

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Mirjana M. Nacka-Aleksić**

**POLNE RAZLIKE U PATOGENEZI  
EKSPERIMENTALNOG  
AUTOIMUNSKOG  
ENCEFALOMIJELITISA KOD PACOVA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY**

**Mirjana M. Nacka-Aleksić**

**SEX DIFFERENCES IN THE  
PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL  
AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS  
IN THE RAT**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2016**

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

Dr sc. Ivan Pilipović, naučni saradnik,  
Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“,  
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

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

*Eksperimenti prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji urađeni su u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Laposavić i dr sc. Ivana Pilipovića, u okviru projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: Imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

## REZIME

Multipla skleroza (MS) se, kao i većina drugih autoimunskih bolesti, češće javlja kod žena nego kod muškaraca. Polni dimorfizam je zapažen i u kliničkom ispoljavanju MS-e. Kod muškaraca se bolest javlja kasnije, motorni ispadi su teži i primarno progresivni tok češći nego kod žena. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je animalni model MS-e, koji se kod osetljivih oglednih životinja izaziva različitim indukcionim protokolima. Podaci vezani za polni dimorfizam u kliničkoj prezentaciji EAE-a su relativno oskudni, a postojeći inkonzistentni, pre svega zbog genetskih razlika između korišćenih životinjskih vrsta i sojeva, ali i varijacija u indukcionim protokolima. Hronobiološko starenje organizma uključuje i promene u imunskom sistemu koje karakteriše značajan porast autoimunskih fenomena. Uprkos tome, incidenca mnogih autoimunskih bolesti, uključujući i MS-u, se smanjuje kod starih. Podaci o osetljivosti starih oglednih životinja na indukciju EAE-a su heterogeni, u zavisnosti od vrste i soja oglednih životinja, kao i od modela EAE-a. Mehanizmi koji stoje u osnovi manje incidence autoimunskih bolesti kod starih jedinki nisu u potpunosti razjašnjeni. Još su manje poznati mehanizmi polnog dimorfizma u razvoju ovih bolesti kod starih životinja, a posebno u čemu se oni razlikuju u odnosu na mehanizme odgovorne za ovaj fenomen kod mladih životinja.

Ciljevi ove doktorske disertacije su bili da se: 1) ispituju polne razlike u kliničkim parametrima indukovane autoimunske neuroinflamacije, kao važne patogenetske komponente MS-e, na modelu aktivnog EAE-a, kod mladih adultnih (uzrast 3 meseca) i starih (uzrast 22-26 meseci) pacova Dark Agouti soja i 2) identifikuju ćelijski i molekularni mehanizmi odgovorni za uočene polne razlike.

Dobijeni rezultati su pokazali postojanje polnog dimorfizma u incidenci i težini EAE-a i kod mladih i kod starih pacova. Incidenca EAE-a je kod pacova oba uzrasta bila manja kod mužjaka nego kod ženki, s tim što su mladi mužjaci, za razliku od starih, imali teži neurološki deficit u odnosu na ženke odgovarajućeg uzrasta.

Nezavisno od uzrasta, teži neurološki deficit na vrhuncu bolesti je korelirao sa sledećim nalazima: (i) većim brojem ukupnih i reaktivisanih CD4<sup>+</sup> T-ćelija u kičmenoj moždini (KM); (ii) većom ekspresijom iRNK za interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , IL-23/podjedinica p19, citokine koji usmeravaju diferencijaciju CD4<sup>+</sup> pomoćničkih T- (*engl.* T helper, Th) limfocita u smeru ćelija koje sekretuju IL-17 (Th17 ćelije), u mononuklearnim ćelijama KM-e i, sledstveno, većom procentualnom zastupljenošću Th17 ćelija u okviru populacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita i (iii) jačom aktivacijom mijeloidnih ćelija (sudeći na osnovu gustine površinske ekspresije CD45 i CD11b molekula) i većom ekspresijom iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama KM-e. Osim toga, bez obzira na uzrast, neurološki deficit je bio teži kod pacova kod kojih je nađena veća procentualna zastupljenost izrazito patogenih ćelija koje ko-eksprimiraju IL-17<sup>+</sup> i interferon (IFN)- $\gamma$ <sup>+</sup> u okviru Th17 ćelija. Budući da se smatra da je za izrazitu patogenost IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 limfocita odgovoran faktor koji stimuliše kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), veća ekspresija iRNK za ovaj citokin u mononuklearnim ćelijama KM-e pacova sa težim neurološkim deficitom (mladi mužjaci, odnosno stare ženke), je bila u skladu sa prethodnim nalazom. S obzirom na to da se starenjem kod ženki procentualna zastupljenost Th17 ćelija nije menjala u okviru CD4<sup>+</sup> T-ćelija, dok se ona kod mužjaka dramatično smanjila, tako da kod starih životinja dolazi do inverzije smeru polnog dimorfizma u ovom parametru u odnosu na mlade pacove, može se zaključiti da starenje na polno dimorfan način utiče na Th17 imunski odgovor u KM-i. U prilog tome ide i činjenica da se starenjem kod mužjaka značajno više smanjuje procenat IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u okviru Th17 limfocita nego kod ženki. S druge strane, iako se procenat IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita (Th1 ćelije) starenjem smanjivao i kod mužjaka i kod ženki, njihova procentualna zastupljenost je ostala veća kod ženki. Prema tome, može se zaključiti da starenje selektivno, na polno dimorfan način, utiče na Th17 imunski odgovor.

Nezavisno od uzrasta, u induktivnoj fazi bolesti, na nivou drenirajućeg limfnog čvora, kod mužjaka pacova u odnosu na ženke odgovarajućeg uzrasta, uočene su sledeće razlike: (i) manji procentualni porast u zastupljenosti aktivisanih ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita; (ii) manji *in vitro*

proliferativni odgovor CD4<sup>+</sup> limfocita na stimulaciju baznim proteinom mijelina (*engl.* myelin basic protein, MBP), što se moglo povezati sa efikasnijom supresorskom aktivnošću regulatornih ćelija i (iii) manja sekrecija IL-17 i IFN- $\gamma$ , citokina koji su ključni za patogenezu EAE-a, u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora koje su stimulisane MBP-om. Ovi podaci ukazuju da, suprotno očekivanjima na osnovu analize KM-e, ne samo stari nego i mladi mužjaci razvijaju slabiji imunski odgovor u drenirajućem limfnom čvoru na antigene singene KM-e u poređenju sa ženka odgovarajućeg uzrasta. Diskrepancija u broju CD4<sup>+</sup> T-ćelija koji su infiltrirale KM-u u odnosu na jačinu imunskog odgovora na periferiji, kod mladih životinja, mogla bi se pripisati polnim razlikama u mehanizmima koji kontrolišu migraciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u KM-u (npr. ekspresija hemokina i/ili odgovarajućih receptora) i njihovu reaktivaciju u ovom organu. S druge strane, s obzirom na to da je kod mladih životinja smer polnog dimorfizma u težini EAE-a, korelirao sa smerom polnog dimorfizma u ukupnom broju CD4<sup>+</sup> T-ćelija i njihovom fenotipu u KM-i, može se zaključiti da ciljni organ ima determinativnu ulogu u određivanju težine neurološkog deficita u EAE-u. Diskrepancija u smeru polnog dimorfizma u jačini imunskog odgovora u drenirajućem limfnom čvoru i ukupnom broju CD4<sup>+</sup> T-ćelija koje su infiltrirale KM-u se gubila starenjem. Ovo, zajedno sa prethodno opisanim rezultatima, sugerise da starenje utiče na polni dimorfizam u težini EAE-a, tako što dovodi do polno specifičnih promena na nivou KM-e, koje utiču na migraciju encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-ćelija u ciljni organ, njihovu reaktivaciju, diferencijaciju u ćelije Th17 fenotipa, kao i na plastičnost Th17 ćelija, u smislu njihove diferencijacije u izrazito patogenu IL-17+IFN- $\gamma$ + subpopulaciju.

Nalazi do kojih se došlo u ovim istraživanjima su značajni ne samo za razumevanje patogeneze EAE-a, posebno mehanizama koji determinišu težinu bolesti, već i polnih razlika u CD4<sup>+</sup> limfocitima posredovanom imunskom odgovoru. Iako direktna translacija rezultata dobijenih u eksperimentalnim ispitivanjima u kliničku praksu nije moguća, dobijeni rezultati svakako predstavljaju dobru osnovu za bolje za razumevanje polnih/uzrasnih razlika, kao i razlika u terapijskom odgovoru bolesnika sa MS-om, a moguće i za razmišljanje o opravdanosti terapijskih pristupa koji bi bili polno/uzrasno specifični.

**Ključne reči:** polni dimorfizam, polni diergizam, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, starenje, CD4+ T-limfociti.

**Naučna oblast:** Farmacija.

**Uža naučna oblast:** Farmakologija-Imunofarmakologija.

**UDK broj:** 616.832:616-021.6 (043.3).



## Summary

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common organ-specific autoimmune diseases of the central nervous system. As in other autoimmune diseases, the prevalence of MS is higher in women than in men. The clinical manifestations of MS are also sexually dimorphic. Men exhibit later onset of the disease, more severe motor symptoms and primary progressive course more often than women. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model induced in susceptible strains of animals. Data on sexual dimorphism in the clinical presentation of EAE are limited and inconsistent, reflecting, most likely, the differences in the genetic background of the experimental animals and the induction protocols. Chronobiological ageing of the organism is accompanied by ageing of the immune system. Immunosenescence is characterized by an increase in autoimmune phenomena. However, despite this phenomenon, the incidence of many autoimmune diseases, including MS, declines with ageing. Data on the influence of aging on the incidence and severity EAE are inconsistent. Additionally, data on sex differences in the clinical presentation of EAE in aged animals are extremely limited.

The aim of the study was to 1) investigate sex differences in the incidence and severity of autoimmune neuroinflammation, an important pathogenetic component of MS, on an active EAE model in 3-month-old (young adult) and 22-26-month-old (aged) Dark Agouti rats and 2) identify the cellular and molecular mechanisms behind the observed sex differences. Irrespective of age, the incidence of EAE was lower in male than in age-matched female rats. However, contrary to aged male rats, young male rats, which developed clinically manifested disease, exhibited more severe motor deficit than the age-matched female rats.

Irrespective of age, at the peak of EAE, the greater mean maximal score was associated with: (i) greater number of overall and reactivated CD4<sup>+</sup> T cells isolated from spinal cord (SC); (ii) upregulated expression of mRNA for CD4<sup>+</sup> T helper (Th)17 polarizing cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23/subunit p19) in SC mononuclear cells and, consequently, greater percentage of Th17 cells among the T-lymphocytes

and (iii) greater activation of myeloid cells (according to the mean fluorescence intensity of CD45 and CD11b molecules on the surface of these cells), accompanied by upregulated expression mRNA for TNF- $\alpha$  and iNOS in SC mononuclear cells. Also, in both, young males and aged females, the more severe disease was consistent with greater frequency of Th17 cells of the highly pathogenic IL-17+IFN- $\gamma$ + phenotype, which was consistent with the upregulated expression of mRNA for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in SC mononuclear cells of these animals. The frequency of Th17 cells was greater in young male rats than in females, while it declined with ageing becoming considerably lower in aged male rats compared with the corresponding females. This suggests that, at the target organ level, ageing affects the Th17 immune response more severely in male than in female rats. This assumption was consistent with the greater decrease of the frequency of highly pathogenic IL-17+IFN- $\gamma$ + cells within the Th17 cell subpopulation in male rat SC than in females. On the other hand, the frequency of IFN- $\gamma$ + Th (Th1) cells decreased with ageing in SC of rats of both sexes, but, irrespective of age, it was lower in male rats compared with the corresponding females. These results implicate that the direction of the sexual dimorphism in Th1 cell differentiation did not change with ageing and that ageing selectively affects the Th17 immune response in a sexually dimorphic manner.

Irrespective of age, in the draining lymph node (DLN), in the inductive phase of the disease: (i) less pronounced increase in the frequency of activated CD4+ T cells upon inoculation of syngenic SC homogenate; (ii) lower proliferative response of CD4+ lymphocytes *in vitro* upon stimulation with myelin basic protein (MBP), related to a more efficient suppressive function of regulatory CD4+ cells and (iii) lower concentration of IL-17 and IFN- $\gamma$ , the cytokines crucial for EAE pathogenesis, in the supernatants of MBP-stimulated mononuclear cell cultures was found in male compared with age-matched female rats. These results implicate that, contrary to the expectations based on SC mononuclear cell analysis, the peripheral immune response was lower in both, young and aged male rats when compared with age-matched females. The discrepancy in the number of CD4+ T cells infiltrated in the SC and the magnitude of the peripheral immune response in

young animals could be attributed to sexually dimorphic mechanisms of CD4+ T cell-transmigration control (i.e. expression of certain chemokines and/or their corresponding receptors) and their reactivation in SC tissue. On the other hand, considering that in young animals the direction of the sexual dimorphism in the severity of EAE was consistent with the direction of the sexual dimorphism in the number of CD4+ T cells and their phenotype in the SC, it can be concluded that the target organ has a decisive role in determining the severity of EAE. The discrepancy between the direction of the sexual dimorphism in the immune response in the DLN and the number of CD4+ T cells infiltrating the SC disappeared with ageing. This, along with the other previously described results, suggests that ageing influences the sexual dimorphism in the severity of EAE by inducing sex specific alterations in the mechanisms controlling CD4+ T cell entry, their reactivation and differentiation in Th17 cells in the spinal cord tissue, as well as their plasticity, in terms of differentiation into highly pathogenic IL-17+IFN- $\gamma$ + cells.

In conclusion, the results obtained in this research are important not only for better understanding of the pathogenesis of EAE, especially the mechanisms determining the severity of the disease, but for understanding sex differences in CD4+ lymphocytes-mediated immune response in general. Although direct extrapolation of experimental results into clinical practice can not be made, the presented results are clearly a valuable empirical grounding for better comprehension of sex/age differences and differences in the response to therapy of people with MS and, possibly, for considering therapeutic approaches that would be sex- and age specific.

**Key words:** sex dimorphism, experimental autoimmune encephalomyelitis, ageing, CD4+ T lymphocytes.

**General subject area:** Pharmacy.

**Subject area:** Pharmacology – immunopharmacology.

**UDK number:** 616.832:616-021.6 (043.3).

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Polne razlike u prevalenci autoimunskih bolesti</b> .....	1
<b>1.2. Polne razlike u imunskom odgovoru</b> .....	1
<i>1.2.1. Uticaj genetskih, epigenetskih i hormonskih faktora na polne razlike u imunskom odgovoru</i> .....	2
<b>1.3. Polne razlike u incidenci i kliničkim karakteristikama MS-e</b> .....	7
<i>1.3.1. Faktori koji utiču na razvoj MS-e i polne razlike u MS-i</i> .....	7
<i>1.3.2. Patogeneza MS-e</i> .....	9
<i>1.3.3. Polne razlike u epidemiološkim i kliničkim karakteristikama MS-e</i> .....	11
<b>1.4. Polne razlike u EAE-u</b> .....	12
<i>1.4.1. EAE</i> .....	12
<i>1.4.2. Modeli EAE-a</i> .....	13
<i>1.4.3. Polne razlike u kliničkim karakteristikama EAE-a</i> .....	14
<b>1.5. Uticaj starenja na polne razlike u autoimunskim bolestima</b> .....	17
<i>1.5.1. Uticaj starenja na imunski odgovor i autoimunost</i> .....	17
<i>1.5.2. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru</i> .....	20
<i>1.5.3. Uticaj starenja na incidencu i kliničke karakteristike MS-e</i> .....	21
<i>1.5.4. Uticaj starenja na osetljivost na indukciju i kliničke karakteristike EAE-a</i> .....	23
<b>2. CILJEVI</b> .....	25
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	26
<b>3.1. Ogledne životinje</b> .....	26
<b>3.2. Eksperimentalni protokol</b> .....	26
<b>3.3. Indukcija EAE-a, klinička i histopatološka evaluacija EAE-a</b> .....	28
<i>3.3.1. Indukcija EAE-a</i> .....	28
<i>3.3.2. Analiza neurološkog deficita kod pacova</i> .....	29
<i>3.3.3. Analiza histoloških promena u kičmenoj moždini pacova</i> .....	29
<b>3.4. Hemikalije, antitela i imunokonjugati</b> .....	31
<b>3.5. Izolovanje mononuklearnih ćelija i priprema ćelijskih suspenzija</b> .....	36

<b>3.5.1. Mononuklearne ćelije kičmene moždine.....</b>	<b>36</b>
3.5.1.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine.....	36
3.5.1.2. Magnetno izdvajanje CD11b+ ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine.....	37
<b>3.5.2. Mononuklearne ćelije limfnog čvora.....</b>	<b>38</b>
3.5.2.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija limfnog čvora.....	38
3.5.2.2. Magnetno izdvajanje CD4+CD25+ i CD4+CD25- limfocita iz suspenzija mononuklearnih ćelija limfnih čvorova.....	38
<b>3.6. Protočna citofluorometrija.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.1. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih antigena...39</b>	
3.6.1.1. Određivanje apoptotičnih sveže izolovanih ćelija.....	40
<b>3.6.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije unutarćelijskih antigena.....</b>	<b>40</b>
3.6.2.1. Određivanje ekspresije Foxp3 transkripcionog faktora.....	40
3.6.2.2. Stimulacija ćelija za ispitivanje sinteze citokina.....	41
<b>3.6.3. Analiza uzoraka protočnom citofluorimetrijom.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Ispitivanje proliferacije CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora...43</b>	
<b>3.8. Određivanje supresorske funkcije Treg ćelija limfnog čvora in vitro.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8.1. Obeležavanje ćelija limfnog čvora CFSE-om.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8.2. Test supresije proliferacije in vitro.....</b>	<b>44</b>
<b>3.9. Analiza ekspresije gena za citokine i enzime.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva kičmene moždine, mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD11b+ ćelija kičmene moždine.....</b>	<b>45</b>
3.9.1.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva kičmene moždine.....	45
3.9.1.2. Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD11b+ ćelija kičmene moždine.....	45
<b>3.9.2. Transkripcija RNK u cDNK.....</b>	<b>46</b>
<b>3.9.3. RT-qPCR.....</b>	<b>46</b>
<b>3.10. Određivanje koncentracije citokina ELISA testovima.....</b>	<b>48</b>
<b>3.10.1. Priprema uzoraka za izvođenje ELISA testova.....</b>	<b>48</b>

3.10.1.1. Stimulacija mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora.....	48
3.10.1.2. Stimulacija mononuklearnih ćelija kičmene moždine.....	48
3.10.1.3. Stimulacija CD11b+ ćelija kičmene moždine.....	48
3.10.1.4. Izvođenje ELISA testova.....	49
<b>3.11. Statistička obrada podataka.....</b>	<b>54</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Polni dimorfizam u kliničkoj i histološkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod mladih pacova.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.1. Mladi mužjaci imaju manju incidencu EAE-a i težu bolest u odnosu na ženke pacova istog uzrasta.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.2. Mladi mužjaci imaju težu histološku sliku EAE-a u odnosu na ženke pacova istog uzrasta.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.3. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova na vrhuncu bolesti.....</b>	<b>59</b>
4.1.3.1. Više ukupno mononuklearnih ćelija i više CD134+ CD4+ T-limfocita je izolovano iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	59
4.1.3.2. U kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je veći, ali je odnos broja CD4+TCRαβ+CD134+ i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija nepovoljniji nego kod ženki istog uzrasta.....	62
4.1.3.3. Manja zastupljenost regulatornih CD8+ limfocita u mononuklearnom ćelijskom infiltratu kičmene moždine mladih mužjaka u odnosu na ženke pacova istog uzrasta.....	64
4.1.3.4. Mononuklearne ćelije kičmene moždine mladih mužjaka pacova eksprimiraju više IL-17, a manje IFN-γ i IL-10 u odnosu na ove ćelije ženki istog uzrasta.....	66

4.1.3.4.1. Veća zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru populacije T-limfocita i veća zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru Th17 limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	66
4.1.3.4.2. Manja zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	69
4.1.3.4.3. Manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	70
4.1.3.4.4. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN- $\gamma$ i IL-10 u supernatantima kultura restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova.....	71
4.1.3.4.5 Mononuklearne ćelije kičmene moždine mladih mužjaka pacova ekspresiraju više citokina koji su značajni za diferencijaciju Th17, a manje onih koji su značajni za diferencijaciju Th1 ćelija u odnosu na ženke istog uzrasta.....	73
4.1.3.5. Polne razlike u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih pacova.....	74
4.1.3.6. Veća ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	78
4.1.3.6.1. Veća ekspresija proinflamatornih medijatora u CD11b+ ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	79
<b>4.1.4. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....</b>	<b>81</b>
4.1.4.1. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....	82

4.1.4.1.1. Veća zastupljenost CD134+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita i njihova efikasnija reaktivacija u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	82
4.1.4.1.2. Veća zastupljenost IL-17+ ćelija, a manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	84
4.1.4.1.3. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN- $\gamma$ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova.....	86
4.1.4.1.4. Veća ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	88
4.1.4.1.5. Veća zastupljenost CD45 <sup>++</sup> ćelija u okviru populacije CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	89
4.1.4.2. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....	90
4.1.4.2.1. Manja procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	90
4.1.4.2.2. Manja in vitro proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora na stimulaciju MBP-om kod mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	94
4.1.4.2.3. Polni diergizam u supresorskoj funkciji Treg ćelija limfnog čvora mladih pacova.....	96
4.1.4.2.4. Manja zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	100
4.1.4.2.5. Manja koncentracija IL-17, IFN- $\gamma$ i IL-10 u supernatantima kultura restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	102



<b>4.2. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod starih pacova.....</b>	<b>104</b>
<b>4.2.1. Stari mužjaci pacova imaju manju incidencu EAE-a i lakšu bolest u odnosu na ženke istog uzrasta.....</b>	<b>104</b>
<b>4.2.2. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova na vrhuncu bolesti.....</b>	<b>105</b>
4.2.2.1. Manje ukupno mononuklearnih ćelija i manje CD134+ CD4+ T-limfocita je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.....	106
4.2.2.2. U kičmenoj moždini starih mužjaka pacova zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita je veća i odnos CD4+TCRαβ+CD134+ i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je povoljniji nego kod ženki istog uzrasta.....	108
4.2.2.3. Manja zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru subpopulacije CD8+ limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	110
4.2.2.4. Mononuklearne ćelije kičmene moždine starih mužjaka eksprimiraju manje IL-17, IFN-γ i IL-10 u odnosu na odgovarajuće ćelije ženki pacova istog uzrasta.....	112
4.2.2.4.1. Manja zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru populacije T-limfocita i manja zastupljenost IL-17+IFN-γ+ ćelija u okviru Th17 limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	112
4.2.2.4.2. Manja zastupljenost IFN-γ+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	115
4.2.2.4.3. Manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	116
4.2.2.4.4. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN-γ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih pacova.....	117

4.2.2.4.5. Mononuklearne ćelije kičmene moždine starih mužjaka pacova eksprimiraju manje citokina koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 ćelija u odnosu na ženke istog uzrasta.....	119
4.2.2.5. Polne razlike u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama CD11b+ ćelija kičmene moždine starih pacova.....	120
4.2.2.6. Manja ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	123
<b>4.2.3. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora starih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....</b>	<b>123</b>
4.2.3.1. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....	124
4.2.3.1.1. Manja zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	124
4.2.3.1.2. Manje Th17, Th1 i IL-10+ Th ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	126
4.2.3.1.3. Manja koncentracija IL-17, IFN- $\gamma$ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	128
4.2.3.1.4. Manja ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka u odnosu na ženke pacova istog uzrasta.....	130
4.2.3.1.5. Manja zastupljenost ćelija CD45 <sup>++</sup> fenotipa, a veća zastupljenost ćelija CD45 <sup>-</sup> fenotipa u okviru populacije CD11b+ ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	131
4.2.3.2. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora starih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....	132

4.2.3.2.1. Manji broj CD134+ CD4+ T-ćelija je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.....	132
4.1.3.2.2. Manja in vitro proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora na stimulaciju MBP-om kod starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	136
4.2.3.2.3. Veća zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg limfocita i veći supresorski potencijal Treg ćelija limfnog čvora starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.....	138
4.2.3.2.4. Slična zastupljenost IL-17+, IFN- $\gamma$ + i IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova.....	141
4.2.3.2.5. Manja koncentracija IL-17, IFN- $\gamma$ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka u odnosu na ženke pacova istog uzrasta.....	143
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>145</b>
<b>5.1. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod mladih pacova.....</b>	<b>138</b>
5.1.1. Polni dimorfizam u kliničkoj i histološkoj slici EAE-a koji je indukovan inokulacijom homogenata singene kičmene moždine kod mladih pacova.....	145
5.1.2. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova na vrhuncu bolesti.....	147
5.1.3. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....	153
<b>5.2. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod starih pacova.....</b>	<b>157</b>
5.2.1. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a koji je indukovan inokulacijom homogenata singene kičmene moždine kod starih pacova.....	157

<i>5.2.2. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova na vrhuncu bolesti.....</i>	<i>159</i>
<i>5.2.3. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine starih pacova u induktivnoj fazi bolesti.....</i>	<i>163</i>
<b>5.3. Uticaj starenja na polni dimorfizam u kliničkoj slici i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a.....</b>	<b>167</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>175</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>177</b>

## **1. UVOD**

### **1.1. Polne razlike u prevalenci autoimunskih bolesti**

U autoimunske bolesti se ubrajaju oboljenja u kojima imunski odgovor prema sopstvenim antigenima dovodi do oštećenja ili poremećaja funkcije tkiva/organa (McCombe i sar., 2009). Autoimunske bolesti mogu biti generalizovane ili zahvatati određeni organ/sistem organa, mogu biti posredovane humoralnim i/ili ćelijskim imunskim mehanizmima, a njihove posledice mogu biti blage ili katastrofalne (McCombe i sar., 2009).

