је одбранио у новембру 2012. године на матичном факултету.

У априлу 2015. године положио је субспецијалистички испит из алергологије на Медицинском факултету Универзитета у Београду.

У јуну 2015. године, полажући испит из алергологије и клиничке имунологије на „European Academy of Allergy and Clinical Immunology“, стиче звање *Excellence in Allergy and Clinical Immunology*, као прва и једина особа у региону (BiH, Srb, Cro, MN) која је стекла то звање.

У септембру 2015. године пријавио је докторску тезу под називом „Дејство сталног магнетног поља на функцијске карактеристике хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви *in vitro*“ на Медицинском факултету Универзитета у Београду.

Од септембра 2005. године до августа 2024 године радио је као асистент, првобитно на предмету физиологија, а затим педијатрија Медицинског факултета у Источном Сарајеву, као и педијатар односно алерголог у Универзитетској болници Фоча. Од августа 2024 године ради као педијатар и алерголог у Опћој болници Сарајево и као асистент из педијатрије на *Sarajevo School of Science and Technology*.

У склопу свог интересовања за имунологију и алергологију, као члан „European Academy of Allergy and Clinical Immunology – EAACI“, активно је учествовао на:

- 5th EAACI-GA2LEN Allergy School, Athens University, Greece, 2010
- EAACI Allergy School “Diagnostic Approaches to the Allergic Patient”, Kusadasi, Turkey, 2010
- 30th European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 2011, Istanbul, Turkey, са радом „Autoinflammatory Diseases“

- EAACI Allergy School "Clinical impact and mechanisms of infections in Allergy", 2011, Edinburgh University, United Kingdom
- Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2011, Barcelona, Spain, са радом „Autoinflammatory disorders – case report and review of literature“
- 31th European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 2012, Geneva, Switzerland, са добијеном стипендијом од стране EAACI и са радом „Effects of atorvastatin on relevant functions of human T lymphocytes in vitro“
- World Allergy & Asthma Congress, June 2013, Milan, Italy, са радом "In vitro effects of atorvastatin on function, proliferation and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells"
- Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2013, October, Athens, Greece, са радом "In vitro effects of atorvastatin on function, proliferation and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells"
- EAACI Congress 2014, June, Copenhagen, Denmark, са радом "Effects of long-term low strength static magnetic field exposure on Th polarization in vitro"
- EAACI Congress 2015, June, Barcelona, Spain, са радом "Immunomodulatory effects of long-term low strength static magnetic field exposure on human T lymphocytes function in vitro"
- Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2017, London, United Kingdom
- Asthma in Practice 2017, King's College, London, England
- 2018 European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, May 2018, Munich, Germany
- Allergy School on Immunotherapy in children for the treatment of respiratory and food allergy, September 2018, Barcelona, Spain
- Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2019, Florence, Italy
- EAACI Congress 2020, June, London, United Kingdom
- EAACI Congress 2025, June, Glasgow, United Kingdom, са оралном презентацијом рада: Chronic Rhinosinusitis – still underdiagnosed disease.

У склопу "European School of Neuroimmunology" похађао је:

- 7th ESNI Course, September 2007, Oxford University, United Kingdom, са стипендијом добијеном од Универзитета у Оксфорду
- 9th ESNI Course, September 2009, Bosphorus University, Istanbul, Turkey

Током медицинске едукације похађао је или био укључен у следећим активностима:

- Интернационални постдипломски курс: "The Course of the Continuing Medical Education – How to write a scientific paper: from the idea until the paperwork is done." by Prof. dr Eugenio Picano, Pisa, Italy, 2003
- Пројекат Tempus: "European Management Project for BiH Universities", у склопу кога је у фебруару 2004. године боравио на тренинг сесији: "How to restructure Curricula in the line with the Bologna Declaration", Aalen University, Germany
- "International PhD Summer Course, FORTH Institute, Crete, Greece, 2005", са тематиком: "Medical databases, Health Systems Architecture"

- “European PhD Summer Course, Neural prosthesis“, Kotor, 2005, у организацији Aalborg University, Denmark
- BSACI Global Online Allergy Symposium 26th January 2024 (WAO, AAAAI, EAACI, BSACI global collaboration)

Научни чланци објављени у часописима индексираним од стране Current Contents:

1. Turuntas V, De Luka SR et all. The Effect of Static Magnetic Fields of Different Strengths and Polarities on Cytokine Production by Human Lymphocytes In Vitro; Bioengineering, 2024, 11(8), 749; <https://doi.org/10.3390/bioengineering11080749>
2. Stankovic MS, Turuntas V, De Luka SR, Jankovic S, Stefanovic S, Puskas N, Zaletel I, Milutinović-Smiljanic S, Trbovich AM. Effects of Il-33/St2 pathway on alteration of iron and hematological parameters in acute inflammation. Exp Mol Pathol. 2015 Dec;99(3):687-92
3. Turuntas V. Autoinflammatory diseases: case report and a review of the literature. Allergy 2011;66(s94):491-2
4. Turuntas V, Colic M, Vasilic S. Effects of atorvastatin on relevant functions of human T lymphocytes in vitro. Allergy 2012;67(s96):161-2
5. Turuntas V, De Luka SR, Trbovich AM, Vasilijic S. Effects of long-term low strength static magnetic field exposure on Th polarization in vitro. Allergy 2014;69(s99):201-2
6. Turuntas V, De Luka SR, Trbovich AM, Vasilijic S. Immunomodulatory effects of long-term low strength static magnetic field exposure on human T lymphocytes function in vitro. Allergy 2015;70(s101):160-1

Научни чланак објављен у часопису индексираним од стране Medline:

1. Medenica-Milanovic S, Ristic S, Turuntas V, Miric M, Kulic M. Registration and analysis of bioelectric activity of sensory-motor cortex during the electrical stimulation of nucleus caudate in rats. Bosn J Basic Med Sci. 2007 May;7(2):155-61
2. Krsmanović L, Turuntaš V, Šolaja S. Orbital complications of acute rhinosinusitis in children: Case study. Biomedicinska istraživanja. 2020; Vol 11, Issue 1. DOI: 10.5937/bii2001096k

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Владимир Турунташ

Изјављујем

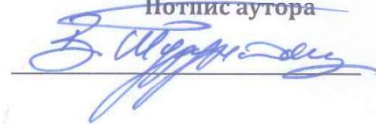
да је докторска дисертација под насловом:

**Дејство сталног магнетског поља на функцијске карактеристике хуманих моноклеарних ћелија периферне крви *in vitro***

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге 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.

У Београду, 03.07.2026. године

Потпис аутора



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

**Име и презиме аутора:** Владимир Турунзаш

**Студијски програм:** Докторат према ранијим прописима

**Наслов рада:** Дејство сталног магнетског поља на функцијске карактеристике хуманих моноклеарних ћелија периферне крви *in vitro*

**Ментори:** Проф. Др Силвио Де Лука, Научни саветник, др Саша Василијић

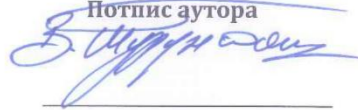
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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.

У Београду, 03.07.2026. године

Потпис аутора



Прилог 3.

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Дејство сталног магнетског поља на функцијске карактеристике хуманих моноклеарних ћелија периферне крви *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 03.07.2026. године

Потпис аутора  