Epidemiološki podaci ukazuju da su incidenca i prevalenca autoimunskih bolesti u svetu u kontinuiranom porastu (Lerner i sar., 2015). Procenjuje se da približno 78% svih obolelih od autoimunskih bolesti čine žene (Fairweather i sar., 2008). Žene češće obolevaju i od organ-specifičnih autoimunskih bolesti, kao što su Graves-Basedowljeva bolest, Hashimotov tireoiditis, multipla skleroza (MS), ali i od generalizovanih autoimunskih bolesti (npr. sistemski eritematozni lupus) (Ngo i sar., 2014). Iako osnova ovog biološkog fenomena nije potpuno razjašnjena, smatra se da bi polno specifične razlike u imunskim funkcijama mogle da budu od značaja (Zandman-Goddard i sar., 2007).

### **1.2. Polne razlike u imunskom odgovoru**

Poznato je da se imunski sistem žena i muškaraca razlikuje (McCombe i Greer, 2013), a slične razlike su pokazane i kod većine životinjskih vrsta (McKean i Nunney, 2005). Generalno, ženski pol karakteriše veća imunska reaktivnost, što, smatra se, doprinosi njihovom efikasnijem imunskom odgovoru u infektivnim i pojedinim neinfektivnim bolestima (Ansar Ahmed i sar., 1995; Hewagama i sar., 2009). Naime, pokazano je da je u perifernoj krvi kod žena (Amadori i sar., 1995; Das i sar., 2008) i nekih ogleđnih životinja (Xia i sar., 2009), odnos CD4+/CD8+ limfocita pomeren ka CD4+ T-limfocitima, što bi moglo da doprinosi većoj imunskoj reaktivnosti jedinki ženskog pola (Sainz i sar., 2013). Generisanje većeg broja specifičnih CD4+ T-limfocita u odgovoru na imunizaciju (Ho i sar., 1995), efikasnije odbacivanje alografta (Komi i Lassila, 2000) i relativna rezistencija na indukciju imunotolerancije (Bebo i sar., 1999a), sugerišu da je kod jedinki ženskog

pola T-ćelijski imunski odgovor efikasniji. Žene, ali i ženke različitih životinjskih vrsta, na imunizaciju i infekciju reaguju povećanom i prolongiranom sintezom imunoglobulina (Ig), pa se, sledstveno, kod njih nalazi i veća koncentracija Ig, što ukazuje i na snažniji B-ćelijski odgovor (Styrt i Sugarman, 1991; Furman i sar., 2013; Wesołowska i sar., 2013). Robusniji imunski odgovor kod žena se ogleda i u češćem razvoju komplikacija tokom infekcija (npr. infekcija virusom influence), koje nastaju kao rezultanta prekomerne produkcije citokina (tzv. citokinska oluja) (Robinson i sar., 2011).

Pored navedenih polnih razlika u kvalitetu imunskog odgovora, literaturni podaci ukazuju da žene imaju 1.7 puta više T-ćelija specifičnih za sopstvene antigene nego muškarci (Su i sar., 2013), što verovatno doprinosi većoj incidenci i prevalenci autoimunskih bolesti kod žena.

Iako su polne razlike u imunskim funkcijama opisane, faktori koji ih uslovljavaju i ćelijski i molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi ovih razlika, još uvek nisu razjašnjeni.

### ***1.2.1. Uticaj genetskih, epigenetskih i hormonskih faktora na polne razlike u imunskom odgovoru***

Danas se smatra da u nastanku polnih razlika u imunskom odgovoru, a sledstveno i u autoimunskim bolestima, važnu ulogu imaju genetski, epigenetski, sredinski i hormonski faktori (Ngo i sar., 2014).

Iako se geni na X hromozomu nameću kao glavna meta za ispitivanje polnih razlika u imunskom odgovoru (Fish, 2008), najveći broj gena koji su relevantni za imunski odgovor se nalazi na autozomima. Međutim, pokazano je da je i aktivnost ovih gena regulisana na polno specifičan način (Ellegren i Parsch, 2007). Geni koji kodiraju sistem humanih leukocitnih antigena (HLA) (humani oblik glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, *engl.* major histocompatibility complex, MHC), su locirani u regionu genoma koji sadrži veliki broj gena koji kodiraju proteine značajne za regulaciju imunskog odgovora (Simmonds i Gough, 2007). Mnoge autoimunske bolesti ljudi i visokosrodnih životinja povezane su sa određenim HLA alelima (Simmonds i Gough, 2007), pogotovo kod jedinki ženskog pola (Ngo i sar., 2014). Naime, pokazano je da su rizični HLA-DR i -DQ HLA aleli češće zastupljeni

kod žena obolelih od MS-e, miastenije gravis, reumatoidnog artritisa (RA), autoimunskog hepatitisa tip 1, hronične inflamatorne demijelinizirajuće polineuropatije i drugih autoimunskih bolesti, u odnosu na obolele muškarce (Meyer i sar., 1996; Celius i sar., 2000; Czaja i Donaldson, 2002., Avidan i sar., 2014).

Pored genetskih faktora, epigenetska regulacija ekspresije gena koji su relevantni za imunske funkcije bi takođe mogla da bude značajna za polni dimorfizam u imunskom odgovoru, a sledstveno, i u incidenci i kliničkoj prezentaciji autoimunskih bolesti (Quintero-Ronderos i Montoya-Ortiz, 2013). Ove promene mogu biti nasledne, ali i sredinski faktori kao što su pušenje, ksenobiotici, izlaganje sunčevoj svetlosti, metabolizam vitamina D, način ishrane i sl. takođe mogu da utiču na epigenetsku regulaciju ekspresije gena koji su značajni za imunske funkcije (Ellis i sar., 2014). Polne razlike u epigenetskoj regulaciji genske aktivnosti usled delovanja spoljašnjih faktora mogu biti posledica različitog izlaganja polova pojedinim sredinskim faktorima, ili polno specifične osetljivosti na njihovo delovanje (McCombe i sar., 2009).

Razvoj imunskih poremećaja je tesno povezan sa stanjima u kojima dolazi do izraženih promena u sekreciji i aktivnosti polnih hormona (estrogena, progesterona i androgena), kao što su pubertet (Lamason et al., 2006), graviditet (Buyon, 1998; Perricone i sar., 2012), menopauza (Sammaritano, 2012), upotreba oralnih kontraceptiva (Canto-Cetina i Cetina-Manzanilla, 2007), starenje (Bove, 2013; Vadasz i sar., 2013) i sl. Ovi podaci, uz podatke o polnom dimorfizmu u imunskom odgovoru i modulatornim efektima koje polni hormoni ispoljavaju na imunske ćelije *in vitro* (Whitacre i sar., 1999), ukazuju na ulogu ovih hormona u razvoju polnog diergizma (funkcijskih razlika) u protektivnom imunskom odgovoru i u autoimunosti.

Generalno, smatra se da estrogeni stimulišu imunski odgovor, a da androgeni deluju imunosupresivno (Morell, 1995; Verthelyi, 2001). Međutim, efekti estrogena, kako na protektivni imunski odgovor, tako i na destruktivni autoimunski odgovor, su, po svemu sudeći, dvojaki i dozno zavisni. Pri niskim koncentracijama estrogena u cirkulaciji imunski odgovor se pojačava, a pri visokim koncentracijama (kao u graviditetu) inhibiše, i to prevashodno onaj posredovan

CD4+ "pomoćničkim" T-limfocitima (*engl.* T helper, Th) koji sintetišu IFN- $\gamma$  (Th1 odgovor) (Whitacre i sar., 1999). Ovaj podatak navodi na zaključak da bi davanje estrogena u visokim dozama moglo biti korisno u autoimunskim bolestima koje su primarno posredovane Th ćelijama, kao što su MS (Martin i McFarland, 1995; Steinman, 1996) i RA (Feldman i sar., 1996). U prilog ovoj tvrdnji idu podaci da u graviditetu, kod obolelih od MS-e i RA-a, dolazi do remisije bolesti (Østensen i Villiger, 2007; McCombe i Greer, 2013). U animalnom modelu MS-e - eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), takođe dolazi do remisije u graviditetu (Gatson i sar., 2011). U prilog imunomodulatorne uloge estrogena govori i činjenica da skoro sve ćelije imunskog sistema ispoljavaju kako unutarćelijske, tako i membranske estrogenske receptore (ER) (Cunningham i Gilkeson, 2010). U T-ćelijskom odeljku, pokazano je da estrogeni utiču na diferencijaciju timocita (Rijhsinghani i sar., 1996), zastupljenost pojedinih subpopulacija T-limfocita na periferiji, kao i na njihovu aktivaciju (Ku i sar., 2009), citokinski profil (Kumru i sar., 2004), njihovo „naseljavanje“ (*engl.* homing) u organima (Lélu i sar., 2010), ekspanziju regulatornih CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) ćelija (Polanczyk i sar., 2004) i sl. Takođe, estrogeni utiču i na razvoj i maturaciju B-limfocita (Ahmed i sar., 1999; Gonzáles i sar., 2010), njihovu aktivaciju i apoptozu (Grimaldi i sar., 2002), kao i na sintezu antitela (Beagley i Gockel, 2003). Pored toga, pokazan je uticaj estrogena i na ćelije urođene imunosti. Estrogeni utiču na ekspresiju MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula na antigenprezentujućim ćelijama (APĆ) (Flynn, 1986; Carreras i sar., 2009; Xie i sar., 2011). U kontekstu autoimunosti, posebno je važna aberantna ekspresija MHC molekula II klase na ciljnim ćelijama pojedinih organa. Pretpostavlja se da je ovakva ekspresija MHC molekula II klase indukovana interferonom- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i da je povezana sa pojavom organ-specifičnih autoimunskih bolesti (Bottazzo i sar, 1986; Davies, 1990; Hill i sar., 1990). Budući da estrogeni stimulišu ekspresiju IFN- $\gamma$  (Karpuzoglu-Sahin i sar., 2001), smatra se da je konstitutivno veća produkcija IFN- $\gamma$  od strane jedinki ženskog pola (Zhang i sar., 2012), jedan od faktora koji povezuje estrogene i veću autoimunsku reaktivnost žena (Karpuzoglu-Sahin i sar., 2001). Broj cirkulišućih neutrofila i monocita (England i Bain, 1976; Northern i sar., 1994), kao i zastupljenost tkivnih makrofaga (Scotland i sar., 2011), ekspresija



receptora sličnih Toll-u (*engl.* Toll-like receptor, TLR) na makrofagima i njihova fagocitna aktivnost (Scotland i sar., 2011), ekspresija citokina (Bouman i sar., 2004; Willis i sar., 2003) i inducibilne sintaze azot-oksida (iNOS) (Garcia-Duran i sar., 1999; Hong i Zhu, 2004) od strane ćelija urođene imunosti, takođe su pod uticajem estrogena.

Ulogu u modulaciji imunskog odgovora ima i progesteron, a svoje efekte ostvaruje vezujući se za citosolne ili membranske progesteronske receptore (PR) u/na imunskim ćelijama (Hughes, 2012). Za progesteron se uglavnom vezuju anti-inflamatorni efekti. Specifičnije, nađeno da visoke koncentracije progesterona favorizuju preusmeravanje imunskog odgovora ka Th2 tipu (Piccinni i sar., 1995). Ovaj fenomen verovatno doprinosi remisiji u bolestima koje su posredovane Th ćelijama, kao što su MS i RA, u graviditetu (Piccinni i sar., 1995). Pored toga, progesteron smanjuje sintezu azot oksida (NO) (Miller i sar., 1996) i ekspresiju TLR-a na makrofagima (Jones i sar., 2008), smanjuje sintezu IFN- $\gamma$  u urođenoubilačkim (*engl.* natural killer, NK) ćelijama (Arruvito i sar., 2008), utiče na ekspresiju MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula na dendritskim ćelijama (Ivanova i sar., 2005; Liang i sar., 2006) i dr.

Pored receptora za ženske gonadne hormone, ćelije imunskog sistema ekspimiraju i receptore za androgene hormone (Lin i sar., 1996). Međutim, efekti androgena na imunske funkcije mogu zavistiti od toga o kojem je androgenu reč i od njegove koncentracije/doze. Na primer, pojedine studije izveštavaju o imunosupresivnim efektima sintetskih androgena (Fujii i sar., 1975; Paavonen, 1994; Olsen i Kovacs, 1996), dok se za endogene androgene smatra da imaju imunostimulatorne efekte (Calabrese i sar., 1989). Osim toga, dihidrotestosteron može da deluje i indirektno, putem ER, budući da u perifernim tkivima dolazi do njegove aromatizacije do estrogena (Mendelsohn i Karas, 2005; Lund, 2006). Generalno, androgeni utiču na diferencijaciju timocita (Olsen i sar., 2001) i smanjuju proliferaciju i diferencijaciju T-limfocita (Stoeger i sar., 1988; Sakiani i sar., 2013) Verovatno dominantni imunomodulatorni efekti testosterona su indukcija ekspresije anti-inflamatornog/imunoregulatornog citokina interleukina (IL)-10 i inhibicija ekspresije IL-12 i IFN- $\gamma$  (Liva i Voskuhl, 2001, van den Broek i sar., 2005), odnosno, inhibicija Th1 imunskog odgovora (Kissick i sar., 2014).

Pored toga, androgeni inhibišu diferencijaciju B-limfocita (Stoeger i sar., 1988), kao i njihovu funkciju, prevashodno smanjenjem sinteze IgA (Calabrese i sar., 1989). U prilog anti-inflamatornim/imunosupresivnim efektima androgena idu i podaci koju ukazuju da androgeni suprimiraju sintezu IL-1 $\beta$  i IL-6 u monocitima/makrofagama (Li i sar., 1993; Cutolo i sar., 1995). Takođe, pokazano je da inhibiraju i citotoksičnu aktivnost NK ćelija (Marshall-Gradisnik i sar., 2008).

Polni hormoni, osim direktnih, imaju i indirektno efekte na imunske funkcije, modulišući koncentraciju drugih hormona koji učestvuju u regulaciji imunskog odgovora (Giefing-Kröll i sar., 2015). Aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne (*engl.* hypothalamic–pituitary–adrenal, HPA) osovine i odgovor na stres su takođe pod uticajem polnih hormona kod životinja i ljudi (Morale i sar., 2001; Roca i sar., 2005). Tokom perinatalnog perioda, gonadni hormoni, posebno estrogeni, ostvaruju trajne efekte na organizaciju nervnog sistema i oblikovanje polnog dimorfizma HPA osovine, dok su u odrasloj dobi cirkulišući polni steroidi odgovorni za tranzitorne efekte, odnosno, modulaciju aktivnosti ove osovine (Patchev i sar., 1995). Pokazano je da ženke različitih vrsti, uključujući i žene, imaju veće koncentracije kortikosterona/kortizola u cirkulaciji od mužjaka/muškaraca (Griffin i Whitacre, 1991; Wilder, 1995). Otkriće estrogen-zavisnog elementa u promotorskom regionu gena koji kodira kortikotropin-oslobađajući hormon, potvrđuje povezanost ova dva hormonska sistema (Whitacre, 2001). Budući da glukokortikoidi deluju na sve ćelije imunskog sistema (Miller i sar., 1998), interakcija estrogena i glukokortikoida se takođe mora uzeti u obzir prilikom proučavanja polnih razlika u imunskom odgovoru (Whitacre, 2001).

Pokazano je i da drugi hormoni, kao, na primer, prolaktin, hormon rasta, insulinu-sličan faktor rasta – 1 (IGF-1) i leptin utiču na imunski odgovor (Clark, 1997; Nicot, 2009; Berczi, 1994). Njihova koncentracija u serumu je takođe polno specifična, što, verovatno, doprinosi polnim razlikama u imunskom odgovoru (Besedovsky i del Ray., 1996; Nicot, 2009).

S obzirom na veliki broj faktora koji, delujući na različitim nivoima regulacije imunskog odgovora, doprinose razvoju polnog dimorfizma i diergizma u imunskom odgovoru, opravdano je smatrati da je polni dimorfizam u imunskom odgovoru, pa i u incidenci i težini kliničke slike i/ili kliničkom toku autoimunskih

bolesti, uključujući MS-u i njen eksperimentalni model EAE, rezultanta delovanja svih ovih faktora, a ne bilo kojeg od njih pojedinačno (Dai i Ahmed, 2014).

Međutim, iako su mnogi faktori koji utiču na polni dimorfizam i diergizam u imunskom odgovoru poznati, molekularni i ćelijski mehanizmi koji su odgovorni za ove fenomene još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

### **1.3. Polne razlike u incidenci i kliničkim karakteristikama MS-e**

MS je hronična, inflamatorna, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS) i jedna od najčešćih organ-specifičnih autoimunskih bolesti. Karakteriše je postojanje jasno ograničenih polja demijelinizacije (plakovi) u kojima je, u aktivnoj fazi bolesti, prisutan inflamatorni infiltrat koji se sastoji od CD4+ i CD8+ T-limfocita, B-limfocita, makrofaga i aktivisane mikroglije (Pender i Greer, 2007). Lezije su diseminovane u beloj masi mozga i kičmene moždine, što dovodi do pojave različitih neuroloških ispada. Uzroci MS-e su još uvek nepoznati. Smatra se da se bolest javlja kod genetski predisponiranih osoba, a penetraciju bolesti omogućavaju različiti stohastički i sredinski faktori (Dendrou i sar., 2015).

#### **1.3.1. Faktori koji utiču na razvoj MS-e i polne razlike u MS-i**

Razvoj MS-e je usko povezan sa prevalencom specifičnih polimorfizama gena koji su relevantni za imunske funkcije (Epplen i sar., 1997). Smatra se da je polimorfizam HLA gena, a posebno HLA-DRB1 alela, najznačajniji genetski faktor rizika za razvoj MS-e (Oksenberg i Barcellos, 2005). Neki od rizičnih HLA alela (DRB1\*1501) se češće nalaze kod osoba ženskog pola (Bove i Chitnis, 2014), što bi moglo da se poveže sa većom incidencom MS-e kod žena. Polimorfizam gena koji kodiraju  $\alpha$ -lanac receptora za IL-2 i IL-7, takođe može imati ulogu u obolevanju od MS-e (Dendrou i sar., 2009; Hartman i sar., 2014). Pokazano je da su rizični polimorfizmi i ovih gena prevalentniji kod žena nego kod muškaraca obolelih od MS-e (Majdinasab i sar., 2014). Genetski faktori, osim što utiču na predispoziciju za obolevanje od MS-e, mogu da budu determinativni i za težinu bolesti, utičući na patogenetske mehanizme oštećenja, ali i na osetljivost nervnog tkiva na oštećenje. Naime, u organ-specifičnim autoimunskim bolestima, uključujući i MS-u, osetljivost ciljnih tkiva na efekte citokina i oštećenje izazvano oksidativnom stresom,

povećanim oslobađanjem glutamata ili drugim oblicima citotoksičnosti, je takođe genetski determinisana (Hill i sar., 2007). Budući da je ekspresija gena koji su potencijalno odgovorni za osetljivost ćelija na oštećenje, u mozgu polno dimorfna (Du i sar., 2004; Davies i Wilkinson, 2006), može se zaključiti da su genetski faktori važni ne samo za polne razlike u obolevanju od MS-e, nego i za polne razlike u težini bolesti.

Pored genetskih, sredinski faktori imaju važnu ulogu u razvoju MS-e (Kuusisto i sar., 2008). Aktivaciju T- i B-limfocita, koji su specifični za neuroantigene, najčešće uzrokuju virusi (Epstein–Barr virus, humani herpes virus tip 6, kao i retrovirusi) (Kakalacheva i sar., 2011). Smatra se da APC aktivisane virusnim antigenima mogu da dovedu do aberantne aktivacije autoreaktivnih T-ćelija („bystander“ aktivacija) (Harkiolaki i sar., 2009). Aberantna aktivacija T-ćelija specifičnih za sopstvene neuroantigene može nastati i usled ukrštene reaktivnosti na antigenske epitope virusa i domaćina (fenomen molekularne mimikrije) (Olson i sar., 2001). Prekid imunske tolerancije i razvoj MS-e može nastati i kao posledica: (i) stvaranja novih autoantigena usled delovanja različitih sredinskih faktora (Scally i sar., 2013); (ii) oslobađanja antigena koji su sekvstrirani u CNS-u na periferiju, usled delovanja egzogenih činioca, npr. infektivnih agenasa koji pokazuju tropizam za CNS (kao u modelu Thelier virusom izazvanog mišjeg encefalomijelitisa) (Dendrou i sar., 2015); (iii) promene ekspresije rizičnih gena, npr. HLA-DR15 alela, pod uticajem sredinskih faktora (Handunnetthi i sar., 2010) i sl. Osim virusnih infekcija, geografska širina, izlaganje određenim ksenobioticima, pušenje, dijeta i deficit vitamina D, značajno koreliraju sa obolevanjem od MS-e (Franklin i Nelson, 2003; Handunnetthi i sar., 2010; Lauer, 2010). Pretpostavlja se da su polne razlike u izloženosti ili osetljivosti na delovanje sredinskih faktora odgovorne za veću incidencu MS-e kod žena (Setlow i sar., 1998; Voskuhl i Gold, 2012). U prilog toj pretpostavci ide i zapažanje da se polne razlike u obolevanju od MS-e gube sa promenom izloženosti određenim sredinskim faktorima (Setlow i sar., 1998).

Pored genetskih i sredinskih faktora, smatra se da bi za polni dimorfizam u razvoju MS-e mogli biti važni i hormoni, pre svega polni dimorfizam u koncentraciji polnih steroida. U prilog ovoj hipotezi su podaci koji ukazuju na

pozitivnu korelaciju između koncentracije gonadnih estrogena i progesterona u cirkulaciji, tokom lutealne faze menstrualnog ciklusa, i broja i zapremine lezija kod žena sa MS-om (Pozzilli i sar., 1999). O značaju ženskih gonadnih hormona za patogenezu MS-e govore i podaci o remisiji bolesti u graviditetu, posebno u drugom i trećem trimestru, kada su koncentracije cirkulišućih estrogena i progesterona veoma visoke (van Walderveen i sar., 1994).

Prilikom razmatranja uloge polnih hormona u patogenezi MS-e, moraju se uzeti u obzir i polne razlike u ekspresiji receptora za polne steroidne hormone, ne samo u/na imunskim ćelijama (Kovats i sar., 2010), nego i ćelijama CNS-a (Jung-Testas i Baulieu, 1998). Takođe, treba imati u vidu da bi važnu ulogu u nastajanju polnih razlika u patogenezi MS-e mogle da imaju i polne razlike u lokalnoj *de novo* sintezi steroidnih hormona (neurosteroida) i metabolizmu primarnih steroidnih hormona. Pokazano je da polni steroidni hormoni i njihovi metaboliti posredstvom ne samo receptora za polne hormone, već i drugih tipova receptora, mogu uticati na težinu neuroinflamacije i stepen oštećenja ciljnih tkiva (Giatti et al., 2010; Luchetti i sar., 2014). Naime, gonadni i lokalno sintetisani steroidni hormoni i njihovi metaboliti mogu da ostvaruju brze, negenomske efekte u CNS-u, interakcijom sa ligand-zavisnim jonskim kanalima (npr. GABA<sub>A</sub> receptori) i drugim membranskim receptorima (McEwen, 1991; Lambert i sar., 2003; Melcangi i sar., 2006).

### **1.3.2. Patogeneza MS-e**

Tačan mehanizam nastanka MS-e, kao i odgovor na pitanje da li se njen razvoj razlikuje između obolelih od ove bolesti, nisu poznati. Još uvek nije jasno da li je MS bolest koja je inicirana na periferiji, ili u CNS-u. U patogenetskom modelu po kojem bolest počinje van CNS-a, autoreaktivne T-ćelije se aktiviraju na periferiji, čemu doprinose genetski i sredinski faktori. Aktivisane ćelije zatim infiltriraju CNS, zajedno sa B-ćelijama i monocitima (Dendrou i sar., 2015). Ovaj model korelira sa većinom modela EAE-a kod ogleđnih životinja. Alternativno, razvoj bolesti mogu inicirati procesi koji se odvijaju u CNS-u, sa ulaskom autoreaktivnih limfocita i monocita sa periferije kao sekundarnim fenomenom (Dendrou i sar., 2015). Pretpostavlja se da bi inicirajući događaji mogli biti virusne infekcije CNS-a

(Ransohoff i Engelhardt, 2012; Louveau i sar., 2015), ili primarno neurodegenerativni procesi slični onima koji se javljaju u Alchajmerovoj ili Parkinsonovoj bolesti (Heneka i sar., 2014).

Infiltracija CNS-a imunskim/inflamatornim ćelijama sa periferije je izražena još u ranoj fazi MS-e. Na osnovu visokog aviditeta za molekule mijelinskog porekla, kao što su bazni protein mijelina (*engl.* myelin basic protein, MBP), proteolipidni protein (PP) i mijelinski oligodendrocitni protein (MOG), koji pokazuju CD4+ limfociti izolovani iz krvi obolelih od MS-e, pretpostavlja se da su antigeni mijelina glavne „mete“ autoreaktivnih CD4+ T-ćelija u MS-i (Bielekova i sar., 2004).

Smatra se da u patogenezi MS-e glavnu ulogu imaju autoreaktivne Th17 i Th1 ćelije (Dendrou i sar., 2015). Njihov značaj u razvoju MS-e još uvek nije u potpunosti jasan, s obzirom na to da različite studije izveštavaju o predominaciji jednog ili drugog tipa ćelija u različitim fazama bolesti (Frisullo i sar., 2008; Tzartos i sar., 2008). S druge strane, pojedini Th limfociti u aktivnim lezijama MS-e pokazuju intermedijarni fenotip i koeksprimiraju i IL-17 i IFN- $\gamma$  (Cao i sar., 2015). Međutim, novija istraživanja ističu da bi posebno važnu ulogu u patogenezi MS-e mogle imati Th ćelije koje sintetišu faktor koji stimuliše kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (Noster i sar., 2014).

Imajući u vidu da raspoloživa imunomodulatorna terapija smanjuje učestalost relapsa, ali ne i dugoročnu progresiju MS-e, smatra se da neuro-aksonalno oštećenje izazvano autoimunskim procesom pokreće samoodrživu hroničnu inflamaciju i neurodegeneraciju (Dendrou i sar., 2015). Ona je prisutna čak i odsustvu kontinuirane infiltracije ćelija sa periferije, koja se vremenom neumitno smanjuje nezavisno od terapije (pretpostavlja se zbog iscrpljivanja imunskih ćelija usled hroničnog izlaganja antigenima) (Wherry, 2011). Hronična inflamacija se održava na račun ćelija koje već jesu, ili su postale, rezidentne u CNS-u: limfociti obrazovanjem tercijernih limfoidnih struktura u tkivu CNS-a (Howell i sar., 2011), a mikroglija i astrociti sintezom niza neurotoksičnih i inflamatornih medijatora (citokini, hemokini, reaktivni oblici kiseonika i azota), koji dovode do neuro-aksonalnog oštećenja i neurodegeneracije (Friese i sar., 2014; Heneka i sar., 2014).

### ***1.3.3. Polne razlike u epidemiološkim i kliničkim karakteristikama MS-e***

S obzirom na sve prethodno navedeno, klinički tok MS-e i njeni simptomi su takođe heterogeni, odražavajući razlike u vremenskoj i prostornoj diseminaciji lezija u CNS-u. Najčešću formu MS-e (85% obolelih) karakteriše inicijalna epizoda neurološkog deficita praćena periodom poboljšanja (remisija), posle čega slede naizmenične smene relapsa (pogoršanja) i remisija (Pender i Greer, 2007). Relapsi koincidiraju sa fokalnom inflamacijom i demijelinizacijom CNS-a. Vremenom, neurološki deficiti se akumuliraju i oko 80% obolelih razvija sekundarno progresivni oblik MS-e (Pender i Greer, 2007). Umesto karakterističnih inflamatornih lezija, javlja se neurodegeneracija, atrofija tkiva i gubitak aksona. Približno 10% obolelih od MS-e ima primarno progresivni oblik bolesti, koji odlikuje akumulacija neuroloških deficita bez jasnih faza remisije i relapsa (Pender i Greer, 2007).

MS pogađa žene tri puta više od muškaraca (Bove i Chitnis, 2013), sa trendom stalnog rasta obolevanja žena tokom poslednjih 50 godina (Trojano i sar., 2012). Prvi simptomi se kod muškaraca prosečno javljaju nešto kasnije u poređenju sa ženama (Paty i sar., 1997). Osim na prevalencu, pol utiče i na klinički tok MS-e (Tomassini i Pozzilli, 2009). Naime, iako su žene podložnije obolevanju od MS-e, one češće imaju benigniji tok bolesti, dok muškarci češće boluju od primarno progresivnog toka i oporavak posle inicijalnog ataka je slabije izražen u odnosu na žene (Bove i Chitnis, 2014). Pored toga, kod muškaraca se brže nego kod žena razvija teška onesposobljenost (Weinshenker i sar., 1991; Confavreux i sar., 2003). Uočene su polne razlike i u simptomatologiji MS-e. Motorni simptomi se češće javljaju kod muškaraca i udruženo sa kasnijim početkom bolesti (Hawkins i McDonell, 1999). Kognitivni poremećaji su takođe češći kod muškaraca (Benedict i Zivadinov, 2011), dok su senzitivni simptomi, na primer neki bolni sindromi (neuralgija n. trigeminusa, periferni neuropatski bol), češći kod žena (Osterberg i sar., 2005).

## **1.4. Polne razlike u EAE-u**

### **1.4.1. EAE**

EAE je najstariji i najzastupljeniji eksperimentalni model MS-e (Katsnelson, 2012). EAE nije jedinstvena bolest, već skup različitih modela indukovane autoimunske neuroinflamacije kod oglednih životinja (Baker i sar., 2011).

Generalno, istraživanja na modelu EAE-a omogućavaju analizu imunogenetskih karakteristika MS-e (HLA-restrikciju i rizične gene za oboljevanje od MS-e), ali i patohistoloških odlika bolesti (inflamacija, demijelinizacija posredovana imunskim mehanizmima i sl.) (Mix i sar., 2010). Pored toga, EAE je značajan i za proučavanje imunopatogeneze MS-e (npr. prekid imunotolerancije, aktivacija encefalitogenih T-limfocita, transmigracija imunskih/inflamatornih ćelija kroz hemato-encefalnu barijeru, značaj pojedinih subpopulacija T-limfocita za patogenezu MS-e, imunski mehanizmi demijelinizacije i oštećenje tkiva i sl.) (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009; Pachner, 2011). Osetljivi sojevi miševa, pacova, zamoraca i nehumanih primata su najčešće korišćene ogledne životinje za proučavanje autoimunske neuroinflamacije u EAE-u.

Iako EAE reprodukuje brojne patogenetske, patohistološke i kliničke karakteristike MS-e, nijedan eksperimentalni model ne može da simulira ceo spektar kliničkih i histoloških varijeteta MS-e (Baker i sar., 2011; Denic i sar., 2011). Za ovo postoji više objašnjenja. Pre svega, za razliku od EAE-a, MS je spontana bolest bez očiglednog egzogenog uzroka (iako postojanje takvog uzroka nije isključeno) (Constantinescu i sar., 2011). Dalje, velike evolutivne razlike između čoveka i oglednih životinja se odražavaju i na razlike u urođenom i adaptivnom imunskom odgovoru ovih vrsta (Mestas i Hughes, 2004). Pored toga, MS-i nedostaju neki elementi klasične autoimunosti, prema kriterijumima koje su naveli Schwartz i Datta (1989), što je dodatno potkrepljeno odsustvom terapijskog efekta čak i posle agresivne imunosupresije (Mix i sar., 2010). Osim toga, neimunski mehanizmi demijelinizacije koji se sreću u MS-i, retko su prisutni u EAE-u (Siffrin i sar., 2010). Konačno, za razliku od najvećeg broja varijeteta EAE-a u kojima CD4+ T-ćelije imaju glavnu ulogu u patogenezi bolesti (Constantinescu i sar., 2011), smatra se da u patogenezi MS-e važnu ulogu imaju pre svega i CD8+ T-limfociti, ali i B-limfociti i periferni makrofagi (Denic i sar., 2011).



Na kraju, važno je naglasiti da, pored značaja koji EAE ima za ispitivanje ključnih genetskih, patogenetskih i patohistoloških karakteristika MS-e, ovaj eksperimentalni model MS-e je koristan i za *in vivo* proučavanje razvoja i efikasnosti imunskog odgovora koji je posredovan CD4+ T-limfocitima (Petermann i Korn, 2011), kao i organ-specifičnih autoimunskih bolesti koje su posredovane CD4+ T-ćelijama generalno (Constantinescu i sar., 2011).

#### **1.4.2. Modeli EAE-a**

U zavisnosti od korišćene vrste i soja oglednih životinja, aktivnog ili pasivnog načina imunizacije, antigena i adjuvanasa kojima se bolest izaziva, postoji više modela EAE-a. Različiti modeli EAE-a su nastali iz potrebe da se ispituju različiti patogenetski, patohistološki, klinički i terapijski aspekti humane bolesti (Mix i sar., 2011). Klasični EAE je bolest u kojoj imunizacija neuroantigenima u adjuvansu indukuje migraciju aktivisanih autoreaktivnih T-limfocita i monocita kroz hematoencefalnu barijeru u parenhim CNS-a, sa sledstvenom lokalnom inflamacijom (aktivni EAE) (Miller i Karpus, 2007). Alternativno, adoptivni transfer autoreaktivnih ćelija, koje su specifične za neuroantigene, iz imunizovanih donora u naivne ili imunodeficientne singene recipijente, može dovesti do sličnih efekata, indukujući bolest relativno homogenom populacijom T-ćelija koje su specifične za neuroantigene (pasivni EAE) (Miller i Karpus, 2007). Koji će se model EAE-a koristiti u istraživanjima, zavisi, pre svega, od postavljenog cilja istraživanja. Aktivni EAE je važan instrument za ispitivanje razvoja imunskog odgovora posredovanog CD4+ T-limfocitima, kako njegove induktivne, tako i efektorske faze (Teixeira i sar., 2005; Miller i Karpus, 2007). Induktivna faza podrazumeva aktivaciju CD4+ T-ćelija, koje su specifične za epitope neuroantigena, u limfnim čvorovima i slezini, u odgovoru na imunizaciju neuroantigenima (Constantinescu i sar., 2011). Ove ćelije diferenciraju u Th17 ili Th1 limfocite, za koje se smatra da imaju glavnu ulogu u patogenezi EAE-a (Kramer i Gaffen, 2007; McFarland i Martin, 2007). Aktivisane autoreaktivne CD4+ T-ćelije se zatim akumuliraju u slezini, pre migriranja u ciljani organ – kičmenu moždinu (Flügel i sar., 2001). Efektorska faza uključuje prepoznavanje neuroantigena na infiltrirajućim i rezidentnim APC od strane autoreaktivnih CD4+ T-ćelija i pokretanje inflamatorne

kaskade koja rezultuje oštećenjem tkiva i eventualno demijelinizacijom (Miller i Karpus, 2007; Constantinescu i sar., 2011). Najčešće korišćeni antigeni za aktivaciju ćelija koje su specifične za neuroantigene su derivati mijelina: MBP, MOG, PLP, mijelin-asocirani glikoprotein (MAG) i sl. (Mix i sar., 2010). Pored ovih antigena, koriste se i drugi antigeni kao što su neurofascin (NF) 155, NF 156, astrocit-tipični  $Ca^{2+}$ -vezujući protein S100 $\beta$  i dr. (Mix i sar., 2010).

Napredovanje genetskog inženjeringa omogućilo je i razvoj transgenih modela EAE-a, u kojima su T-limfociti oglednih životinja modifikovani da reaguju na specifične neuroantigene i tako spontano razvijaju bolest. Slično, genetske manipulacije omogućavaju indukciju EAE-a u dizajniranim životinjama kojima nedostaje određeni citokin ili imunski molekul, pružajući uvid u detalje molekularnih mehanizama EAE-a, a potencijalno i MS-e (Mix i sar., 2010).

#### ***1.4.3. Polne razlike u kliničkim karakteristikama EAE-a***

Kod glodara se EAE tipično manifestuje flakcidnom (mlitavom) paralizom koja progredira u kaudo-kranijalom smeru (Miller i Karpus, 2007; Mannie i sar., 2009). Patološki klinički nalaz se obično javlja od 7. do 14. dana posle aktivne indukcije EAE-a, a nešto ranije posle adoptivnog transfera aktivisanih T-ćelija koje su specifične za neuroantigene (Mannie i sar., 2009). Ispoljavanje simptoma može biti monofazno, hronično ili relapsno-remitentno (Miller i Karpus, 2007). Patološki proces obično zahvata kičmenu moždinu, a ponekad i cerebelum, kada se u kliničkoj slici javlja ataksija (Katsnelson, 2012). Patohistološki, prisutna je inflamacija, a kod pojedinih modela se može javiti demijelinizacija praćena oštećenjem aksona (Katsnelson, 2012). U nekim slučajevima monofaznog ili relapsno-remitentnog EAE-a se može uočiti i remijelinizacija (Katsnelson, 2012).

Varijabilnost patohistoloških i kliničkih oblika EAE-a, na neki način, odražava heterogenost humane bolesti. Kliničke karakteristike EAE-a zavise od vrste i soja životinja, budući da su osetljivost na indukciju EAE-a i klinički parametri bolesti (težina simptoma, početak, vrhunac i trajanje bolesti), genetski determinisani (Butterfield i sar., 1998; Summers deLuca i sar., 2010). Pored toga, patološki parametri EAE-a zavise i od načina imunizacije, od toga koji je antigen primenjen i od njegove količine, korišćenja adjuvansa, ali i godišnjeg doba kada se indukuje

bolest, uslova pod kojima se čuvaju životinje (pre svega, od prisustva/odsustva različitih patogena na/u životinjama) i sl. (Teuscher i sar., 2004; Baxter, 2007; Miller i Karpus, 2007; Merrill, 2008; Columba-Cabezas i sar., 2009; Pachner, 2011).

U zavisnosti od vrste, soja i uzrasta oglednih životinja, ali i načina imunizacije, primenjenog antigena i adjuvansa, kao i drugih varijacija u eksperimentalnom protokolu, smer polnih razlika u osetljivosti na indukciju i maksimalnom neurološkom znaku EAE-a može biti varijabilan. Konkretno, ispitivanja na SJL/J miševima sugerišu da su ženke ovog soja osetljivije na adoptivni transfer CD4+ T-ćelija koje su specifične za MBP od mužjaka (Cua i sar., 1995a; Voskuhl i sar., 1996; Dalal i sar., 1997). Zatim, mužjaci Lewis pacova su pokazali veću osetljivost na indukciju EAE-a pasivnim transferom autoreaktivnih ćelija od ženki ovog soja (Willenborg i sar., 1986). Slično, i mužjaci pacova PVG soja su osetljiviji na indukciju aktivnog EAE-a imunizacijom MBP-om u kompletnom Freundovom adjuvansu (KFA), dok su ženke ovog soja rezistentne na indukciju bolesti (Staykova i sar., 2002). Takođe, motorni deficit je bio teži kod mužjaka pacova Dark Agouti (DA) soja imunizovanih kičmenom moždinom zamorčeta nego kod ženki (Massella i sar., 2012). Slično je pokazano i kod mužjaka miševa C57BL/6 soja koji su imunizovani peptidom MOG<sub>35-55</sub> (Harpaz i sar., 2012). Papenfuss i njeni saradnici (2004) su najbolje demonstrirali varijabilnost polnih razlika u EAE-u, kada su prikazali veoma heterogene polne razlike (ili odsustvo istih) u osetljivosti, kliničkom toku i težini bolesti kod sedam različitih sojeva miševa imunizovanih neuroantigenima ili peptidima dokazano aktivnim za svaki soj.

Slično kao i kod MS-e, polne razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a i kliničkim manifestacijama bolesti, rezultanta su delovanja genetskih, sredinskih i hormonskih faktora. Ispitivanjem prevalencije gena koji određuju osetljivost na indukciju EAE-a, utvrđeno je da je EAE, kao i MS, usko povezan sa polimorfizmom MHC gena (Encinas i sar., 1996; Olsson i sar., 2000). Međutim, najveći broj genskih lokusa koji određuju kliničke manifestacije EAE-a, nalazi se u regionima genoma koji ne pripadaju kompleksu gena tkivne podudarnosti (Andersson i Karlsson, 2004). Još značajnije, pokazano je da ti genski lokusi imaju polno specifičnu ekspresiju (Buterfield i sar., 1998; Summers deLuca i sar., 2010; Bearoff i sar., 2015).

Ispitivanja uticaja sredinskih faktora koji su povezani sa obolevanjem od MS-e, kao što su deficit vitamina D, stres, infekcije, izloženost toksinima i sl. su pokazala da ovi faktori utiču i na razvoj i kliničku prezentaciju EAE-a (Krementsov i Teuscher, 2013). Osetljivost oglednih životinja na dejstvo pojedinih sredinskih faktora može biti polno dimorfna i, sledstveno, uticati na polni dimorfizam u ispoljavanju EAE-a kod tih životinja (Pankevich i sar., 2011; Kremmentsov i Teuscher, 2013).

Pored genetskih i sredinskih faktora, značajan broj studija ukazuje na moguću važnost polnih steroida za razvoj polnog dimorfizma u EAE-u (Voskuhl i Palaszynski, 2001; van den Broek i sar., 2005; Spence i Voskuhl, 2012). Međutim, treba pomenuti da gonadektomija miševa nastalih ukrštanjem SJL/J i B10.S/SgMcdj sojeva, nije dovela do gubitka polnih razlika u parametrima EAE-a (početak bolesti, klinički znak na vrhuncu bolesti, kumulativni skor, trajanje EAE-a), koji su uočeni kod intaktnih životinja (Fillmore i sar., 2004). Osim toga, gonadektomija je kod istih životinja indukovala pojavu značajnog polnog dimorfizma u incidenci i težini bolesti, koji nije postojao kod intaktnih miševa (Fillmore i sar., 2004). Heterogeni eksperimentalni podaci o uticaju polnih hormona na polni dimorfizam u studijama EAE-a, na različitim sojevima oglednih životinja, bi mogli da impliciraju je taj uticaj sojno specifičan (Papenfuss i sar., 2004). Pored toga, ovakvi rezultati bi mogli da znače da polni hormoni, posredstvom organizacionih (u toku kritičnih perioda razvoja, kao što su perinatalni, peripubertetni), a ne aktivacionih efekata, doprinose razvoju polnog dimorfizma u EAE-u (Arnold, 2009).

Na kraju, treba istaći da, iako su brojni faktori koji utiču na polni dimorfizam u imunskom odgovoru, kao i u incidenci i kliničkom ispoljavanju autoimunskih bolesti, uključujući i MS-u i njen animalni model EAE, identifikovani i opisani, ćelijski i molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi tih dimorfizama do sada nisu u potpunosti razjašnjeni.

## **1.5. Uticaj starenja na polne razlike u autoimunskim bolestima**

### **1.5.1. Uticaj starenja na imunski odgovor i autoimunost**

Tokom hronobiološkog starenja organizma, nervni, endokrini i imunski sistem trpe najviše promena (Gameiro i sar., 2010). Koncept imunološkog starenja (*engl.* immunosenescence) podrazumeva kvantitativne i kvalitativne promene koje nastaju u imunskom sistemu starenjem. One ne znače nužno progresivnu deterioraciju imunskih funkcija, već pre remodelovanje imunskog sistema, pri čemu su neke funkcije oslabljene, a druge ostaju nepromenjene ili čak bivaju pojačane (Caruso i sar., 2013).

Iako su promene usled starenja vidljive u skoro svim ćelijama imunskog sistema (Kohut i Senchina, 2004), najdramatičnije i najkonzistentnije su promene u T-ćelijskom odeljku (Pawelec i sar., 2010). Promena odnosa naivnih i memorijskih T-limfocita, u korist ćelija memorijskog fenotipa, predstavlja važnu karakteristiku starenja (Miller, 1996; Hakim i sar., 2004). Do redukcije populacije naivnih T-ćelija na periferiji dolazi primarno usled involucije timusa i sledstvenog smanjenja timopoeze (Pido-Lopez i sar., 2001). Populacija naivnih T-limfocita je dodatno kompromitovana stalnom aktivacijom ovih ćelija u odgovoru na akutne i hronične antigenske stimuluse, čime stiču memorijski fenotip (Čičin-Šain i sar., 2007). Da bi se kompenzovalo smanjenje timopoeze i očuvao ukupan broj perifernih T-limfocita, dolazi do njihove homeostatske proliferacije (Pawelec i sar., 2010). Deobom, naivne T-ćelije stiču fenotip i karakteristike slične memorijskim T-ćelijama (Surh i Sprent, 2008). Tako se, tokom starenja, populacija naivnih T-ćelija progresivno smanjuje, a populacija memorijskih T-ćelija povećava (Lerner i sar., 1989).

Pored kvantitativnih, imunološko starenje podrazumeva i kvalitativne promene T-ćelija. *In vitro* studije su pokazale defekte u formiranju T-ćelijskih sinapsi, kao i u ranim fazama prenosa aktivacijskih signala, u T-limfocitima starih ljudi i miševa (Miller i sar., 1997; Fülöp i sar., 1999; Tamir i sar., 2000; Pawelec i sar., 2001). Promene u T-ćelijskoj signalizaciji su zabeležene i u naivnim i u memorijskim T-limfocitima starih jedinki (Garcia i Miller, 2002). Pored defekata u ćelijskoj aktivaciji i prenosu signala, i proliferativni odgovor T-limfocita slabi tokom starenja (Campisi, 2001). Smanjena proliferacija T-limfocita, koja je

pokazana kod starih ljudi i miševa, bi se mogla objasniti smanjenjem sinteze IL-2 i ekspresije receptora za IL-2 na površini T-limfocita (Miller i sar., 1996), kao i skraćenjem telomera ostarelih T-limfocita (Campisi, 2001). Koncentracija IL-7, još jednog važnog citokina za razvoj, preživljavanje i proliferaciju T-limfocita (Schluns i sar., 2000), se takođe smanjuje starenjem (Andrew i Aspinall, 2002; Kang i sar., 2004).

U starenju su uočene i brojne fenotipske promene T-ćelija (Goronzy i Weyand, 2003). Jedna od najupadljivijih promena je gubitak površinske ekspresije važnog kostimulatornog molekula CD28, što je tipično za ćelije koje su se ekstenzivno delile (Weyand i sar., 1998; Batliwalia i sar., 2000; Chamberlein i sar., 2000). Imajući u vidu važnu ulogu CD28 za aktivaciju i preživljavanje T-limfocita (June i sar., 1990), smatralo bi se da njegovo odsustvo implicira T-ćelijsku anergiju i povećanu sklonost ka apoptozi starih ćelija (Goronzy i Weyand, 2013). Međutim, pokazano je da su CD28- T-ćelije koji se akumuliraju starenjem, a posebno CD4+CD28- T-ćelije, otporne na proapoptotske signale i da imaju izražena proinflamatorna svojstva i važnu ulogu u patogenezi autoimunskih poremećaja (Schrimmer i sar., 1998; Vallejo i sar., 2000, Goronzy i Weyand, 2003). Pored smanjenja ekspresije CD28, smanjena je ekspresija i drugih aktivacijskih markera na površini T-limfocita (CD69, CD27, CD25) (Goronzy i Weyand, 2012), što govori u prilog izmenjenom procesu aktivacije T-limfocita u starenju (Fülöp i sar., 1999).

Sinteza brojnih citokina koji učestvuju u imunskim/inflamacijskim procesima se takođe smanjuje u starenju (Straub, 2000). Pokazano je da je ekspresija gena za IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4 i faktor transformacije rasta- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) u kostnoj srži, slezini i limfnim čvorovima pacova uzrasta 12 meseci, bila veća nego kod pacova uzrasta 3 meseca, dok je kod životinja uzrasta 24 meseca bila manja od koncentracije izmerene kod onih uzrasta 3 i 12 meseci (Pachówka i sar., 2011). Smanjenje sinteze citokina tokom starenja zabeleženo je i u humanim mononuklearnim ćelijama (Hirokawa i sar., 2013).

Promene uzrokovane imunološkim starenjem stvaraju i predispoziciju za povećanu autoimunost (Vadasz i sar., 2013), što, na prvi pogled, deluje paradoksalno u odnosu na oslabljenu imunsku reaktivnost. *Vice versa*, pokazano je da osobe koje boluju od autoimunskih bolesti pokazuju znake prevremenog

imunološkog starenja (Prelog, 2006). Na T-ćelijskom nivou, homeostatska proliferacija, inače esencijalna za očuvanje ukupnog broja T-limfocita u uslovima smanjene timopoeze, se smatra jednim od glavnih predisponirajućih mehanizama povećane autoimunosti kod starih jedinki. Naime, homeostatska proliferacija favorizuje selekciju T-limfocita sa većim aviditetom za sopstvene peptide, nižim pragom aktivacije i izraženim proinflamatornim svojstvima (Tatari-Calderone i sar., 2012; Vadasz i sar., 2013). Akumulacija CD4+CD28- T-ćelija starenjem, takođe doprinosi povećanoj autoimunosti (Weyand i sar., 2003), budući da su ove ćelije autoreaktivne, imaju izražena proinflamatorna svojstva i smanjenu osetljivost na indukciju apoptoze, kojom se fiziološki ograničava imunski proces (Schmidt i sar., 1996).

Starenje smanjuje efikasnost anatomskih barijera, što dovodi do olakšane invazije patogena, ali potencijalno i do ekspozicije prethodno sekvestriranih sopstvenih antigena (Hasler i Zouali, 2005). Kumulativno oštećenje izazvano reaktivnim oblicima kiseonika, hroničnim inflamatornim procesima i konkomitantnim patologijama, doprinosi oslobađanju skrivenih antigena (Lindstrom i Robinson, 2010). Osim toga, i sopstveni antigeni trpe promene uslovljene starenjem, koje povećavaju njihovu imunogenost (Hasler i Zouali, 2005). Takođe, neefikasna eliminacija infektivnih agenasa može da predisponira autoimunski proces, mehanizmom ukrštene reaktivnosti ili interferiranjem sa signalnim procesima koji regulišu imunski odgovor (Hasler i Zouali, 2003). Svi navedeni fenomeni su prisutni u starenju i mogu indukovati imunski odgovor na sopstvene/izmenjene antigene.

Međutim, važno je istaći da se incidenca autoimunskih bolesti, uključujući i MS-u, generalno ne povećava kod starih (Vollmer i Waxman, 1991; Tatari-Calderone i sar., 2012; Vadasz i sar., 2013). Jedan od mehanizama kojima imunski sistem balansira povećanu autoimunost u starenju je ekspanzija adaptivnih Treg ćelija na periferiji (Vadasz i sar., 2013), čiji se broj kod starih povećava i do 2,4 puta (Montoya-Ortiz, 2013). Ove ćelije nastaju aktivacijom zrelih konvencionalnih T-limfocita, pod specifičnim uslovima suboptimalnog izlaganja antigenima i/ili kostimulaciji, usled kumulativnog oštećenja tkiva starenjem i perzistentnih infekcija (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009; Josefowicz i Rudensky, 2009).

Na kraju, treba istaći da sve opisane promene koje nastaju u T-ćelijskom odeljku starenjem, u kliničkom smislu imaju dvostruke posledice. Sa jedne strane, intrinzične promene u T-limfocitima koje nastaju starenjem i, sledstveno, smanjena efikasnost imunskog odgovora, uz ekspanziju regulatornih ćelija na periferiji, onemogućavaju razvoj autoimunskih bolesti i pored povećanja autoimunskih fenomena u starenju (Vadasz i sar., 2013). Međutim, s druge strane, ove promene doprinose povećanom morbiditetu od infekcija kod starih, koje kod ove populacije imaju teži tok i lošiji ishod (Gavazzi i Krause, 2002; Jackson i sar., 2001), što je delimično posledica i slabijeg vakcinalnog odgovora kod starih jedinki (Aspinall i sar., 2007; Jackson i sar., 2001, Giefing-Kröll i sar., 2015). Još jedna posledica smanjene imunske reaktivnosti na nove antigene i veće supresije imunskog odgovora od strane regulatornih ćelija, je veća incidenca malignih bolesti kod stare populacije (Bulati i sar., 2008, Vadasz i sar., 2013).

### ***1.5.2. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru***

Literaturni podaci jasno ukazuju da je proces starenja imunskog sistema polno dimorfan (Caruso i sar., 2013) i da koincidira sa promenama u hormonskom statusu (Furman, 2015). Polne razlike u efektima starenja zabeležene su u svim životinjskim vrstama (Tower i Arbeitman, 2009). Kod ljudi, i ostalih vrsta sa XY determinacionim sistemom polova, starenje ima veći uticaj na muški nego na ženski pol (Tower i Arbeitman, 2009), što se ogleda i u dužem životnom veku žena (Van Oyen i sar., 2012).

Glavne biološke determinante za duži životni vek žena, pored rodno specifičnih činilaca i onih vezanih za životni stil, su genetski, imunski i hormonski faktori (Giefing-Kröll i sar., 2015). Tako, jedan od faktora koji bi mogao da bude odgovoran za brže starenje muškaraca u odnosu na žene je brzina skraćanja telomera, koja je veća kod muškaraca (Barrett i Richardson, 2011). Moguće je da je ovaj fenomen posledica delovanja polnih hormona, budući da estrogen stimuliše transkripcioni faktor c-myc koji stimuliše telomerazu, što bi moglo da ima „anti-ageing“ efekat na ćelije ženki (Kyo i sar., 1999). S obzirom na to da dugovečnost pozitivno korelira sa boljom očuvanošću imunskih funkcija (Francheschi i sar., 1995), duži životni vek žena nego muškaraca sugeriše da je imunski sistem kod



žena efikasniji tokom dužeg perioda života (Aspinall, 2000). U prilog tome govori i manja stopa mortaliteta usled infekcija kod žena, u poređenju sa muškarcima, tokom starenja (Aspinall, 2000).

Bolju očuvanost imunskih funkcija kod žena nego kod muškaraca su pokazale i studije na relativno velikim uzorcima humanih populacija koje su ispitivale promene u imunskom sistemu povezane sa starenjem (García Verdecia i sar., 2013; Hirokawa i sar., 2013). Ukupan broj T-ćelija, broj T-ćelija naivnog fenotipa (CD4+CD45RA+ T-ćelije), proliferativni odgovor T-ćelija, kao i broj B-ćelija, se tipično smanjuju starenjem kod oba pola, ali su kod muškaraca te promene prominentnije nego kod žena (Hirokawa i sar., 2013). Takođe, smanjenje sinteze citokina u kulturama limfocita starih osoba, u odnosu na kulture limfocita mladih, je izraženije kod muškaraca nego kod žena (Hirokawa i sar., 2013).

Na kraju, može se reći da uprkos tome što je polni dimorfizam u imunskim funkcijama uočen kod mladih i starih jedinki, podaci vezani za eventualne promene u njegovoj izraženosti ili smeru su krajnje oskudni, a ćelijski i molekularni mehanizmi odgovorni za ovaj fenomen još uvek nedovoljno ispitani.

### **1.5.3. Uticaj starenja na incidencu i kliničke karakteristike MS-e**

Ispitivanje uticaja starenja na MS-u podrazumeva dva aspekta: (i) uticaj uzrasta na pojavu MS-e i (ii) uticaj starenja na osobe koje već boluju od MS-e. MS se tipično javlja između 20. i 40. godine, a vrlo retko se prvi put ispoljava još u pubertetu (Ghezzi, 2010). Oblik bolesti u kojem se pojava prvih simptoma javlja posle 50. godine (*engl.* late-onset MS, LOMS), je redak i učestvuje sa 0-12% u ukupnoj prevalenci MS-e (Bove i sar., 2012). Veoma kasni početak bolesti, posle 60. godine (*engl.* very late onset MS, VLOMS), je vrlo redak (manje od 1% obolelih od MS) (Bove i sar., 2012).

U literaturi za sada ne postoji konsenzus o korelaciji između uzrasta u kojem bolest počinje i njene progresije. Pojedine studije sugerišu da je vremenski period potreban za razvoj blage ili srednje onesposobljenosti duži kod MS-e sa ranim početkom (peripubertetni period ili, izuzetno retko, u detinjstvu), nego kod one kod koje se prve manifestacije javljaju u adultnom/kasnom uzrastu (Simone i sar., 2002). Međutim, druge studije ukazuju da rani početak bolesti češće dovodi do

težih posledica (Ozakbas i sar., 2012). Sa druge strane, pokazano je da su primarno-progresivni tok MS-e i motorni ispadi češći kod LOMS-e (Kis i sar., 2008).

Stare osobe koje već boluju od MS-e, pokazuju brže napredovanje ka ireverzibilnoj onesposobljenosti, kao posledica progresivnog gubitka aksona i kumulativnih neuroloških oštećenja, ali i sinergističkih efekata starenja (Stern i sar., 2010). Pored toga, starije osobe su osetljivije na neželjene efekte terapije, što dodatno otežava modifikaciju bolesti kod ove populacije obolelih od MS-e (Stern i sar., 2010).

Uticaj starenja na polne razlike tokom evolucije MS-e kod ljudi koje boluju od ove bolesti je malo ispitivan, ali neka istraživanja pokazuju da hormonalne promene u menopauzi dovode do gubitka polnog dimorfizma u kliničkim karakteristikama MS-e (Bove i sar., 2012).

Promene u incidenci i kliničkim manifestacijama MS-e koje se javljaju tokom starenja kod žena koje boluju od ove bolesti, povezuju se sa hormonalnim promenama koje nastaju usled menopauze (Bove i Chitnies, 2013; Christianson i sar., 2015). Međutim, podaci o promenama kliničkih ispoljavanja MS-e posle menopauze su inkonzistentni. Naime, približno polovina bolesnica u studijama sa relativno malim brojem ispitanica je prijavila pogoršanje simptoma posle menopauze (Smith i Studd, 1993; Holmqvist i sar., 2006). S druge strane, povezanost između menopauze i simptoma MS-e nije uočena u istraživanju na velikoj kohorti bolesnica (Wundes i sar., 2011). Smatra se da izvesnu ulogu u heterogenim rezultatima različitih studija imaju i metodološke razlike između istraživanja (Bove i sar., 2012).

Nekoliko studija koje su ispitivale pojavu MS-e u starijem uzrastu je pokazalo da je u LOMS kohorti bilo više muškaraca, sugerišući da je ženski pol faktor rizika za ranu pojavu MS-e (Polliack i sar., 2001; Tremlett i Devonshire, 2006). Međutim, uočeno je da se kliničke manifestacije MS-e razlikuju kod žena koje obolevaju u odmaklom dobu, u odnosu na one kod kojih se bolest javlja u adultnom uzrastu. Naime, žene koje oboljevaju od LOMS-e imaju veće poteškoće sa koordinacijom pokreta od žena kod kojih se MS prvi put manifestuje u reproduktivnom periodu (Polliack i sar., 2001; Tremlett i Devonshire, 2006). U kontekstu polnih razlika, kod muškaraca LOMS ima progresivniji tok i dovodi do težeg motornog deficita u

odnosu na žene koje boluju od ovog oblika bolesti (Polliack i sar., 2001; Tremlett i Devonshire, 2006).

#### **1.5.4. Uticaj starenja na osetljivost na indukciju i kliničke karakteristike EAE-a**

Studije o uticaju starenja na osetljivost ogleđnih životinja na indukciju EAE-a i težinu bolesti su retke i sa konfliktnim rezultatima. Generalno, stare životinje su manje osetljive na indukciju EAE-a (Chitnis i Weiner, 2011). Na primer, pokazano je da se kod ženki DA pacova, starenjem smanjuje incidenca bolesti, kao i težina neurološkog deficita (Djikić i sar., 2014; 2015). Smanjenje osetljivosti na indukciju EAE-a starenjem pokazano je i kod mužjaka pacova Wistar (Ditamo i sar., 2005) i Fisher 344 soja (Levine i Sowinski, 1976), ženki miševa C57BL/6 (Tatari-Calderone i sar., 2012) i BALB/c soja, iako su u tom soju pojedine ženke pokazivale histološke znake EAE-a, ali bez kliničkih manifestacija bolesti (Endoh i sar., 1990). Smanjenje osetljivosti na indukciju EAE-a starenjem je koreliralo sa smanjenom sposobnošću reaktivacije i proliferacije T-limfocita (Endoh i sar., 1990; Ditamo i sar., 2005; Djikić i sar., 2014). Pored toga, pojedine studije su ukazale na smanjenje sinteze citokina (Endoh i sar., 1990), ili kvalitativno drugačiji citokinski profil T-limfocita ("skretanje" ka Th2 tipu imunskog odgovora) kod starih životinja (Ditamo i sar., 2005), kao na potencijalne mehanizme koji stoje iza smanjene osetljivosti na indukciju EAE-a kod ovih životinja. Takođe, povećanje zastupljenosti Treg ćelija starenjem, verovatno doprinosi restrikciji razvoja EAE-a kod starih životinja (Djikić i sar., 2014; 2015). Međutim, postoje studije koje ukazuju i da se starenjem osetljivost na indukciju i težina bolesti povećavaju. Na primer, pokazano je da se starenjem gubi rezistencija mužjaka miševa soja SJL/J na indukciju EAE-a i da je za to odgovoran polimorfizam gena na Y hromozomu. Takođe, ova studija je pokazala da se kod životinja oba pola, težina bolesti značajno povećava starenjem (Spach i sar., 2009). Klinički teži EAE kod starih ženki miševa soja C57BL/6J se povezuje sa povećanom ekspresijom brojnih gena uključenih u regulaciju odgovora na stres i akutni inflamatorni odgovor kod starih miševa ovog soja (Seo i sar., 2013).

Inkonzistentni rezultati različitih studija koje ispituju uticaj starenja na EAE, verovatno su, pre svega, posledica genetskih razlika između pojedinih vrsta i

sojeva oglednih životinja, kao i razlika u njihovom hronološkom/biološkom uzrastu, ali i različitih protokola za indukciju bolesti (Ben-Nun i sar., 1980; Källén i Nilsson, 1989; Endoh i sar., 1990; Lydowik i sar., 1993; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005; Tatari-Calderone i sar., 2012).

Za sada nema egzaktnih podataka o polnim razlikama u incidenci i težini EAE-a kod starih životinja. Ispitivanja koja su sproveli Spach i njeni saradnici (2009) samo sugerišu da bi polni dimorfizam u osetljivosti na EAE mogao da se menja sa uzrastom. Još manje ima podataka o ćelijskim i molekularnim mehanizmima koji bi mogli da stoje u osnovi polnog dimorfizma kod starih oglednih životinja i čoveka.

## 2. CILJEVI

Imajući u vidu sve navedeno u uvodu ove doktorske disertacije, ključni ciljevi disertacije su bili da se:

1. ispituju polne razlike u kliničkim parametrima EAE-a kod mladih pacova i, ukoliko se utvrdi da one postoje, da se identifikuju ćelijski i molekularni mehanizmi koji su odgovorni za te razlike;

2. ispita da li dolazi do promene u polnom dimorfizmu u kliničkim manifestacijama EAE-a kod starih pacova i, ako je odgovor pozitivan, da se utvrde ćelijski i molekularni mehanizmi koji su odgovorni za taj fenomen.

U cilju realizacije ovih ciljeva, postavljena su dva zadatka:

1. Da se kod životinja oba pola i uzrasta u drenirajućem limfnom čvoru (u induktivnoj fazi bolesti) i ciljnom organu - kičmenoj moždini (u različitim fazama bolesti) ispituju fenotipske i funkcijske karakteristike T-limfocita (naročito CD4+ T-limfocita, koji se smatraju ključnim efektorskim ćelijama u EAE-u), određivanjem:

(i) procentualne zastupljenosti različitih efektorskih i imunoregulatornih subpopulacija T-limfocita;

(ii) aktivacijskog statusa CD4+ T-limfocita;

(iii) funkcijskog kapaciteta CD4+ T-limfocita (meranjem sinteze/sekrecije različitih proinflammatoryh i anti-inflammatoryh/imunoregulatornih citokina).

2. Da se kod životinja oba pola i uzrasta u drenirajućem limfnom čvoru (u induktivnoj fazi bolesti) i ciljnom organu - kičmenoj moždini (u različitim fazama bolesti) ispita fenotipski profil i funkcijski kapacitet APC i/ili efektorskih mijelodnih ćelija (dendrićke ćelije, makrofagi/mikroglija), određivanjem:

(i) procentualne zastupljenosti različitih subpopulacija ovih ćelija;

(ii) njihovog aktivacijskog statusa;

(iii) njihovog funkcijskog kapaciteta (određivanjem ekspresije iRNK/sekrecije proinflammatoryh i anti-inflammatoryh/imunoregulatornih citokina i drugih bioaktivnih molekula koji su relevantni za patogenezu bolesti).

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Ogledne životinje**

U eksperimentalnom radu korišćene su ženke i mužjaci pacova srodničkog DA soja, uzrasta 3 meseca (mlade adultne životinje) i 22-26 meseca (stare životinje). Pacovi su gajeni u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Pacovi su uzgajani u standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , relativna vlažnost vazduha 50% - 60%, režim smenjivanja svetla i mraka u intervalima od 12h i *ad libitum* pristup hrani i vodi. Životinje su bile smeštane u grupama od po tri pacova istog pola i uzrasta, u providne kaveze od pleksiglasa sa sterilnom piljevinom.

Mladim ženkama uzimani su vaginalni brisevi tokom dve nedelje pre imunizacije za EAE i u eksperiment su uključene samo one životinje koje su imale najmanje 2 regularna estrusna ciklusa. Na dan žrtvovanja, ove životinje su se nalazile u različitim fazama estrusnog ciklusa. Vaginalni brisevi starih ženki pacova pokazali su postojanje konstantnog estrusa.

#### **3.2. Eksperimentalni protokol**

Istraživanja iz kojih je proistekao ovaj rad su obuhvatila dve velike grupe eksperimenata.

U prvoj grupi eksperimenata, korišćene su mlade, a u drugoj stare životinje. U obe grupe eksperimenata, imunizovane životinje su deljene u tri podgrupe. Jedna podgrupa je žrtvovana 7. dana posle imunizacije (d.p.i.) (induktivna faza bolesti), druga na vrhuncu bolesti - 13. d.p.i. (mlade) odnosno 14. d.p.i. (stare), a treća podgrupa životinja je ostavljena za praćenje kliničke slike bolesti. Sve životinje su pregledane svakodnevno, počevši od 7. d.p.i, između 9 i 10 časova pre podne, do dana žrtvovanja, odnosno do 30. d.p.i. (životinje koje su ostavljene za praćenje kliničke slike EAE-a). Dan na koji su životinje imunizovane označen je kao „nulti“ dan.

Pored opisanih eksperimentalnih grupa, za analizu polnih razlika u procentu aktivacije CD4+ T-limfocita, korišćene su i intaktne (neimunizovane) životinje oba pola i uzrasta.

Na dan žrtvovanja, životinje su anestetizirane intraperitonealnim davanjem rastvora u čiji je sastav ulazio ketamin - 100 mg/ml; Ketamidol, Richter Pharma AG, Wels, Austria i ksilazin - 20 mg/ml; Xylased, Bioveta, Ivanovice na Hané, Czech Republic i čist fiziološki rastvor, u odnosu 1:0,5:8,5. Životinje su dobijale 80 mg/kg telesne težine ketamina i 8 mg/kg telesne težine ksilazina. Anestetizirane životinje su zatim perfundovane intrakardijalno, fosfatnim puferom (pH 7,3). Posle perfuzije, iz životinja su izolovani: (i) 7. d.p.i, poplitealni limfni čvorovi iz nožice u koju su imunizovane (drenirajući limfni čvorovi) i kičmena moždina, a (ii) 13. d.p.i. (mladi), odnosno 14. d.p.i. (stari pacovi), kičmena moždina.

Sedmog d.p.i, ispitivano je:

- (i) procentualna zastupljenost glavnih subpopulacija T-limfocita i APC, ekspresija aktivacijskih markera na CD4+ T-ćelijama izolovanih iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine;
- (ii) proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora, u kulturi, u bazalnim uslovima i u prisustvu MBP-a i konkanavalina A (*engl.* Concanavalin A, ConA);
- (iii) procentualna zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija drenirajućeg limfnog čvora i njihov supresorski kapacitet u klasičnom *in vitro* testu supresije;
- (iv) ekspresija proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u T-limfocitima izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine;
- (iv) koncentracija proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine;
- (v) ekspresija iRNK za citokine koji učestvuju u polarizaciji CD4+ T-limfocita i za faktor nekroze tumora- $\alpha$  (*engl.* tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) i iNOS u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine,
- (vi) ekspresija iRNK za hemokin CXCL12 (*engl.* chemokine (C-X-C motif) ligand 12) u tkivu kičmene moždine.

Trinaestog (kod mladih), odnosno 14. (kod starih pacova) d.p.i, ispitivano je:

- (i) prisustvo inflamatornih lezija na presecima tkiva kičmene moždine obojenih hematoksilinom i eozinom, odnosno prisustvo demijelinizacije na presecima obojenim Luxol fast plavom bojom, kao i površina preseka kičmene moždine koju zauzimaju ćelije koje ispoljavaju ED1 (CD68) molekul (marker aktivisane

mikroglije i makrofaga) (Jones i sar., 2004) na presecima kičmene moždine korišćenjem imunohistohemijske metode;

(ii) procentualna zastupljenost glavnih subpopulacija T-limfocita i ekspresija aktivacijskih markera na CD4+ T-ćelijama izolovanih iz kičmene moždine;

(iii) apoptoza CD4+ T-ćelija izolovanih iz kičmene moždine;

(iii) procentualna zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija izolovanih iz kičmene moždine;

(iv) ekspresija proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u T-limfocitima izolovanim iz kičmene modine;

(iv) koncentracija proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine.

(v) ekspresija iRNK za citokine koji učestvuju u polarizaciji CD4+ T-limfocita, TNF- $\alpha$ , iNOS i arginazu-1 (Arg-1) u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine;

(vi) zastupljenost različito aktivisanih subpopulacija CD11b+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine.

### **3.3. Indukcija EAE-a, klinička i histopatološka evaluacija EAE-a**

#### **3.3.1. Indukcija EAE-a**

Mladi i stari pacovi oba pola imunizovani su encefalitogenom pastom pripremljenom od homogenata kičmene moždine singenih životinja, koji je emulgovan u KFA-u. Kičmena moždina (1g) je homogenizovana u 2,5 ml fiziološkog rastvora u homogenizeru na +4<sup>0</sup>C. Jednake zapremine (2,5 ml) homogenata kičmene moždine i KFA su zatim pomešane uz pomoć špriceva zapremine 10 ml, spojenih plastičnom spojnicom, vodeći računa da se vodena faza prvo potisne u uljanu, kako bi se obezbedila encefalitogenost emulzije (Beeton i sar., 2007). Emulzija je zatim energično potiskivana kroz spojene špriceve, uz povremeno hlađenje na +4 <sup>0</sup>C, sve do konzistencije čvrste paste koja ostaje kompaktna i kada se pasta stavi u vodu. Sto  $\mu$ l paste ovakve konzistencije je ubrizgavano plantarno (intradermalno) u zadnju desnu šapicu životinja. U istu šapicu je ubrizgavano dorzalno (supkutano) 250  $\mu$ l 5  $\times$  10<sup>8</sup> suspenzije Bordetellae pertussis, budući da je



pokazano da pertusis toksin povećava propustljivost hemato-encefalne barijere i olakšava transmigraciju ćelija iz periferne krvi u CNS (Bergman i sar., 1978).

### ***3.3.2. Analiza neurološkog deficita kod pacova***

Težina kliničke slike bolesti procenjavana je na osnovu ispoljavanja neurološkog deficita, a prema skali: 0, odsustvo bolesti; 0,5, atonija distalog dela repa; 1, potpuna atonija repa; 2, pareza (slabost) zadnjih ekstremiteta; 3, paraliza (oduzetost) zadnjih ekstremiteta; 4 paraliza zadnjih i prednjih ekstremiteta (kvadriplegija) praćena inkontinencijom, moribundno stanje.

### ***3.3.3. Analiza histoloških promena u kičmenoj moždini***

Za histopatološku analizu EAE-a, tri mlada mužjaka (srednji maksimalni klinički znak 3) i tri mlade ženke (srednji maksimalni klinički znak 2) su bili anestezirani kao što je prethodno opisano. U dubokoj anesteziji su kroz levu srčanu komoru perfundovani fosfatnim puferom, a zatim 4% paraformaldehidom. Kičmene moždine su zatim pažljivo izvađene, podeljene na 3 segmenta (cervikalni, torakalni i lumbo-sakralni) i fiksirane preko noći u 4% formaldehidu. Posle fiksacije, svaki segment je bio dodatno podeljen na serijske preseke debljine 3 - 4 mm, koji su zatim zajedno ukalupljeni u jedan parafinski blok. Transverzalni preseki ukalupljenog tkiva debljine 5  $\mu$ m, dobijeni upotrebom mikrotoma (Leica RM 2155, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka), bojeni su hematoksilinom i eozinom i ispitivani na postojanje karakterističnih histopatoloških znakova inflamacije, prema sledećoj skali: 0, bez prisustva inflamatornih ćelija; 1, malo pojedinačnih inflamatornih ćelija; 2, organizovani perivaskularni inflamatorni ćelijski infiltrati; 3, ekstenzivni perivaskularni ćelijski infiltrati sa širenjem u okolni subarahnoidalni prostor i parenhim kičmene moždine (Day, 2005). Pregledan je približno svaki 150. presek svakog od 3 segmenta kičmene moždine (ukupno 60 preseka: po 15 iz cervikalnog i lumbo-sakralnog i 30 iz torakalnog segmenta).

Za detekciju demijelinizacije, preseki susedni onima koji su bojeni hematoksilinom i eozinom su bojeni Luxol fast plavom bojom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka).

Za detekciju ćelija koje ispoljavaju ED1 antigen, dodatni preseći (po 5 iz cervikalnog i lumbo-sakralnog i 10 iz torakalnog segmenta kičmene moždine svakog pacova), uzorkovani iz približno podjednako udaljenih nivoa kičmene moždine, podvrgnuti su imunohistohemijskom bojenju upotrebom ED1 (1:150) monoklonskog antitela koje je konjugovano sa biotinom. Antitela su razblažena korišćenjem komercijalno dostupnog reagensa za smanjivanje nespecifičnog bojenja (Background Reducing Antibody Diluent, DakoCytomation, Glostrup, Danska), dok je za ispiranja između pojedinih koraka korišćen fosfatni pufer (pH 7,3). Tkiva su prvo deparafinisana upotrebom ksilola, a zatim hidratizirana u seriji alkohola opadajuće koncentracije. Pre započinjanja procedure imunohistohemijskog bojenja, preseći su zagrevani 21 minut u komercijalno dostupnom rastvoru za demaskiranje epitopa (Target Retrieval Solution, DakoCytomation), u mikrotalasnoj pećnici, kako bi se povratila nativna konformacija antigena ispoljenih na ćelijama. Aktivnost peroksidaze prisutne u ćelijama suprimirana je inkubacijom preseka u vodenom rastvoru 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je nespecifično vezivanje antitela onemogućeno nanošenjem 2,5% konjskog seruma na preparate. Preseći su zatim inkubirani sa ED1 antitelima na +4 °C preko noći. Posle inkubacije preparati su tretirani rastvorom koji je sadržao kompleks avidina i peroksidaze izolovane iz rena koja je konjugovana sa biotinom (ABC reagens), iz Vectastain elite ABC kita za detekciju (Vector Laboratories, Inc.). Za vizualizaciju enzimom obeleženog ED1 antigena korišćen je rastvor 3',3'-diaminobenzidina (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Inc.), koji, u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i peroksidaze, dovodi do formiranja precipitata braon boje. Nakon dostizanja optimalnog intenziteta bojenja, reakcija je prekinuta ispiranjem u vodi, preseći su kontrastirani u rastvoru hematoksilina i montirani korišćenjem odgovarajućeg vodenog medijuma (Faramount Aqueous Mounting Medium, DakoCytomation).

Za analizu preparata korišćen je mikroskop Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan), opremljen digitalnom kamerom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Nemačka) i pripadajućim softverom (*engl.* software) Analysis FIVE (Olympus). Za kvantifikaciju ćelija koje ispoljavaju ED1, korišćen je softver Image J (Rasband, 1997-2014), kao što je prethodno opisano

(Donnelly i sar., 2009). Površina koju zauzimaju ćelije koje eksprimiraju ED1 izražena je kao % ukupne analizirane površine.

### 3.4. Hemikalije, antitela i imunokonjugati

Za pripremu encefalitogene paste korišćen je KFA sa 1 mg/ml inaktivisanih *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, 0,85 ml parafinskog ulja i 0,15 ml manid monooleata (Sigma-Aldrich). Fiziološki rastvor (0,9 % m/V rastvor NaCl u redestilovanoj sterilisanoj vodi) i suspenziju inaktivisanih bakterija *Bordetella pertussis*, obezbedio je Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak".

Za pripremu tkiva za histopatološku analizu, korišćen je 4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich). Korišćeni su još i hematoksin (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka), eozin (Sigma-Aldrich), etanol p.a. (Alkaloid, Skopje, Makedonija) i ksilol (o-m-p-Ksilol, Zorka Pharmacy, Šabac).

Za izdvajanje mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine korišćen je komercijalni gustinski gradijent Percoll® (Sigma-Aldrich). Gradijenti različitih gustina dobijeni su tako što je 450 ml komercijalnog Percoll-a gustine 1,13 g/ml pomešano sa 50 ml 10× koncentrovanog fosfatnog pufera, kako bi se dobio izotonični Percoll ( $\rho = 1,122$  g/ml). Gradijent gustine 1,085 g/ml (70% Percoll) je dobijen tako što je 70 ml izotoničnog Percoll-a pomešano sa 30 ml fosfatnog pufera, a gradijent gustine 1,048 g/ml je dobijen tako što je 40 ml izotoničnog Percoll-a pomešano sa 60 ml fosfatnog pufera. Gradijenti su pripremani jedan dan pre eksperimenta i čuvani na +4 °C. Na dan eksperimenta, gradijenti su temperirani na sobnu temperaturu pre nalivanja.

Za magnetno razdvajanje ćelija limfnih čvorova i kičmene moždine (*engl.* magnetic-activated cell sorting, MACS) na osnovu ekspresije površinskih antigena, korišćene su mikročestice (*engl.* MicroBeads) vezane za anti-CD6 (klon OX-52, Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) antitelo, zatim mikročestice vezane za anti-CD8 (clone G28, Miltenyi Biotec) i anti-CD45RA (klon OX-33, Miltenyi Biotec) antitela, kao i anti-biotin mikročestice (Miltenyi Biotec) i LS kolona (Miltenyi Biotec), uz odgovarajući magnetni separator (Quadro MACS separator) (Miltenyi Biotec). Ćelije su tokom izvođenja procedure magnetne separacije bile prane u MACS puferu koji je sadržao fosfatni pufer, 2mM etilendiamintetrasirćetne kiseline

(EDTA) (Fluka AG Chemie GmbH, Buchs SG, Švajcarska) i 0,5% goveđeg serumskog albumina (*engl.* bovine serum albumine, BSA) (Fluka AG Chemie GmbH).

Za kultivisanje ćelija limfnog čvora i kičmene moždine korišćen je RPMI-1640 medijum (Sigma-Aldrich), obogaćen sa 2 mM L-glutaminom (Serva, Heidelberg, Nemačka), 25 mM N-2-hidroksietilpiperazin N'-2-etansulfonskom kiselinom (HEPES) (Sigma-Aldrich), 1 mM natrijum piruvatom (Serva), 100 i.j./ml penicilinom (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), 100 µg/ml streptomycinom (ICN), kao i fetalnim telećim serumom (*engl.* fetal calf serum, FCS) (Gibco, Grand Island, NY, SAD), u koncentraciji od 10%. FCS je prethodno inaktivisan zagrevanjem na 56 °C u vodenom kupatilu 30 minuta.

Za obeležavanje membranskih i unutarćelijskih antigena, korišćena su sledeća monoklonska antitela: anti-CD4 (klon OX-38) antitelo konjugovano sa fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili fikoeritrinom (PE), anti-CD8 (klon OX-8) antitelo konjugovano sa FITC-om/PE-om/biotinom, anti-TCR $\alpha\beta$  (klon R73) antitelo konjugovano sa peridinim hlorofil proteinom (*engl.* Peridinim chlorophyll protein, PerCP), anti-CD134 (klon OX-40) i anti-CD45 (klon OX-1) antitela konjugovana sa biotinom, anti-CD161 (klon 1/78) i anti-IFN- $\gamma$  (klon DB-1) antitela konjugovana sa FITC-om, anti-IL17A (klon TC11-18H10) i anti-IL-10 (klon A5-4) antitela konjugovana sa PE-om, anti-CD45RA (klon OX-33) antitelo konjugovano sa tandem konjugatom koji kombinuje PE i cijaninsku boju (PE-Cy<sup>™</sup>5), anti-CD11b (klon WT.5) antitelo konjugovano sa biotinom, anti-CD3 (NA/LE, klon G4.18) i anti-CD28 (NA/LE, clone JJ319) antitela, koja su nabavljena od BD Pharmingen (Mountain View, CA, SAD). Anti-IL-17A (klon eBio17B7) antitelo konjugovano sa FITC-om i anti-CD25 (klon OX-39) antitelo konjugovano sa tandem konjugatom PerCP-eFluor710 su kupljena od eBioscience (San Diego, CA, SAD). Anti-CD11b (klon ED8) antitelo konjugovano sa FITC-om i anti-CD68 (klon ED1) antitelo konjugovano sa biotinom, nabavljeni su od Serotec (Oxford, UK), a anti-TCR $\alpha\beta$  (klon R73) antitelo konjugovano sa Alexa Fluor647 od BioLegend (San Diego, CA, SAD). Streptavidin konjugovan sa PerCP-om i PE-om, kao i odgovarajuće izotipske kontrole su nabavljeni od BD Pharmingen (Mountain View, CA, SAD).

Za analizu apoptotičnih ćelija *ex vivo* korišćen je protein aneksin V (*engl.* annexin V) konjugovan sa FITC-om (BD Bioscience, Pharmingen, Nemačka).

Za bojenje intracelularnog antigena Foxp3 (*engl.* forkhead box p3), korišćen je komercijalni Foxp3 kit koji sadrži monoklonsko anti-Foxp3 (klon FJK-16s) antitelo konjugovano sa FITC-om (eBioscience).

Za stimulaciju mononuklearnih ćelija u cilju određivanja intracelularne ekspresije citokina, korišćeni su: forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) Sigma-Aldrich), jonomicin (Sigma-Aldrich) i brefeldin A (eBioscience).

Za stimulaciju i detekciju vijabilnih proliferišućih CD4+ limfocita u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora, korišćeni su: ConA (Sigma-Aldrich), rekombinantni MBP iz mozga zamorčeta (Sigma-Aldrich) i 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) (BD Biosciences).

Za detekciju proliferišućih ćelija u *in vitro* testu supresije proliferacije od strane CD4+CD25+ ćelija, korišćen je 5(6)-karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estar (CFSE) (Sigma-Aldrich). CFSE je rastvaran u dimetil-sulfoksidu (DMSO) (Sigma-Aldrich). Ova boja tek posle pasivne difuzije u ćeliju i delovanja intracelularnih esteraza postaje fluorescentna, jer nastaje fluorescentni karboksifluorescein sukcinimidil estar. Ovo novonastalo jedinjenje reaguje sa intracelularnim aminima i formira fluorescentne konjugate koji ostaju u ćeliji. Prilikom deobe ćelije, boja se podjednako raspoređuje na ćelije ćerke i ne prenosi se na okolne ćelije.

U procedurama vezanim za analizu ekspresije gena korišćeni su komercijalno dostupni reagensi proizvođača Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD), osim ukoliko nije navedeno drugačije. Izolacija ukupnih ribonukleinskih kiselina (RNK) iz uzoraka je obavljena upotrebom reagenasa u sastavu Total RNA Chemistry Starter Kit-a: rastvori za pranje (Wash Solution 1 i 2), rastvor za spiranje (Elution Solution) i rastvor dezoksiribonukleaze (Absolute RNA Wash Solution). Za transkripciju RNK u komplementarnu dezoksiribonukleinsku kiselinu (*engl.* complementary DNA) (cDNK) korišćene su komponente High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a: pufer za reverznu transkripciju (10× RT Buffer), rastvori nukleotida (25× dNTP Mix) i nasumičnih prajmera (10× RT Random Primers), reverzna transkriptaza (Multiscribe Reverse Transcriptase) i inhibitor aktivnosti ribonukleaze (RNaze) (RNase inhibitor). Umnožavanje metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl.* quantitative real-time

polymerase chain reaction, qRT-PCR) je izvedeno pomoću smeše reagenasa za merenje ekspresije gena (TaqMan Gene Expression Master Mix) i eseja za merenje ekspresije iRNK kod pacova (TaqMan Gene Expression Assays: smeše specifičnih oligonukleotidnih prajmera i proba obeleženih fluorescentnim bojama; Tabela 1).

**Tabela 1. Taqman eseji za RT-qPCR analizu ciljnih i referentnog gena**

Simbol	Ime gena	ID broj <sup>a</sup>	ID eseja
Il6	Interleukin 6	NM_012589.1	Rn99999011_m1
Il1b	Interleukin 1 beta	NM_031512.2	Rn99999009_m1
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	NM_021578.2	Rn00572010_m1
Il23a	Interleukin 23, alpha subunit p19	NM_130410.2	Rn00590334_g1
Il12a	Interleukin 12A (subunit p35)	NM_053390.1	Rn00584538_m1
Il27	Interleukin 27 (subunit p28)	XM_344962.4	Rn01510484_m1
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	XM_340799.3	Rn01456850_m1
Tnf	Tumor necrosis factor	NM_012675.3	Rn99999017_m1
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible	NM_012611.3	Rn00561646_m1
Arg1	Arginase, liver	NM_017134.2	Rn00691090_m1
Actb	Actin, beta	NM_031144.2	Rn00667869_m1

<sup>a</sup> Identifikacioni broj u kompjuterskoj bazi podataka za refenciranje sekvenci Nacionalnog Centra za Biotehnoške Informacije (*engl.* National Center for Biotechnology Information, NCBI)

Za merenje ekspresije gena koji kodira CXCL12, korišćena je smeša reagenasa Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, proizvođača Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, SAD), u kombinaciji sa odgovarajućim prajmerima (Metabion, Martinsried, Nemačka):  $\beta$ -aktinF 5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT-3';  $\beta$ -aktinR 5'-CCA GCG CAG CGA TAT CG-3'; CXCL12F 5'-GAT TCT TTG AGA GCC ATG TC-3'; CXCL12R 5'-GTC TGT TGT TGC TTT TCA GC-3'.

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura merena je metodom enzimske imunoadsorpcije (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA). U te svrhe, korišćeni su komercijalni kitovi za pacovske citokine za: IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6 (Biolegend), IL-10 i TGF- $\beta$  (R & D Systems, Minneapolis, SAD), IL-1 $\beta$  (Thermo Fisher). Za merenje koncentracije IFN- $\gamma$  korišćeni su: prečišćeno antitelo protiv pacovskog rekombinantnog IFN- $\gamma$  (klon DB1), biotinom konjugovano poliklonsko anti-IFN- $\gamma$  antitelo konjugovano sa biotinom i rekombinantni pacovski IFN- $\gamma$  (eBioscience, Vienna, Austrija), kao i ekstravidin-peroksidaza i orto-fenilendiamin (*engl.* ortho-phenylenediamine, OPD) (Sigma-Aldrich). Za pripremu karbonatnog pufera potrebnog za razblaživanje antitela kojim su oblagani bazeni mikrotitracione ploče za određivanje koncentracije IFN- $\gamma$ , 0,8403 g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) i 0,36655 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) je rastvarano u 100 ml destilovane vode. U istom ELISA testu korišćen je i citratni pufer za rastvaranje OPD-a, koji se sastojao od 49 ml rastvora 0,1 M limunske kiseline (Sigma-Aldrich) i 51 ml rastvora 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich).

Za ispiranje bazenčića mikrotitracionih ploča prilikom izvođenja ELISA testa za određivanje koncentracija IFN- $\gamma$ , IL-17A, i TNF- $\alpha$ , korišćen je fosfatni pufer uz dodatak 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich).

U eksperimentalnom radu su korišćeni i natrijum-azid (NaN<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich) i vitalna boja tripan plavo, nabavljeni od Sigma-Aldrich.

### **3.5. Izolovanje mononuklearnih ćelija i priprema ćelijskih suspenzija**

#### **3.5.1. Mononuklearne ćelije kičmene moždine**

##### **3.5.1.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine**

Posle vađenja i merenja organa, kičmene moždine su pažljivo propuštane kroz sterilne mrežice sa porama veličine 70  $\mu$ m (BD Biosciences, Erembodegem,



Belgija), postavljene u petrijeve šolje. Moždine su pasirane tučkom šprica (od 2 ml) sa 6 ml hladnog RPMI-1640 medijuma obogaćenog sa 5% FCS-a, na ledu. Tako dobijene suspenzije centrifugirane su ( $800 \times g$ , 3 minuta na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i oprane u RPMI-1640 medijumu sa 5% FCS-a.

Da bi se dobile mononuklearne ćelije, 1 ml taloga dobijene ćelijske suspenzije iz kičmene moždine pomešan je sa 4 ml 40% Percoll-a i zatim pažljivo naslonjen na 2,5 ml 70% Percoll-a. Ćelije su zatim centrifugirane na  $1000 \times g$ , 50 minuta na sobnoj temperaturi, bez kočenja prilikom zasutavljanja centrifuge. Mononuklearne ćelije koje su se izdvojile na interfazi između gradijenata različite gustine su pažljivo izolovane i oprane dva puta u RPMI-1640 medijumu sa 5% FCS-a i resuspendovane u 200  $\mu\text{l}$  istog medijuma. Žive ćelije su brojane u poboljšanom Neubauerovom hemocitometru, korišćenjem vitalne boje tripan plavo.

#### 3.5.1.2. Magnetno izdvajanje CD11b+ ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Da bi se ispitala ekspresija citokina i enzima u mikrogliji i makrofagima kičmene moždine, iz mononuklearnog ćelijskog infiltrata izdvojena je visoko obogaćena populacija ovih ćelija korišćenjem MACS.

Iz podešene suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine,  $1 \times 10^7$  ćelija je izdvajano u epruvete, istaloženo centrifugiranjem ( $300 \times g$ , 5 minuta) i resuspendovano u 100  $\mu\text{l}$  MACS pufera. Na talog ćelija resuspendovan u 60  $\mu\text{l}$  MACS pufera je dodato po 20  $\mu\text{l}$  antitela protiv pacovskih T-ćelija i anti-CD45RA antitela konjugovanih sa MicroBeads česticama i inkubirano 15 minuta na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posle inkubacije, ćelije su oprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene centrifugiranjem ( $300 \times g$ , 5 minuta) i resuspendovane u 0,5 ml MACS pufera. Suspenzija ćelija obeleženih MicroBeads česticama propuššana je kroz LS kolonu smeštenu, prema uputstvima proizvođača, u magnetno polje odgovarajućeg MACS separatora. Obeležene ćelije (T- i B-limfociti) su se zadržavale na koloni, dok su neobeležene ćelije, posle prolaska kroz kolonu, izdvajane. Čistoća ovako izdvojene "negativne" ćelijske frakcije proveravana je obeležavanjem dobijenih ćelija sa anti-CD11b antitelom koje je konjugovano sa FITC-om i dobijeno je da je 90% - 95% ćelija bilo CD11b+.

Posle imunomagnetnog prečišćavanja, mikroglia i periferni makrofagi su kultivisani u pločama sa 24 bazena (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml), na 37 °C, u atmosferi sa 5% v/v CO<sub>2</sub>. Posle isteka 12 časova, izdvojeni su supernatanti i čuvani na -70 °C do određivanja koncentracije pojedinih citokina u njima ELISA testovima. Ćelije iz kultura su lizirane korišćenjem dvostruko razblaženog pufera za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems), alikvotirane ( $1 \times 10^5$  liziranih ćelija) i zamrznute na -70 °C za dalju izolaciju RNK i analizu ekspresije gena za citokine i enzime;

### **3.5.2. Mononuklearne ćelije limfnog čvora**

#### 3.5.2.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija limfnog čvora

Posle vađenja i merenja, tkivo limfnih čvorova je macerirano i protiskivano kroz sterilnu mrežicu sa porama veličine 60 μm, a oslobođene ćelije spirane su hladnim fosfatnim puferom kojem je dodato 2% FCS-a i 0.09% NaN<sub>3</sub> (FACS pufer, *engl.* Fluorescence Activated Cell Sorting). Ovako dobijena ćelijska suspenzija je oprana 3 × u hladnom FACS puferu (300 × g, 5 minuta na +4 °C) i talog ćelija resuspendovan u hladnom FACS puferu. Posle toga, ćelije su izbrojane, a suspenzije podešavane tako da gustina ćelija bude  $1 \times 10^7$  ćelija/ml.

#### 3.5.2.2. Magnetno izdvajanje CD4+CD25+ i CD4+CD25- limfocita iz suspenzija mononuklearnih ćelija limfnih čvorova

CD4+CD25+ i CD4+CD25- limfociti za izvođenje *in vitro* testa supresije proliferacije dobijeni su iz površinskih limfnih čvorova, prema modifikovanoj proceduri koju su opisali Lin i Hunig (2003). Posle vađenja ingvinalnih, aksilarnih i cervikalnih limfnih čvorova, pripremljene su podešene suspenzije mononuklearnih ćelija na način koji je prethodno opisan. Ćelije ( $1 \times 10^7$ ) su zatim resuspendovane u 100 μl MACS pufera i dodato im je 10 μl anti-CD11b antitela koje je konjugovano sa biotinom. Ćelije su tako inkubirane 30 minuta, na +4 °C, oprane 2 × sa 1 ml MACS pufera. Na talog ćelija resuspendovan u 40 μl MACS pufera je dodavano po 20 μl anti-CD8 i anti-CD45RA antitela obeleženih MicroBeads česticama, kao i 20 μl anti-biotin MicroBeads čestica i ćelije su inkubirane 15 minuta na +4 °C. Posle

inkubacije, pranja i propuštanja kroz kolonu magnetnog separatora na način prethodno opisan, izdvojena je "negativna" frakcija ćelija, odnosno prečišćena frakcija CD4+ T-limfocita. Posle bojenja specifičnim antitelom protiv CD4 molekula, protočno citofluorometrijska analiza (*engl.* flow cytometry analysis) je pokazala da je ovako dobijena "negativna" frakcija sadržala 90% - 95% CD4+ T-ćelija.

U sledećem koraku, ove ćelije su bile indirektno obeležene sa anti-CD25 antitelom konjugovanim sa biotinom i anti-biotin MicroBeads česticama prema prethodno opisanoj proceduri i ponovo propuštane kroz kolonu magnetnog separatora. Na taj način su dobijene dve frakcije ćelija: obeležene ćelije koje su se zadržale na koloni (CD4+CD25+ T-limfociti) i neobeležene ćelije koje su prošle kroz kolonu (CD4+CD25- T-limfociti). Protočno citofluorometrijska analiza i bojenje površinskih markera specifičnim antitelom su pokazali da je CD4+CD25- frakcija izolovana sa prosečnom čistoćom od 85%, dok je specifično bojenje anti-Foxp3 antitelom potvrdilo da je 75% - 85% ćelija u CD4+CD25+ populaciji bilo pozitivno na Foxp3 marker regulatornih ćelija.

Izdvojene CD4+CD25+ ćelije su služile kao regulatorne ćelije (Treg), dok su CD4+CD25- ćelije služile kao efektorske ćelije (Tef) u *in vitro* testu supresije proliferacije.

### **3.6. Protočna citofluorometrija**

#### **3.6.1. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih antigena**

Iz podešenih ćelijskih suspenzija izdvajana je zapremina u kojoj se nalazi  $1-5 \times 10^5$  ćelija u posebne epruvete. Ćelije su istaložene centrifugiranjem ( $300 \times g$ , 5 minuta na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u FACS puferu i na talog ćelija su dodavana odgovarajuća antitela direktno obeležena fluorohromima (direktno bojenje). Ćelije su inkubirane (30 minuta na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), oprane  $2 \times$  u FACS puferu i jednom u rastvoru fosfatnog pufera sa 0,09%  $\text{NaN}_3$  i na kraju resuspendovane u 300  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera sa 0,09%  $\text{NaNO}_3$ . Tako pripremljeni uzorci su analizirani na protočnom citometru (*engl.* Flow cytometry analysis, FCA). Kada je izvođeno indirektno bojenje korišćenjem neobeđenih antitela ili antitela konjugovanih sa biotinom, posle inkubacije sa ovim antitelima, ćelijama je posle pranja u FACS puferu ( $2 \times$ ) dodavan odgovarajući sekundarni reagens (streptavidin konjugovan sa PE-om ili PerCP-om, ili,

odgovarajuće antitelo obeleženo fluorohromom). Čelije su zatim ponovo inkubirane 30 minuta na +4 C. Posle inkubacije, čelije su oprane, resuspendovane i analizirane na isti način kao posle direktnog bojenja.

#### 3.6.1.1. Određivanje apoptotičnih sveže izolovanih ćelija

Procenat apoptotičnih ćelija u suspenziji sveže izolovanih mononuklearnih ćelija kičmene moždine određivan je korišćenjem Aneksin V komercijalnog kita (BD Pharmingen). Aneksin V se specifično vezuje za fosfatidilserin koji se u početnoj fazi apoptoze ispoljava na spoljnoj membrani apoptotičnih ćelija (Vermes i sar., 1995). Posle dodavanja anti-TCR $\alpha\beta$  i anti-CD4 antitela, ćelije kičmene moždine su inkubirane 30 minuta na +4 C. Čelije su zatim oprane u fosfatnom puferu i 1 $\times$  u aneksin V vezujućem puferu koji se dobija tako što se odgovarajuća zapremina 10 $\times$  koncentrata za vezujući pufer iz komercijalnog kita razredi sa destilovanom vodom u odnosu 1:10. Posle pranja, ćelije su inkubirane sa 5  $\mu$ l aneksina V koji je obeležen sa FITC-om, na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta i posle toga analizirane na protočnom citometru.

### **3.6.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije unutarćelijskih antigena**

#### 3.6.2.1. Određivanje ekspresije Foxp3 transkripcionog faktora

Transkripcioni faktor Foxp3 je glavni regulator razvoja i funkcije regulatornih ćelija (Zhang i Zhao, 2007) i, kao takav, specifični marker prirodnih i indukovanih regulatornih ćelija (Fontenot i sar., 2005). Za određivanje ekspresije Foxp3 molekula, ćelije drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine su najpre obeležene antitelima protiv CD4 i/ili CD8 (ćelije kičmene moždine) molekula koja su konjugovana sa PE-om, a zatim fiksirane i njihova membrana permeabilizovana upotrebom odgovarajućih reagenasa iz komercijalnog kita za izvođenje ove procedure (eBioscience), prema uputstvu proizvođača (<http://www.igb.illinois.edu/sites/biotec.uiuc.edu/files/upload/staining-intracellular-antigens-for-flow-cytometry.pdf>). Čelije su posle toga inkubirane sa antitelom protiv Foxp3 antigena koje je obeleženo sa FITC-om (30 minuta na +4 °C), isprane (2  $\times$ ) odgovarajućim puferom iz kita i resuspendovane u 300  $\mu$ l fosfatnog pufera sa 0,09% NaN<sub>3</sub> i analizirane na protočnom citometru.

### 3.6.2.2. Stimulacija ćelija za ispitivanje sinteze citokina

Sveže izolovane mononuklearne ćelije limfnih čvorova i kičmene moždine ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml), zasejavane su u 500  $\mu$ l RPMI-1640 obogaćenim medijumom sa 10% FCS-a, u ploče sa 24 bazena tokom 4 časa u atmosferi sa 5% v/v CO<sub>2</sub> na 37 °C. U svaki bazen je dodavano 200 ng/ml PMA i 400 ng/ml jonomicina u cilju stimulacije T-ćelijske aktivacije i sinteze citokina, prema protokolima za intracelularno bojenje citokina (<http://www.igb.illinois.edu/sites/biotec.uiuc.edu/files/upload/staining-intracellular-antigens-for-flow-cytometry.pdf>). Dva časa pre isteka kultivacije, dodavano je i 3  $\mu$ g/ml brefeldina A koji sprečava formiranje transportnih vezikula u goldži aparatu ćelije i na taj način zadržava sintetisane citokine unutar ćelije i olakšava njihovu detekciju (<http://www.ebioscience.com/brefeldin-a-solution.htm>). Posle kultivacije, ćelije su istaložene centrifugiranjem (300  $\times g$ , 10 minuta na +4 °C), oprane (2  $\times$ ) u FACS puferu i zatim obležene antitelima protiv površinskih antigena TCR $\alpha\beta$  i CD8, ponovo oprane, fiksirane i njihove membrane permeabilizovane odgovarajućim reagensima iz komercijalnog kita za određivanje ekspresije Foxp3 transkripcionog faktora. Ćelije su zatim oprane 2  $\times$  u puferu za permeabilizaciju i obeležene antitelima protiv IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10, inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, zatim oprane u puferu za permeabilizaciju, resuspendovane u 300  $\mu$ l fosfatnog pufera sa 0,09% NaN<sub>3</sub> i analizirane na protočnom citometru.

### 3.6.3. Analiza uzoraka protočnom citofluorometrijom

Za analizu uzoraka suspenzije ćelija limfnog čvora i kičmene moždine metodom protočne citofluorometrije, korišćeni su analogni FACScan i FACSCalibur protočni citometri, kao i digitalni FACSVerse citometar (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD). Svi citometri poseduju argonski jonski laser talasne dužine 488 nm kojima pobuđuju različite fluorohrome (FITC, CFSE, PE, PerCP, 7-AAD), koji su korišćeni u eksperimentima prikazanim u okviru ove disertacije. FACSCalibur i FACSVerse protočni citometri poseduju i diodni laser talasne dužine 635 nm, što omogućava dodatnu fleksibilnost u odabiru fluorohroma (PE-Cy<sup>TM</sup>5, PerCP-eFLuor710, Alexa Fluor647). Spektri korišćenih fluorohroma se međusobno ne preklapaju (FITC: 350 nm, CFSE: 521 nm, PE: 585 nm, 7-AAD: 647 nm, PerCP:

650 nm, PE-Cy<sup>™</sup>5/PerCP-eFLuor710/Alexa Fluor647: 667-668 nm), tako da se mogu razdvojiti i istovremeno detektovati uz minimalni gubitak intenziteta emitovane svetlosti, što omogućava istovremenu analizu više antigena (do 4, u eksperimentima prikazanim u ovoj disertaciji). Za akviziciju podataka na FACScan i FACSCalibur citometrima koristio se CellQuest<sup>™</sup> softver (BD Biosciences), a uz FACSVerse, odgovarajući FACSuite<sup>™</sup> softver (BD Biosciences).

Za detekciju eventualnog nespecifičnog bojenja, uz svako specifično antitelo korišćena su irelevantna antitela odgovarajućeg izotipa i obeležena odgovarajućim fluorohromom (izotipske kontrole).

Kako bi se identifikovale i selektovale željene populacije ćelija u kontekstu većeg broja fluorohroma u datom panelu, korišćene su FMO (*engl.* fluorescence minus one) kontrole koje se rutinski koriste u višekolornim eksperimentima kao dodatak kontrolama za kompenzaciju, u cilju pravilne interpretacije podataka. FMO kontrole obuhvataju sve fluorohrome sadržane na panelu, osim onog koji se meri, i daju uvid u eventualno prelivanje fluorescence iz ostalih kanala u kanal od interesa. Na taj način omogućavaju da se korektno postavi granica za selekciju željenih ćelija.

Princip rada protočnih citometara podrazumeva da svaka ćelija, posle hidrodinamičkog usmeravanja, prolazi kroz laserski snop, a detektor, koji se nalazi u istoj ravni kao i laserski snop, beleži prednje rasipanje svetlosti (*engl.* forward scatter channel, FSC). FSC daje informaciju o veličini ćelije. Detektor bočnog (pod pravim uglom) rasipanja svetlosti (*engl.* side scatter channel, SSC) daje informaciju o granuliranosti ćelija, tj. o njihovoj unutrašnjoj strukturi. Fluorohromi kojima su obeležene ćelije bivaju pobuđeni apsorpcijom energije svetlosnog snopa iz lasera i emituju svetlost veće talasne dužine nego što je apsorbovana. Na osnovu emitovane fluorescence, uz informaciju o veličini i granuliranosti ćelija, dobijaju se informacije o zastupljenosti ćelija koje eksprimiraju ispitivane antigene, kao i o gustini njihove ekspresije.

Iz svakog uzorka je učitavano 10 000/20 000 ćelija. Iz analize su isključene mrtve ćelije i ćelijski debri, na osnovu njihovih FSC i SSC karakteristika. Za analizu podataka dobijenih upotrebom protočnog citometra (određivanje procenta pozitivnih ćelija i procena srednjeg intenziteta fluorescence za određena antitela

koja su obeležena fluorohromima), korišćen je softver FlowJo v.7.8. (TreeStar Inc, Ashland, OR, SAD).

Analiza ekspresije molekula CD11b, CD45 i CD134 na ćelijama kičmene moždine uključivala je i merenje srednjeg intenziteta fluorescence (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) koju emituju fluorohromi vezani za antitelo određene specifičnosti i koji odražava gustinu njihove ekspresije. Procenat promene MFI je izračunat prema jednačini (Kamath i sar., 1998):

$$\% \text{ promene MFI} = \frac{[(\text{MFI eksperimentalne grupe} - \text{MFI kontrolne grupe}) \times 100]}{\text{MFI kontrolne grupe}}$$

### **3.7. Ispitivanje proliferacije CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora**

Mononuklearne ćelije izolovane iz limfnog čvora ( $1,5 \times 10^6$  ćelija/ml) su zasejavane u ploče sa 96 bazena sa ovalnim dnom (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u čistom RPMI-1640 medijumu obogaćenom sa 10% FCS-a, ili uz dodavanje 2,5 µg/ml ConA, ili 20 µg/ml MBP-a. Ovako pripremljene kulture inkubirane su 72 časa na 37 °C, u uslovima 5% v/v CO<sub>2</sub>. Posle inkubacije, ćelije su istaložene centrifugiranjem (300 × g, 10 minuta na +4 °C), a supernatanti izdvojeni i zamrznuti na -70 °C do izvođenja ELISA testova za određivanje koncentracije citokina. Proliferišući CD4+ limfociti (ćelije u S+G<sub>2</sub>/M fazama ćelijskog ciklusa) su određivani po prethodno opisanoj metodi (Rabinovitch i sar., 1986). Istaložene ćelije su 2 × oprane u FACS puferu, a zatim inkubirane sa antitelima umserenih protiv površinskih markera CD4 i CD8 (30 minuta na +4 °C), oprane u hladnom fosfatnom puferu i resuspendovane u 150 µl 50% rastvora FCS-a u fosfatnom puferu sa 0,09% NaN<sub>3</sub>. Ćelije su zatim fiksirane/permeabilizovane uz dodavanje 450 µl ledeno hladnog 70% rastvora etanola u redestilovanoj vodi, u kapima, uz mešanje, i inkubirane preko noći na +4 °C. Posle toga, ćelije su istaložene centrifugiranjem (300 × g, 10 minuta na +4 °C), oprane od etanola i precipitiranih proteina prvo u hladnom FACS puferu, a zatim u fosfatnom puferu sa 0,09% NaN<sub>3</sub>. Ćelijama je zatim dodato 10 µl DNK-vezujuće boje 7-AAD i inkubirane su 30 minuta na +4 °C. Uzorci su zatim učitavani na analognom protočnom citometru, uz korišćenje softvera CellQuest™. Eventualno prisutni agregati ćelija su

eliminirani iz analize na osnovu širine (*engl.* 7-AAD width) i površine (*engl.* 7-AAD area), 7-AAD fluorescentnog signala, uz pomoć modula za razlikovanje agregata ćelija (*engl.* doublet discriminating module, DDM). Procenat proliferišućih ćelija je dobijen korišćenjem Dean-Jet-Fox modela platforme za analizu ćelijskog ciklusa softvera FlowJo.

### **3.8. Određivanje supresorske funkcije Treg ćelija limfnog čvora *in vitro***

#### **3.8.1. Obeležavanje ćelija limfnog čvora CFSE-om**

Za ispitivanje supresorske funkcije Treg ćelija, korišćene su CD4+CD25+ i CD4+CD25- T-ćelije, magnetno izdvojene iz suspenzija mononuklearnih ćelija pripremljene iz superficijalnih (ingvinalnih, aksilarnih i cervikalnih) limfnih čvorova na način koji je prethodno opisan. Za obeležavanje ovih ćelija CFSE-om,  $1 \times 10^6$  ćelija je resuspendovano u 1 ml fosfatnog pufera i inkubirano sa 5  $\mu$ m CFSE-a (10 minuta na +37 °C). Reakcija je prekidana dodavanjem 5  $\times$  veće zapremine ledeno hladnog fosfatnog pufera i inkubacijom od 5 minuta na hladnom. Ćelije su oprane i CD4+CD25- ćelije koje su bile obeležene CFSE-om su korišćene kao Tef u *in vitro* testu supresije proliferacije, a CD4+CD25+ ćelije koje su bile obeležene CFSE-om su bile postavljene kao kontrola proliferacije Treg.

#### **3.8.2. Test supresije proliferacije *in vitro***

Za izvođenje *in vitro* testa supresije proliferacije, korišćene su ploče sa 96 bazena sa ovalnim dnom. Isti broj Tef ćelija ( $5 \times 10^4$  po bazenu) koje su obeležene CFSE-om je ko-kultivisan sa različitim brojem Treg ćelija (0;  $5 \times 10^4$  i  $2,5 \times 10^4$ ) neobeležanih CFSE-om, tako da je odnos Treg:Tef bio 0:1, 1:1 i 1:2. Ćelije su tako inkubirane u kompletnom RPMI-1640 medijumu sa 10% FCS-a u atmosferi sa 5% v/v CO<sub>2</sub>, 72 časa na 37 °C. Ovako kultivisane ćelije su bile stimulisane sa 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 antitela vezanog za površinu ploče i 1  $\mu$ g/ml solubilnog anti-CD28 antitela, kao što je prethodno opisano (Ephrem i sar., 2008). Iz svakog uzorka su kultivisane i obeležene Tef ćelije nestimulisane anti-CD3/anti-CD28 antitelima, bez prisustva Treg ćelija (samo nestimulisane Tef ćelije), kao negativna kontrola za postavljanje markera za selekciju ćelija koje su pozitivne na CFSE. Stimulisane Tef ćelije kultivisane bez Treg ćelija (odnos 0:1, samo stimulisane Tef ćelije) su služile



kao pozitivna kontrola. Posle trodnevne inkubacije, ćelije su istaložene ( $300 \times g$ , 10 minuta na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), izdvojene i oprane  $2 \times$  u FACS puferu. Supresorski kapacitet Treg ćelija je procenjivan poređenjem %CFSE+ stimulisanih Tef ćelija (Treg:Tef odnos 0:1), prema %CFSE+ Tef ćelija ko-kultivisanih sa Treg ćelijama u 1:1 ili 1:2 Treg:Tef odnosu. Procenat supresije je računat prema formuli:

$$100\% - [(\%CFSE+ \text{ stimulisane Tef} + \text{Treg} / \%CFSE+ \text{ samo stimulisane Tef}) \times 100]$$

### **3.9. Analiza ekspresije gena za citokine i enzime**

#### ***3.9.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva kičmene moždine, mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD11b+ ćelija kičmene moždine***

##### **3.9.1.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva kičmene moždine**

Posle izolovanja i merenja kičmene moždine, mali deo tkiva ( $\sim 20 \text{ mg}$ ) je zamrzavan u 1 ml  $2 \times$  koncentrovanog rastvora za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Nucleic Acid Purification Lysis Solution) i čuvan na  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize. Neposredno pred izolaciju ukupne RNK, tkivo je odmrzavano i mehanički homogenizovano u rastvoru za prečišćavanje nukleinskih kiselina dvostruko razblaženom upotrebom fosfatnog pufera (pH 7,3). Homogenat tkiva kičmene moždine je zatim prefiltriran korišćenjem aparata ABI Prism 6100 Nucelic Acid PrepStation (Applied Biosystems), radi smanjenja viskoznosti homogenata tkiva i uklanjanja krupnijih nečistoća iz njega. Izolacija ukupne RNK je obavljana na ABI Prism 6100 Nucelic Acid PrepStation aparatu, korišćenjem reagensa iz Total RNA Chemistry Starter Kit-a, prema preporuci proizvođača. Dobijena je RNK prečišćena od proteina, nukleaza i drugih nečistoća

##### **3.9.1.2. Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD11b+ ćelija kičmene moždine**

Za prečišćavanja ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora/kičmene moždine i mikroglije/makrofaga kičmene moždine, korišćene su suspenzije sveže izolovanih mononuklearnih ćelija limfnog čvora i kičmene moždine ili suspenzije magnetno izdvojene mikroglije/makrofaga kičmene moždine. Iz svake suspenzije je izdvojeno  $1 \times 10^5$  ćelija koje su, posle taloženja i uklanjanja supernatanta, lizirane u 200  $\mu\text{l}$  rastvora za prečišćavanje nukleinskih

kiselina, prethodno dvostruko razblaženog u fosfatnom puferu (pH 7,3). Lizati ćelija su zatim zamrzavani na -70 °C. Izolovanje ukupne RNK, prečišćene od proteina, nukleaza i drugih nečistoća, iz lizata ćelija je obavljano na sličan način kao i iz tkiva kičmene moždine, korišćenjem aparata ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation i pripadajućih reagenasa (Total RNA Chemistry Starter Kit), prema preporuci proizvođača.

### **3.9.2. Transkripcija RNK u cDNK**

Posle izolacije ukupne RNK, cDNK je sintetisana korišćenjem rastvora iz High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a, prema instrukcijama proizvođača. Reakciona smeša je sadržala: 10 µl prečišćene RNK, 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 0,8 µl mešavine nukleotida (100 mM), 2 µl smeše nasumičnih prajmera, 1 µl reverzne transkriptaze (50 U/µl), 1 µl inhibitora RNaze (20 U/µl) i 3,2 µl vode prečišćene od nukleinskih kiselina i nukleaza (voda za primenu u PCR-u). Reakcija reverzne transkripcije RNK se odvijala kroz inkubacije od 10 minuta na 25 °C, zatim 120 minuta na 37 °C i 5 sekundi na 85 °C, na aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. Sintetisana cDNK korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena metodom RT-qPCR.

### **3.9.3. RT-qPCR**

Metoda RT-qPCR kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju, pri čemu postoje dva pristupa za kvantifikaciju ekspresije gena. Jedan pristup obuhvata korišćenje specifičnih oligonukleotidnih proba obeleženih fluorescentnim bojama, dok je drugi zasnovan na korišćenju boja koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK (dsDNK-vezujuće boje). U slučaju dvostruko obeleženih specifičnih proba, za jedan kraj je vezana boja koja se označava kao donor, a za drugi kraj akceptorska boja. Donor, osvetljen svetlošću diode, emituje svetlost koju apsorbuje akceptor. S obzirom na to da Taq polimeraza (polimeraza izolovana iz *Thermophilus Aquaticus*) pokazuje 5' egzonukelaznu aktivnost, tokom faze elongacije u PCR reakciji dolazi do isecanja probe, a time i do razdvajanja donora i akceptora, što za posledicu ima povećanje fluorescence donora koja se registruje detektorom (Cikota i sar., 2002). Prilikom korišćenja dsDNK-vezujućih boja, poput

SYBR Green-a i etidijum-bromida, boje se vezuju za novosintetisane dvolančane molekule DNK nakon čega počinju da emituju fluorescencu (Cikota i sar., 2002). Korišćenjem oba pristupa, nakupljanje proizvoda PCR reakcije se meri na osnovu porasta fluorescence nakon svakog ciklusa umnožavanja.

Sve PCR reakcije za analizu ekspresije gena za citokine i enzime (Tabela 1) u uzorcima mononuklearnih ćelija limfnog čvora i kičmene moždine, kao i mikroglije/makrofaga kičmene moždine, su rađene na aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. Reakciona smeša od 25  $\mu$ l je sadržala 5  $\mu$ l cDNK, 12,5  $\mu$ l smeše reagenasa za merenje ekspresije gena (2 $\times$  TaqMan Gene Expression Master Mix), 1,25  $\mu$ l smeše oligonukleotidnih prajmera i probe (20 $\times$  TaqMan Gene Expression Assay) i 6,25  $\mu$ l vode za primenu u PCR-u. Svaka PCR reakcija, u uslovima propisanim od strane proizvođača, je uključivala inkubacije od 2 minuta na 50  $^{\circ}$ C, zatim 10 minuta na 95  $^{\circ}$ C i 40 ciklusa umnožavanja od kojih su svaki sačinjavale inkubacije od 15 sekundi na 95  $^{\circ}$ C i od jednog minuta na 60  $^{\circ}$ C.

Svi uzorci su rađeni u triplikatu. U svojstvu endogene kontrole, tj. referentnog gena, korišćen je  $\beta$ -aktin, budući da je prethodno pokazano da na ekspresiju ovog gena u analizovanim tkivima ne utiču ni pol ni starenje. Ekspresija svih ispitivanih gena je "normalizovana" u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, da bi se izbegao uticaj razlika u početnoj količini RNK i, sledstveno, cDNK, u pojedinačnim uzorcima na rezultate merenja.

Kvantifikacija ekspresije gena vršena je na osnovu rednog broja ciklusa (Ct vrednosti) u kome je registrovano značajno povećanje fluorescentnog signala iznad granice detekcije (*engl.* threshold). Ct vrednost se uvek „pojavljuje” u toku eksponencijalne faze reakcije. Relativna ekspresija gena od interesa (ciljnog gena) izražavana je u odnosu na referentni uzorak. U svim merenjima, uzorci dobijeni od ženki pacova objedinjeni su i korišćeni kao referentni uzorak. Ekspresija ciljnog gena kod mužjaka je izražavana u relativnim jedinicama, kao N-puta razlika u odnosu na ekspresiju odgovarajućeg gena kod ženki (referentni uzorak), prema formuli:

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

pri čemu je:

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

$$\Delta Ct_{\text{uzorka}} = Ct_{\text{ciljnog gena}} - Ct_{\beta\text{-aktina}}$$

$$\Delta Ct_{\text{referentnog uzorka}} = Ct_{\text{ciljnog gena}} - Ct_{\beta\text{-aktina}}$$

Svi rezultati relativne kvantifikacije su prikazivani kao log<sub>10</sub> vrednosti (vrednosti < 0.0 odgovaraju smanjenju, dok vrednosti > 0.0 odgovaraju povećanju ekspresije gena u uzorcima mužjaka, u donosu na uzorke ženki).

### **3.10. Određivanje koncentracije citokina ELISA testovima**

#### **3.10.1. Priprema uzoraka za izvođenje ELISA testova**

##### 3.10.1.1. Stimulacija mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora

Za određivanje koncentracije citokina (IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6 i TNF- $\alpha$ ),  $1,5 \times 10^6$  mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora/ml je kultivisano u pločama sa 96 bazena, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C u čistom RPMI-1640 medijumu sa 10% FCS-a, ili sa dodavanjem 20  $\mu$ g/ml MBP-a ili 2,5  $\mu$ g/ml ConA. Posle 72 časova, ćelije su istaložene centrifugiranjem, supernatanti izdvojeni i čuvani na -70 °C do određivanja koncentracije navedenih citokina. Ćelije iz kultura su korišćene za ispitivanje proliferacije.

##### 3.10.1.2. Stimulacija mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Mononuklearne ćelije kičmene moždine ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml) su kultivisane u pločama sa 24 bazena u 500  $\mu$ l RPMI-1640 medijuma sa 5% FCS-a kome je dodavano 200 ng/ml PMA i 400 ng/ml jonomicina, u atmosferi sa 5% v/v CO<sub>2</sub> na 37 °C. Posle 4 časa kultivacije i taloženja ćelija iz kultura centrifugiranjem, izdvojeni su supernatanti i zamrzavani na -70 °C. U njima su kasnije određivane koncentracije IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10.

### 3.10.1.3. Stimulacija CD11b+ ćelija kičmene moždine

Ćelije mikroglije i makrofaga koje su magnetno izdvojene iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine kao što je prethodno opisano, kultivisane su ( $1 \times 10^6$  ćelija/ml) u pločama sa 24 bazena u 500  $\mu$ l RPMI-1640 medijuma sa 10% FCS-a u atmosferi sa 5% v/v CO<sub>2</sub> na 37 °C, tokom 12 časova. Posle toga, ćelije su istaložene centrifugiranjem i izdvojene za određivanje ekspresije gena za enzime RT-qPCR-om, a supernatanti su izdvojeni i čuvani na -70 °C do izvođenja ELISA testova za određivanje koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i IL-10.

### 3.10.1.4. Izvođenje ELISA testova

- Za određivanje koncentracije **IL-17A**, korišćen je komercijalni kit, prema uputstvu proizvođača, u sastavu: mikrotitraciona ploča sa 96 bazena (Nunc Maxisorp™), antitelo za oblaganje ploče specifično za pacovski IL-17A i antitelo za detekciju antigena koje je konjugovano sa biotinom, enzim avidin koji je konjugovan sa peroksidazom rena (*engl.* horseradish peroxidase, HRP), rastvor supstrata za peroksidazu (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB), rekombinantni pacovski IL-17A poznate koncentracije kao standard, komercijalni rastvarač za standard i uzorke i puferovani rastvor za oblaganje ploče.

Oblaganje bazena ploče je obavljano 16-18 h pre izvođenja testa, tako što je po 100  $\mu$ l razblaženog (1:200) specifičnog anti-IL-17A antitela naliveno u bazene ploče, pokriveno adhezivnim filmom i inkubirano preko noći na +4 °C. Posle oblaganja, bazeni su ispirani 4 puta sa po 300  $\mu$ l pufera za ispiranje (fosfatni pufer/0.05% Tween 20) i dodato je po 200  $\mu$ l komercijalnog rastvarača za standard. Nastavljena je inkubacija od 1 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Posle ispiranja, u bazene je dodavano po 100  $\mu$ l standarda ili uzorka supernatanta u triplikatu i nastavljena je inkubacija od 2 h. Standardi su korišćeni u sedam dvostruko opadajućih koncentracija, počev od 1000 pg/ml. Posle ispiranja bazena, dodato im je po 100  $\mu$ l razblaženog (1:200) detekcionog anti-IL-17A antitela koje je konjugovano sa biotinom i inkubirano. Posle jednog sata, bazeni su ponovo ispirani i po 100  $\mu$ l razblažene (1:1000) avidin-HRP-e je dodavano u svaki od njih, uz inkubaciju od 30 minuta. Posle poslednjeg ispiranja, dodat je TMB koji se

dejstvom peroksidaze transformiše u bojeni produkt. Ploča je ostavljena u mraku 15 minuta kako bi se dovršilo razvijanje boje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100  $\mu$ l 2 N  $H_2SO_4$  i intenzitet razvijene boje meren je na spektrofotometru na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija citokina je izračunata na osnovu intenziteta razvijene boje u uzorku (njegove optičke gustine), metodom linearne regresije, u odnosu na standardnu krivu koja je pravljen prema standardnim rastvorima poznatih koncentracija. Kao nulta vrednost korišćen je komercijalni rastvarač za standardne rastvove i uzorke. Prosečna minimalna koncentracija IL-17A koju je moguće detektovati ovim testom je 8 pg/ml.

- Za određivanje koncentracije **IFN- $\gamma$** , korišćene su pojedinačno nabavljene komponente: prečišćeno antitelo specifično za pacovski IFN- $\gamma$  za oblaganje ploče, poliklonsko antitelo specifično za pacovski IFN- $\gamma$  koje je konjugovano sa biotinom, rekombinantni pacovski IFN- $\gamma$ , ekstravidin peroksidaza i OPD.

Bazeni mikrotitracione ploče su oblagani sa po 50  $\mu$ l anti-IFN- $\gamma$  antitela (koncentracije 1  $\mu$ g/ml) jedan dan pre izvođenja ELISA testa i ploča je inkubirana preko noći na +4 °C pokrivena adhezivnim filmom. Sledećeg dana, sadržaj bazena je odlivan, pa inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi sa 200  $\mu$ l fosfatnog pufera/1% BSA-om. Posle toga, bazeni su ispirani 3  $\times$  sa po 200  $\mu$ l fosfatnog pufera/0.05% Tween 20 i dodavano im je po 50  $\mu$ l standarda ili uzorka u triplicatu. Polazna koncentracija standarda od koje su pravljen opadajuća dvostruka razblaženja je bila 1000 pg/ml. Standardi i uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim su bazeni ispirani, posle čega im je dodavano po 50  $\mu$ l anti-IFN- $\gamma$  antitela koje je konjugovano sa biotinom (koncentracija 2  $\mu$ g/ml), za detekciju IFN- $\gamma$ . Ploče su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi. Posle još jednog ciklusa ispiranja, bazenima je dodavano po 50  $\mu$ l ekstravidin peroksidaze (razblažene 1:1000) u fosfatnom puferu sa 1% BSA-om. Posle inkubacije od 1 h, bazeni su ispirani i dodat im je supstrat (50  $\mu$ l  $H_2O_2$  + OPD). Razvijanje boje je trajalo 15 minuta, posle čega je enzimaska reakcija zaustavljena dodavanjem 4 N  $H_2SO_4$  i intenzitet boje je meren na spektrofotometru na talasnoj dužini od 492 nm. Koncentracija IFN- $\gamma$  u uzorcima

određivana je prema standardnoj krivi. Srednja minimalna koncentracija IFN- $\gamma$  koja se može detektovati ovim testom je 5,6 pg/ml

- Za određivanje koncentracije **IL-10** korišćen je komercijalni kit koji je sadržao: mikrotitracionu ploču sa 96 mesta obloženu monoklonskim antitelom koje je specifično za pacovski IL-10, poliklonsko antitelo koje je specifično za pacovski IL-10 i konjugovano sa peroksidazom rena, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + TMB (supstrat), rekombinantni pacovski IL-10 (standard), rastvor HCl-a za zaustavljanje reakcije, komercijalni rastvarač za standardne rastvove i uzorke (puferovani rastvor proteina) i puferovani rastvor za ispiranje.

U bazene mikrotitracione ploče dodavano je po 50  $\mu$ l komercijalnog rastvarača i standarda ili uzorka u triplikatu i inkubirano na sobnoj temperaturi 2 h. Bazeni su zatim ispirani 5  $\times$  sa 400  $\mu$ l puferovanog rastvora za ispiranje i dodato im je 100  $\mu$ l poliklonskog anti-IL-10 antiela. Posle 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, bazeni su ispirani i dodato im je 100  $\mu$ l supstrata koji se inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100  $\mu$ l HCl-a i intenzitet boje je meren na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 450 nm. Standardna kriva je konstruisana pomoću standarda (najveća koncentracija 2000 pg/ml), na isti način koji je prethodno opisan i koncentracija IL-10 u uzorcima supernatanta određivana je u odnosu na standardnu krivu. Ovaj test detektuje i koncentracije IL-10 < 10 pg/ml.

- Koncentracija **TNF- $\alpha$**  određivana je komercijalnim ELISA MAX™ Deluxe Set-om, prema uputstvu proizvođača. Kit sadrži: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena, monoklonsko antitelo specifično za pacovski TNF- $\alpha$  za oblaganje ploče, poliklonsko antitelo specifično za pacovski TNF- $\alpha$  konjugovano sa biotinom za detekciju TNF- $\alpha$ , avidin-HRP, komponente A i B za pravljenje TMB supstrata, rekombinantni pacovski TNF- $\alpha$  (standard), puferovani rastvor za oblaganje ploče i komercijalni rastvarač za pripremu standardnih rastvora i uzoraka.

Jedan dan pre izvođenja ELISA testa, bazeni mikrotitracione ploče su obloženi sa 100  $\mu$ l specifičnog monoklonskog antitela protiv pacovskog TNF- $\alpha$  (razblaženje 1:200). Ploča je pokrivena adhezivnim filmom i inkubirana preko noći

na +4 °C. Sledećeg dana, bazeni su isprani 4 × sa 300 µl pufera za ispiranje (fosfatni pufer/0.05% Tween 20) i dodato je po 200 µl rastvarača da bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Ploče su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje, i ponovo ispirane kao u prethodnom koraku. U svaki bazen je dodato po 50 µl komercijalnog rastvarača za standarde i uzorke i 50 µl standarda/uzoraka u triplikatu, posle čega su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Po isteku inkubacije, bazeni su isprani i u svaki bazen je dodato 100 µl anti-TNF-α detekcionog antitela obeleženog biotinom (razblaženje 1:200), posle čega je sledila još jedna inkubacija od 1 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Ploča je zatim ispirana i naliveno je 100 µl avidin-HRP-a (razblaženje 1:1000) da se inkubira 30 minuta. Posle ispiranja, u bazene je naliveno po 100 µl sveže pripremljenog rastvora supstrata i posle 15 minuta inkubacije u mraku, reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzitet boje meren je na talasnoj dužini 450 nm na spektrofotometru, a koncentracija TNF-α u uzorcima supernatanata izračunata prema standardnoj krivi napravljenoj na osnovu standarda poznatih, dvostruko opadajućih koncentracija, počev od 1000 pg/ml. Minimalna detektibilna koncentracija TNF-α ovim kitom je 2 pg/ml.

- Koncentracija **IL-6** određivana je pomoću komercijalnog Legend max™ rat ELISA Kit-a koji sadrži: mikrotitracionu ploču sa 96 bazena obloženih antitelom specifičnim za pacovski IL-6, antitelo konjugovano sa biotinom specifično za pacovski IL-6, avidin-HRP, rastvor supstrata, rekombinantni pacovski IL-6 (standard), rastvor za zaustavljanje reakcije, komercijalni rastvarač za standarde i uzorke i puferovani rastvor za ispiranje bazena.

Bazeni su najpre isprani 4 × sa 300 µl pufera za ispiranje i posle toga naliveni sa po 50 µl rastvarača za standardne rastvore i uzorke i istom zapreminom standarda/uzoraka u triplikatu. Posle inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, bazeni su isprani kao što je opisano i dodato je po 100 µl anti-IL-6 antitela koje je konjugovano sa biotinom za detekciju pacovskog IL-6. Posle inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje, bazeni su ponovo isprani i uzorci i standardi inkubirani sa 100 µl avidin-HRP-a 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle još jednog pranja, dodato je po 100 µl rastvora supstrata i inkubirano 10 minuta u



mraku. Razvijanje boje je zaustavljano dodavanjem 100  $\mu$ l rastvora za zaustavljanje reakcije, a intenzitet razvijene boje očitavan je na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija IL-6 u uzorcima izračunata je u odnosu na standardnu krivu, napravljena prema poznatim, dvostruko opadajućim koncentracijama standardnih rastvora, od kojih je početna bila 1200 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-6 koju je moguće detektovati ovim testom je <6,2 pg/ml.

- Za određivanje koncentracije **IL-1 $\beta$** , korišćen je komercijalni ELISA Kit koji sadrži: obloženu mikrotitracionu ploču sa 96 bazena, pretitrirano komplementarno detekciono antitelo, kalibrisani rekombinantni proteinski standard, streptavidin-HRP, TMB rastvor supstrata i rastvor za zaustavljanje enzimske reakcije.

U bazene je dodato po 50  $\mu$ l rastvarača za standarde i uzorke i ista zapremina standarada ili uzoraka u triplicatu. Posle toga, ploča pokrivena adhezivnom folijom je inkubirana na sobnoj temperaturi 2 h, posle čega su bazeni isprani 5  $\times$  sa 300  $\mu$ l pufera za ispiranje. Dodato je 100  $\mu$ l detekcionog antitela konjugovanog sa biotinom svakom bazenu i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim su bazeni ponovo isprani. Posle dodavanja 100  $\mu$ l streptavidin-HRP rastvora svakom bazenu, još jedne inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi i ispiranja, bazenima je dodato i po 100  $\mu$ l TMB rastvora supstrata. Ploča je zatim ostavljena na tamnom mestu, kako bi se razvila boja od enzimske reakcije. Posle 30 minuta, reakcija je zaustavljena dodavanjem 100  $\mu$ l reagensa za zasutavljanje reakcije svakom bazenu. Apsorbanca je očitavana na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 450 nm, a koncentracija IL-1 $\beta$  u supernatantima ćelijskih kultura izračunata prema standardnoj krivi koja je konstruisana prema poznatim, dvostruko opadajućim koncentracijama standardnih rastvora. Početna koncentracija standardnog rastvora je bila 2500 pg/ml. Ovim kitom se mogu detektovati koncentracije IL-1 $\beta$   $\leq$  12 pg/ml u ispitivanim uzorcima.

- Koncentracija **TGF- $\beta$**  određivana je korišćenjem Quantikine® ELISA kita za mišji/pacovski/svinjski/mačji TGF- $\beta$ 1 koji se sastoji od: mikrotitracione ploče sa 96 bazena obloženih monoklonskim antitelom specifičnim za TGF- $\beta$ 1, poliklonskog

antitela specifičnog za TGF- $\beta$ 1 koje je konjugovano sa peroksidazom rena, komercijalnih rastvarača (*engl.* assay diluent i calibrator diluent), rekombinantnog TGF- $\beta$ 1 poznate koncentracije (standard) komponenti supstrata A i B, rastvora za zaustavljanje reakcije i puferovanog rastvora za ispiranje.

Kako bi se latentni TGF- $\beta$ 1 preveo u imunoaktivni oblik, pre početka izvođenja testa 100  $\mu$ l uzorka je pomešano sa 20  $\mu$ l 1N HCl-a i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi. Posle toga su uzorci neutralisani sa 20  $\mu$ l 1.2N NaOH/0.5 M HEPES-a i kao takvi korišćeni u testu za određivanje koncentracije TGF- $\beta$ 1.

U bazene mikrotitracione ploče prvo je dodato 50  $\mu$ l komercijalnog rastvarača i 50  $\mu$ l standarda/uzoraka u triplikatu i inkubirano 2 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja 4  $\times$  sa 400  $\mu$ l puferovanog rastvora za ispiranje i dodato je 100  $\mu$ l anti-TGF- $\beta$ 1 antitela konjugovanog sa enzimom. Po isteku inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, bazeni su ponovo ispirani kao što je opisano i dodato im je po 100  $\mu$ l rastvora supstrata dobijenog mešanjem komponenti A i B u jednakim zapreminama. Inkubacija sa rastvorom supstrata je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle isteka inkubacije, reakcija je zaustavljena komercijalnim rastvorom i intenzitet razvijene boje očitavan na talasnoj dužini od 450 nm na spektrofotometru. Koncentracija TGF- $\beta$ 1 izračunata je na osnovu standardne krive u kojoj je najveća poznata koncentracija standarda bila 1000 pg/ml. Minimalna koncentracija TGF- $\beta$ 1 koja se može detektovati ovim testom je 4,6 pg/ml.

### **3.11. Statistička obrada podataka**

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (*engl.* standard error of the mean, SEM). Statistička značajnost razlika između polova u zastupljenosti subpopulacija i ekspresiji membranskih i unutarćelijskih markera na/u ćelijama, kao i u ekspresiji iRNK za hemijske medijatore, određivana je Studentovim *t*-testom Statistička značajnost razlika u kliničkim i histološkim parametrima bolesti, određivana je neparametarskim Mann-Whitney *U* testom. Uticaj pola na sekreciju citokina u supernatantima nestimulisanih ćelijskih kultura i onih stimulisanih MBP-om ili ConA, kao i na supresorski kapacitet Treg ćelija u

odnosu na broj Tef ćelija, određivan je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), uz primenu Bonfferoni testa za *post hoc* poređenje. Za statističku obradu podataka korišćen je statistički program GraphPad Prism v 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Statistički značajnom je smatrana vrednost  $p \leq 0.05$ .



Iako je manji procenat mužjaka razvio klinički manifestnu bolest, oni koji su oboleli, imali su prosečno veći maksimalni znak ( $p < 0.001$ ) u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 1). Kod njih je bolest trajala kraće ( $p < 0.001$ ), ali je indeks težine bolesti (kumulativni klinički skor/broj dana sa kliničkim znacima EAE-a) (Fillmore i sar., 2004) bio veći ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa ženkama pacova (Tabela 2).

**Tabela 2. Uticaj pola na kliničke parametre EAE-a kod mladih pacova.**

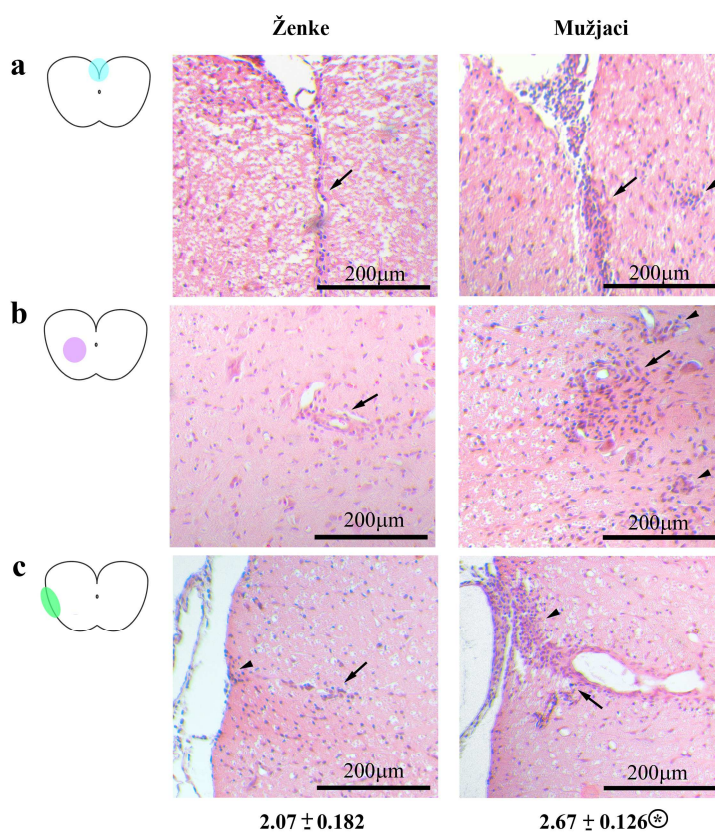
Pol	Incidenca	Početak bolesti <sup>a</sup>	Srednji maksimalni znak <sup>b</sup>	Indeks težine bolesti <sup>c</sup>	Trajanje bolesti (dani) <sup>d</sup>
<b>Ženke</b>	25/25 (100%)	9,8 ± 0,21	2,0 ± 0,13	1,4 ± 0,11	6,7 ± 0,51
<b>Mušjaci</b>	23/27 (85%)	11,3 ± 0,24***	3,0 ± 0,20***	2,2 ± 0,25**	4,2 ± 0,53***

<sup>a</sup> Dan posle imunizacije kada su pacovi ispoljili prve kliničke znake EAE-a; <sup>b</sup> suma maksimalnih kliničkih znakova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj pacova sa kliničkim znacima EAE-a u grupi; <sup>c</sup> suma kumulativnih kliničkih skorova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj dana sa klinički manifestnim EAE-om; <sup>d</sup> trajanje bolesti kod pacova koji su ispitivani na kliničke znake EAE-a do oporavka (10 ženki i 8 mužjaka). Svi podaci predstavljeni su kao srednja vrednost ± SEM iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### ***4.1.2. Mladi mužjaci imaju težu histološku sliku EAE-a u odnosu na ženke pacova istog uzrasta***

Budući da su kod pacova koji razvijaju klinički manifestan oblik EAE-a nađene histološke inflamatorne promene u kičmenoj moždini i da su one maksimalno izražene na vrhucu bolesti (Williams i Moore, 1973), analizirano je tkivo kičmene moždine mladih pacova. Analiza preseka tkiva kičmene moždine pacova koji su bili obojeni hematoksilinom i eozinom, pokazala je prisustvo

perivaskularnih infiltrata od mononuklearnih ćelija na svim nivoima kičmene moždine. Najizraženije promene uočene su u lumbosakralnom regionu. Perivaskularni infiltrati i infiltracija parenhima inflamatornim ćelijama su bili izraženiji u kičmenoj moždini mužjaka ( $p < 0.05$ ), u poređenju sa kičmenom moždinom ženki pacova (Slika 2). Demijelinizacija nije uočena ni kod mužjaka ni kod ženki mladih pacova, što odgovara podacima objavljenim i za druge modele akutnog EAE-a kod pacova (Wekerle i Sun, 2010).



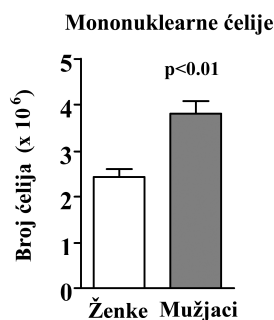
**Slika 2. Mladi mužjaci pacova pokazuju težu histološku sliku EAE-a na vrhuncu bolesti u odnosu na ženke istog uzrasta.** Fotomikrografije preseka kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka pacova koji su obojeni hematoksilinom i eozinom prikazuju: (a) prednji, (b) centralni i (c) lateralni region kičmene moždine. Duže strelice ukazuju na perivaskularne inflamatorne infiltrate, a kraće strelice na subarahnoidalne/intraparenhimske infiltrate. Preseci su histopatološki ocenjivani na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Brojevi koji su upisani ispod fotomikrografija predstavljaju srednju vrednost inflamatornog histološkog skora  $\pm$  SEM ( $n=3/pol$ ). \*  $p < 0.05$ .

#### **4.1.3. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova na vrhuncu bolesti**

Tokom efektorske faze EAE-a, autoreaktivni T-limfociti, ali i ćelije urođene imunosti (inflamatorni monociti, dendritske ćelije, neutrofil i sl.), prolaze krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u parenhimu CNS-a gde se reaktiviraju i dovode do oštećenja tkiva, što rezultuje pojavom neuroloških znakova EAE-a (Constantinescu i sar., 2011). Shodno tome, na vrhuncu bolesti, ispitivano je postojanje polnih razlika u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu mladih pacova.

4.1.3.1. Više ukupno mononuklearnih ćelija i više CD134+ CD4+ T-limfocita je izolovano iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U skladu sa nalazima težeg neurološkog deficita i histopatološkog skora na presecima tkiva kičmene moždine, veći ukupan broj mononuklearnih ćelija je izolovan iz kičmene moždine mužjaka ( $p < 0.01$ ) nego ženki pacova (Slika 3).



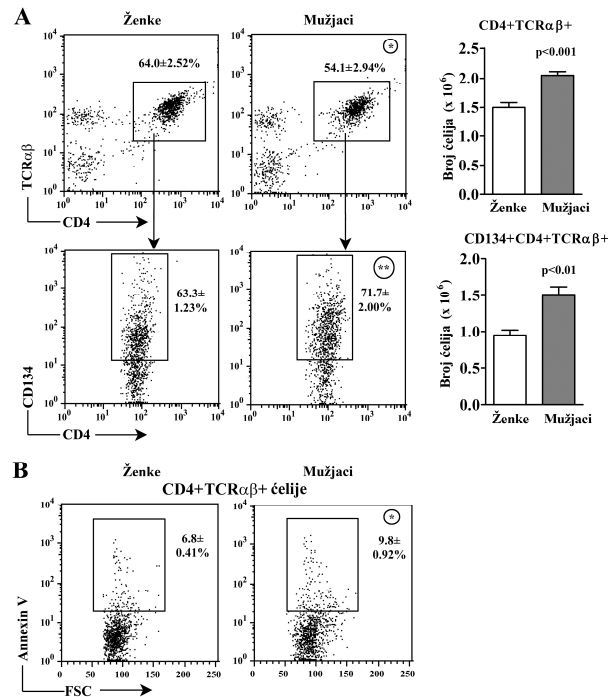
**Slika 3. Više mononuklearnih ćelija je izolovano na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.** Histogram prikazuje broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

U skladu sa prethodnim nalazom, iako je procenat CD4+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mužjaka bio manji ( $p < 0.05$ ), broj ovih ćelija je bio značajno veći kod mužjaka ( $p < 0.001$ ), nego kod ženki pacova (Slika 4).

Pokazano je da CD4+ T-limfociti koji su specifični za neuroantigene nishodno regulišu molekul CD134 pre transmigracije kroz hemato-encefalnu barijeru (Flügel et al., 2001). Smatra se da je prisustvo ovog molekula na površini CD4+ T-ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine životinja sa EAE-om, pokazatelj njihove reaktivacije u ovom tkivu (Flügel et al., 2001; Carboni i sar., 2003; Djikić i sar., 2014). Ispitivanjem površinske ekspresije molekula CD134 na CD4+ T-ćelijama, dobijeno je da je procenat reaktivisanih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita iz kičmene moždine mužjaka veći ( $p < 0.01$ ) nego kod ženki mladih pacova (Slika 4). Takođe, veći broj ( $p < 0.01$ ) reaktivisanih CD4+ T-ćelija je izolovan iz kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova (Slika 4).

Da bi se utvrdilo da li su polne razlike u broju CD4+ T-limfocita u ćelijskom infiltratu iz kičmene moždine posledica polnih razlika u njihovoj apoptozi, ispitivan je procenat apoptotičnih ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita. Zastupljenost apoptotičnih, aneksin V+ ćelija je bila veća ( $p < 0.05$ ) u subpopulaciji CD4+ T-ćelija iz kičmene moždine mužjaka u odnosu na ženke pacova (slika 4).

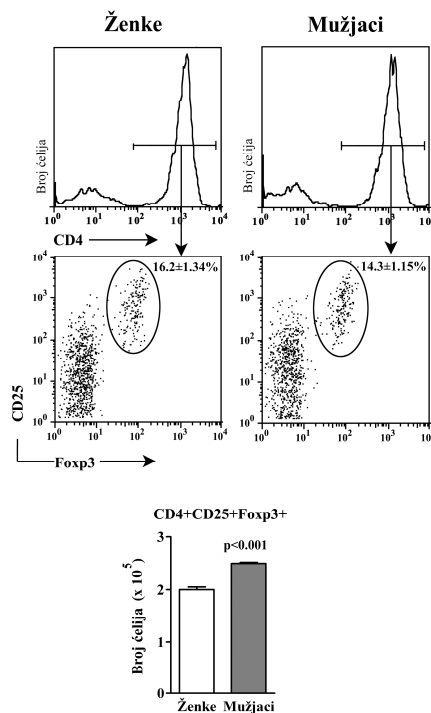




**Slika 4. Više CD4+TCR $\alpha\beta$ + i CD134+CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je izolovano na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova i procenat apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je veći nego kod ženki istog uzrasta. (Panel A)** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocitima kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfociti su izdvajani (“gejtovani”), kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (gornji) broj CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita i (donji) broj CD134+CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka. **(B)** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju bojenje fluorescentnom bojom obeleženim aneksinom V CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat apoptotičnih (aneksin V+) ćelija u subpopulaciji CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

4.1.3.2. U kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je veći, ali je odnos broja CD4+TCRαβ+CD134+ i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija nepovoljniji nego kod ženki istog uzrasta

Budući da akumulacija regulatornih CD4+ limfocita u ciljnom organu i njihova supresorska funkcija imaju važnu ulogu u patogenezi EAE-a (McGeachy i sar., 2005), u sledećem koraku su ispitivane polne razlike u procentualnoj zastupljenosti i broju regulatornih CD4+ limfocita u kičmenoj moždini mladih pacova. Analizom ekspresije površinskog (CD25) i unutarćelijskog (Foxp3) markera regulatornih CD4+ limfocita kod pacova (Fontenot i sar., 2005), nije nađena značajna razlika u procentu CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita između mužjaka i ženki mladih pacova (Slika 5). Međutim, broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je bio veći ( $p < 0.001$ ) u ćelijskom infiltratu koji je izolovan iz kičmene moždine mužjaka u poređenju sa ženkama pacova (Slika 5).



**Slika 5. Više CD4+CD25+Foxp3+ ćelija je izolovano na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova, iako se procenat CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita nije razlikovao između polova.** Protočnocitofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD25 i Foxp3 bojenje CD4+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. CD4+ limfociti su izdvajani (“gejtovani”) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočnocitofluorometrijskim histogramima. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+limfocita je označen na svakom protočnocitofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

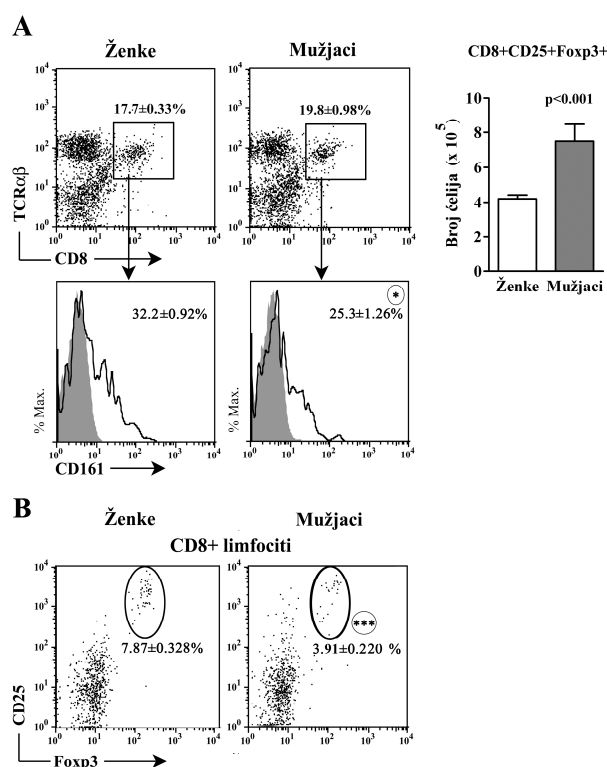
Pokazano je da kliničke manifestacije EAE-a ne zavise od apsolutnog broja reaktivisanih CD4+ T-limfocita, kao ni od apsolutnog broja CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija, već od odnosa ove dve subpopulacije limfocita u ciljnom tkivu (Oukka, 2007; Villares i sar., 2009). U skladu sa težim neurološkim deficitom kod mladih pacova muškog pola, odnos broja CD134+CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita i

CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je bio manje povoljan ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka ( $5,0 \pm 0,07$ ), u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod ženki istog uzrasta ( $3,0 \pm 0,04$ ).

4.1.3.3. Manja zastupljenost regulatornih CD8+ limfocita u mononuklearnom ćelijskom infiltratu kičmene moždine mladih mužjaka u odnosu na ženke pacova istog uzrasta

Uzimajući u obzir da i CD8+ T-limfociti imaju ulogu u regulaciji MS-e i EAE-a (Mars i sar., 2008; Sinha i sar., 2014), određivana je i zastupljenost CD8+ limfocita regulatornog fenotipa u kičmenoj moždini mladih pacova na vrhuncu bolesti. Sličan procenat CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je nađen u suspenziji mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova oba pola, ali je broj CD8+ T-limfocita bio veći ( $p < 0.01$ ) kod mužjaka nego kod ženki (Slika 6).

Imajući u vidu da CD8+ limfociti koji imaju regulatornu ulogu eksprimiraju molekule CD25 i Foxp3 (Adams i sar., 2011), ispitivan je procenat ćelija koje ispoljavaju ove antigene u okviru subpopulacije CD8+ limfocita kičmene moždine mladih pacova. Nađeno je da je procenat ovih ćelija bio manji ( $p < 0.001$ ) u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova (Slika 6). Osim CD8+CD25+Foxp3+ limfocita, pokazano je da i urođenoubilačke T-ćelije (*engl.* natural killer T cells, NKT cells), koje kod pacova imaju CD8+TCR $\alpha\beta$ +CD161+ fenotip (Badovinac et al., 1998), imaju imunoregulatornu ulogu u EAE-u (Mars i sar., 2008). Analizom ekspresije antigena CD161 na površini CD8+TCR $\alpha\beta$ + ćelija kičmene moždine mladih pacova, nađeno je da je procenat ovih ćelija bio manji ( $p < 0.05$ ) u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova (Slika 6).



**Slika 6.** U kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova procentualna zastupljenost CD161+ i CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD8+ limfocita na vrhuncu bolesti je manja u odnosu na ženke istog uzrasta. **(Panel A)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju CD161 ekspresiju na CD8+TCRαβ+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Sivi histogrami predstavljaju izotipsku kontrolu. CD8+TCRαβ+ limfociti su izdvajani („gejtovani“) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD161+ ćelija u okviru CD8+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj CD8+TCRαβ+ ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. **(B)** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD25 i Foxp3 bojenje CD8+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD8+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

4.1.3.4. Mononuklearne ćelije kičmene moždine mladih mužjaka pacova ekspimiraju više IL-17, a manje IFN- $\gamma$  i IL-10 u odnosu na ove ćelije ženki istog uzrasta

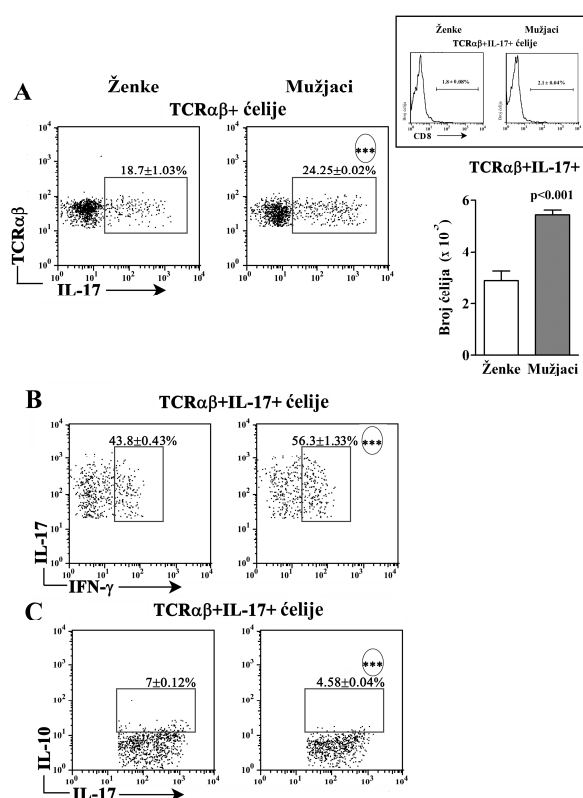
U sledećem koraku ispitivana je ekspresija citokina IL-17 i INF- $\gamma$ , za koje je pokazano da su ključni medijatori inflamatornog procesa i autoimunskog oštećenja u organ-specifičnim oboljenjima kao što su MS i njen animalni model EAE (Kramer i Gaffen, 2007; McFarland i Martin, 2007). Ispitivana je i ekspresija IL-10, citokina za koji je pokazano da ima važnu ulogu u kontroli (ograničavanju) razvoja MS-e (Saraiva i O'Garra, 2010) i EAE-a (Blaževski i sar., 2013).

*4.1.3.4.1. Veća zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru populacije T-limfocita i veća zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru Th17 limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

Posle stimulacije mononuklearnih ćelija kičmene moždine PMA-om i jonomicinom, određivan je procenat ćelija u kojima je ekspimiran IL-17 u okviru populacije TCR $\alpha\beta$ + limfocita. Nađeno je da je procenat ovih ćelija bio veći ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki mladih pacova (Slika 7). Ukupan broj TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ ćelija koje je izolovan iz kičmene moždine mužjaka je takođe bio veći ( $p < 0.001$ ), nego broj ovih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki pacova (Slika 7). Dodatna analiza fenotipa TCR $\alpha\beta$ +IL-17+limfocita je pokazala da je antigen CD8 ispoljen na veoma malom procentu ovih ćelija, te se može zaključiti da su one uglavnom imale fenotip CD4+ T- (Th17) ćelija (Slika 7).

T-limfociti koji sintetišu IL-17 pokazuju značajnu fenotipsku i funkcijsku plastičnost, tako da, u zavisnosti od citokinskog okruženja, diferenciraju u ćelije koje imaju različite ne samo fenotipske, već i funkcijske karakteristike (McGeachy i sar., 2007; El-Behi i sar., 2011; Kaufmann i sar., 2012). Naime, pokazano je da ćelije koje diferenciraju u prisustvu visokih koncentracija IL-6 i IL-23, pored IL-17 sintetišu i INF- $\gamma$  i imaju izražen patogeni potencijal (Ghoreschi i sar., 2010; Duhon i sar., 2013). S druge strane, u prisustvu visokih koncentracija IL-6 i TGF- $\beta$ , Th17 ćelije diferenciraju u ćelije koje pored IL-17 sintetišu i IL-10 i imaju minimalno oštećujuću, ili čak imunoregulatornu ulogu u EAE-u (McGeachy i sar., 2007; Ghoreschi i sar., 2010).

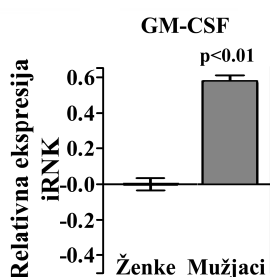
Imajući u vidu prethodno izneto, analiza Th17 ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu mladih pacova je pokazala da je procenat ćelija izraženo patogenog IL-17+IFN- $\gamma$ + fenotipa bio veći ( $p < 0.001$ ) kod mladih mužjaka u poređenju sa ženka pacova (Slika 7). Nasuprot tome, procenat ćelija sa IL-17+IL-10+ fenotipom je bio manji ( $p < 0.001$ ) u okviru Th17 ćelija iz kičmene moždine mužjaka u odnosu na ženke pacova (Slika 7).



**Slika 7. Veći broj TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ ćelija je izolovan na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova i procenat IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija je veći, a IL-17+IL-10+ ćelija manji u Th17 subpopulaciji limfocita nego kod ženki istog uzrasta. (Panel A)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-17 u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-17+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i

(desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. **(B)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IFN-γ u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Procenat IL-17+IFN-γ+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu **(C)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Procenat IL-17+IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

Imajući u vidu podatke koji ukazuju da je patogenost Th17 ćelija kod miševa povezana sa sintezom GM-CSF-a u ovim ćelijama (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011, Duhon i sar., 2013), ispitana je ekspresija iRNK za ovaj citokin u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih pacova. U skladu sa nalazom veće procentualne zastupljenosti izrazito patogenih IL-17+IFN-γ+ ćelija u subpopulaciji Th17 limfocita kod mužjaka, ekspresija iRNK za GM-CSF je bila veća (p < 0.001) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja nego ženki pacova (Slika 8).

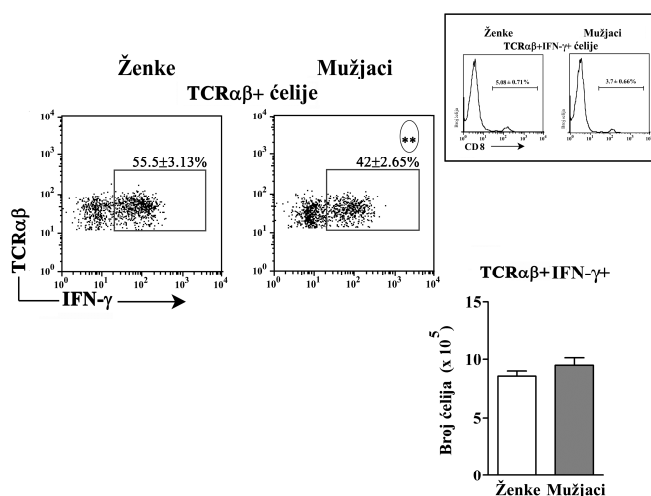


**Slika 8. Ekspresija iRNK za GM-CSF je veća na vrhuncu bolesti u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih ženki i mužjaka pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za β-aktin, ekspresija gena za GM-CSF je “normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za GM-CSF kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za GM-CSF kod ženki ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.



#### 4.1.3.4.2. Manja zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Analiza T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu mladih mužjaka pacova je pokazala da je u okviru ovih ćelija procenat IFN- $\gamma$ + ćelija bio manji ( $p < 0.01$ ) nego kod ženki (Slika 9). Međutim, broj ovih ćelija je bio sličan kod pacova muškog i ženskog pola (Slika 9). Analiza površinske ekspresije antigena CD8 na TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocitima koji su izolovani iz kičmene moždine životinja oba pola je pokazala da su u najvećem procentu to bile CD4+ T- (Th1) ćelije (Slika 9).

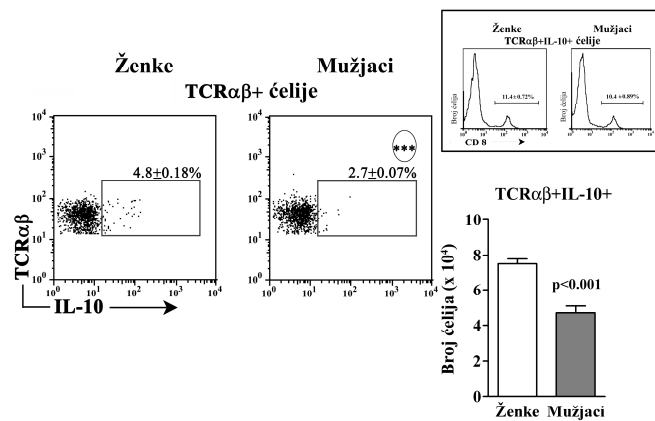


**Slika 9. Procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita je manja u kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IFN- $\gamma$  u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ .

Na osnovu podataka prethodno iznetih u ovom poglavlju, može se zaključiti da je odnos broja Th17 i Th1 ćelija bio više ( $p < 0.001$ ) pomeren na stranu Th17 limfocita u kičmenoj moždini mužjaka ( $0,57 \pm 0,021$ ) nego ženki ( $0,33 \pm 0,012$ ) mladih pacova.

#### *4.1.3.4.3. Manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

Procentualna zastupljenost IL-10+ ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita iz kičmene moždine mladih životinja je bila manja ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki pacova (Slika 10). Takođe, manji ( $p < 0.001$ ) broj ovih ćelija je izolovan iz kičmene moždine mužjaka, u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 10). Nezavisno od pola, većina TCR $\alpha\beta$ +IL-10+ ćelije je bila i CD4+ (Slika 10).



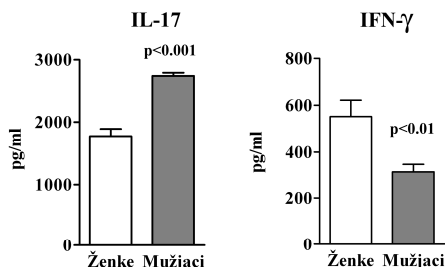
**Slika 10. Procentualna zastupljenost IL-10+ ćelija u populaciji TCRαβ+ limfocita je manja u kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCRαβ+IL-10+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCRαβ+IL-10+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-10+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

#### 4.1.3.4.4. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN-γ i IL-10 u supernatantima kultura restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova

Uporedo sa analizom ekspresije IL-17, IFN-γ i IL-10 u T-limfocitima koji su izolovani iz kičmene moždine mladih pacova, ispitivana je i sekrecija ovih citokina od strane kultiviranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine koje su stimulisane PMA-om i jonomicinom.

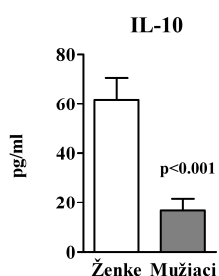
U skladu sa rezultatima dobijenim protočnom citofluorometrijom, izmerena je veća koncentracija IL-17 (p < 0.001), a manja koncentracija IFN-γ (p < 0.01) u

supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih mužjaka, u odnosu na iste ćelijske kulture ženki pacova (Slika 11).



**Slika 11. Mononuklearne ćelije koje su na vrhuncu bolesti izolovane iz kičmene moždine mužjaka posle restimulacije *in vitro* sekretuju više IL-17, a manje IFN-γ nego odgovarajuće ćelije ženki mladih pacova.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) IL-17 i (desno) IFN-γ u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

U skladu sa manjom procentualnom zastupljenošću IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita iz kičmene moždine mladih mužjaka i sekrecija IL-10 je bila manja (p < 0.001), u kulturama njihovih mononuklearnih ćelija koje su restimulisane PMA-om i jonomicinom (Slika 12).



**Slika 12. Mononuklearne ćelije koje su na vrhuncu bolesti izolovane iz kičmene moždine mužjaka posle restimulacije *in vitro* sekretuju manje IL-10 nego odgovarajuće ćelije ženki mladih pacova.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

*4.1.3.4.5 Mononuklearne ćelije kičmene moždine mladih mužjaka pacova ekspimiraju više citokina koji su značajni za diferencijaciju Th17, a manje onih koji su značajni za diferencijaciju Th1 ćelija u odnosu na ženke istog uzrasta*

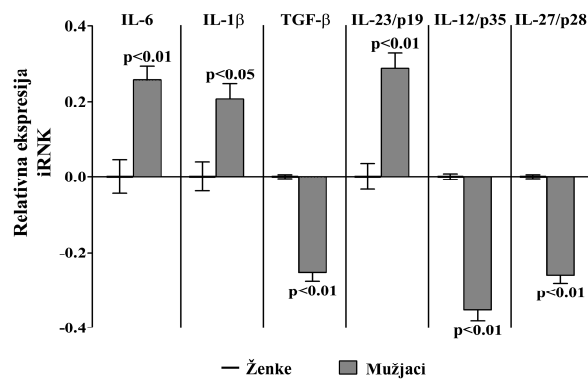
Imajući u vidu prethodno navedene rezultate, u sledećem koraku je analizirana ekspresija gena koji kodiraju citokine za koje je pokazano da imaju ključnu ulogu u razvoju Th17, odnosno Th1 imunskog odgovora.

Poznato je da je u inicijalnoj fazi diferencijacije Th0 ćelija u Th17 ćelije potrebno prisustvo TGF- $\beta$  i IL-6, kao i da ovaj proces pojačavaju TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Stockinger i Veldhoen, 2007). Takođe, pokazano je da je u kasnijim fazama razvoja Th17 ćelija, neophodan IL-23 za njihovo preživljavanje i umnožavanje (Veldhoen i sar., 2006).

Analizom sveže izolovanih mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova, dobili smo da je ekspresija iRNK za IL-6 ( $p < 0.01$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) i IL-23/p19 ( $p < 0.01$ ) bila veća, a ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  ( $p < 0.01$ ) manja nego u odgovarajućim ćelijama ženki (Slika 13).

S druge strane, pokazano je da je IL-12 neophodan za diferencijaciju Th1 ćelija (Prochazkova i sar., 2012). Osim toga, zna se da IL-27 doprinosi usmeravanju Th0 limfocita u Th1 ćelijsku liniju stimulacijom transkripcionog faktora T-bet, kao i da povećava efekte polarizacionog delovanja IL-12 (Fitzgerald i sar., 2007). Pritom, IL-27 recipročno inhibiše razvoj Th17 ćelijske linije u modelima autoimunske neuroinflamacije (Stumhofer i sar., 2006).

U saglasnosti sa manjim procentom Th1 ćelija u populaciji T-limfocita kičmene moždine mužjaka, ekspresija iRNK za IL-12/p35 ( $p < 0.01$ ) i IL-27/p28 ( $p < 0.01$ ) je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja, u odnosu na iste ćelije ženki pacova (Slika 13).



**Slika 13. U mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 limfocita je veća, a ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th1 limfocita manja nego kod ženki na vrhuncu bolesti.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 (IL-6, IL-1β, TGF-β, IL-23/p19) i Th1 (IL-12/p35, IL-27/p28) limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za β-aktin, ekspresija gena za prikazane citokine je “normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za IL-6, IL-1β, TGF-β, IL-23/p19, IL-12/p35, IL-27/p28 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine kod ženki ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

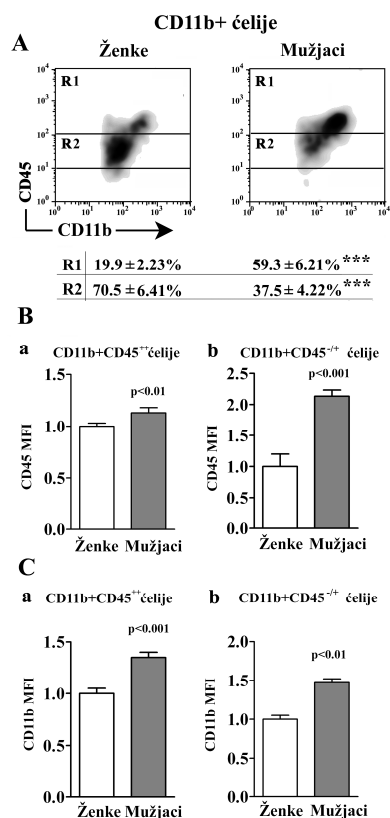
#### 4.1.3.5. Polne razlike u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih pacova

Ćelije urođene imunosti - rezidentne ćelije mikroglije, ali i monociti koji krvlju dolaze u kičmenu moždinu sa periferije i tu se konvertuju u inflamatorne makrofage i dendritske ćelije (Croxford i sar., 2015b), imaju važnu ulogu u patogenezi EAE-a. Ove ćelije su važne za prezentaciju antigena T-limfocitima koji su specifični za neuroantigene i, sledstveno, njihovu reaktivaciju, kao i za diferencijaciju Th ćelija, sekrecijom polarizacionih citokina (Almolda i sar., 2011; Croxford i sar., 2015a). Pored toga, ćelije urođene imunosti i direktno učestvuju u oštećenju tkiva, sintezom proinflamatornih citokina i reaktivnih oblika kiseonika i azota, ali i u uklanjanju oštećenog tkiva (Almolda i sar., 2011; Parajuli i sar., 2012;

Croxford i sar., 2015b). Imajući u vidu ove činjenice, u sledećem koraku je ispitivan polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama ovih ćelija.

Ćelije urođene imunosti u CNS-u se identifikuju na osnovu površinske ekspresije molekula CD11b, a na osnovu nivoa površinske ekspresije molekula CD45 se može razdvojiti nekoliko tipova ovih ćelija (Perry i Teeling, 2013). Neaktivisane, "mirujuće" (*engl.* resting) ćelije mikroglije odlikuje veoma nizak nivo površinske ekspresije CD45 (CD45<sup>-</sup> ćelije), dok aktivisane ćelije mikroglije pokazuju viši nivo površinske ekspresije CD45 (CD45<sup>+</sup> ćelije) (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009). Iako jako aktivisana mikroglija može imati visoku ekspresiju CD45, smatra se da najviši nivo ekspresije ovog molekula (CD45<sup>++</sup> ćelije) uglavnom imaju inflamatorni makrofagi i dendritske ćelije monocitnog porekla (Zhang i sar., 2002; Croxford i sar., 2015a).

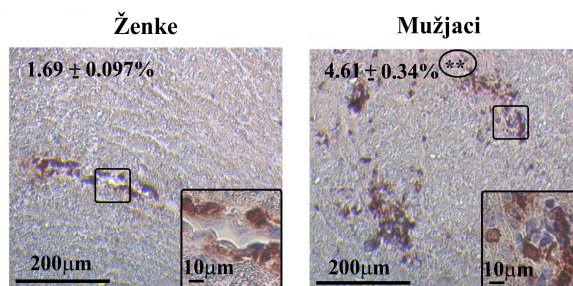
Analiza CD11b<sup>+</sup> ćelija je pokazala da je kod mladih mužjaka pacova bilo procentualno više ( $p < 0.001$ ) CD45<sup>++</sup> ćelija u okviru ove ćelijske populacije, u poređenju sa ženkama pacova (Slika 14). Budući da nije bilo moguće jasno razdvojiti subpopulacije CD45<sup>-</sup> i CD45<sup>+</sup> ćelija, ispitivana je CD45<sup>-/+</sup> subpopulacija ćelija. Njen procentualni udeo u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija je bio manji kod mužjaka ( $p < 0.001$ ), nego kod ženki mladih pacova (Slika 14). Površinska gustina ekspresije (sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescence, MFI) CD45 molekula na CD45<sup>-/+</sup> ćelijama ( $p < 0.001$ ), kao i na CD45<sup>++</sup> ćelijama ( $p < 0.01$ ), je takođe bila veća kod mužjaka pacova (Slika 14). Nađeno je i da je MFI za CD11b molekul bio veći na površini CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-/+</sup> ( $p < 0.01$ ) i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> ( $p < 0.001$ ) ćelija kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova ovog uzrasta (Slika 14).



**Slika 14. Procentualna zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija je veća, a CD45<sup>-/+</sup> ćelija manja u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih mušjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti. (A) Gustinski protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju molekula CD45 na CD11b+ ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mušjaka mladih pacova. Procenti CD45<sup>++</sup> i CD45<sup>-/+</sup> ćelija u okviru CD11b+ ćelija su prikazani u svakom regionu (R). R1 = CD45<sup>++</sup> ćelije; R2 = CD45<sup>-/+</sup> ćelije. (Panel B) Histogrami prikazuju srednji intenzitet fluorescence (MFI) za molekul CD45 na (a) CD11b+CD45<sup>++</sup> i (b) CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mušjaka mladih pacova. (Panel C) Histogrami prikazuju MFI za molekul CD11b na (a) CD11b+CD45<sup>++</sup> i (b) CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mušjaka mladih pacova. MFI za molekule CD45 i CD11b na CD11b+CD45<sup>++</sup> i CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelijama za mušjake je prikazivan u odnosu na MFI za ove molekule na odgovarajućim ćelijama ženki (vrednost 1). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.**

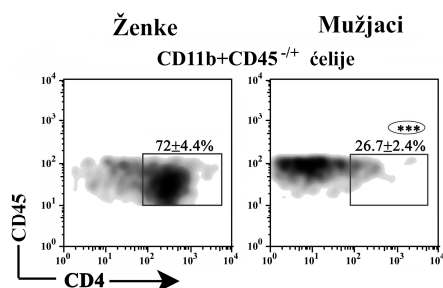


U saglasnosti sa rezultatima dobijenim protočnom citofluorometrijom, imunohistohemijska analiza preseka tkiva kičmene moždine je pokazala da je gustina ćelija koje ispoljavaju antigen ED1 (CD68), za koji se smatra da je marker aktivisane mikroglije i makrofaga (Jones i sar., 2004), bila veća ( $p < 0.01$ ) na presecima kičmene moždine mladih mužjaka nego ženki pacova (Slika 15).



**Slika 15. Gustina ED1+ ćelija na presecima tkiva kičmene moždine je veća na vrhuncu bolesti kod mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.** Fotomikrografije ilustruju ekspresiju antigena ED1 na presecima tkiva kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova (opisano u poglavlju Materijal i metode). Gustina ED1+ ćelija prikazana je u gornjem levom uglu svake fotomikrografije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=3/pol$ ). \*\*  $p < 0.01$ .

Pokazano je da ćelije mikroglije ispoljavaju fenotipsku i funkcijsku heterogenost i izuzetnu plastičnost, tako da u EAE-u mogu imati proinflamatornu - oštećujuću, ali i zaštitnu, imunoregulatornu ulogu (Rawji i Yong, 2013, Croxford i sar., 2015b). S obzirom na to da kod pacova ushodna regulacija površinske ekspresije CD4 molekula na ćelijama mikroglije koincidira sa početkom faze oporavka u EAE-u, pretpostavlja se da CD4+ ćelije mikroglije imaju imunoregulatorna svojstva (Almolda i sar., 2009). Shodno tome, ispitivana je površinska ekspresija CD4 molekula na CD11b+CD45<sup>-/+</sup> populaciji ćelija kičmene moždine mladih pacova. Nađeno je da je procentualna zastupljenost CD4+ ćelija u okviru ćelija mikroglije kod mužjaka bila drastično manja ( $p < 0.001$ ) u odnosu na ženke pacova (Slika 16).

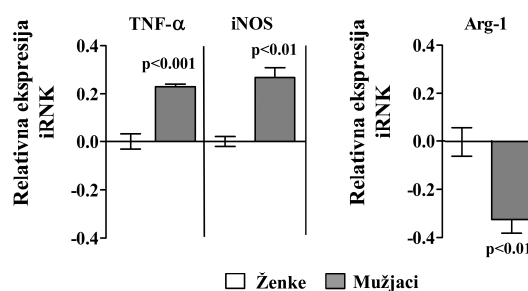


**Slika 16. Procenat CD4+ ćelija u subpopulaciji CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova na vrhuncu bolesti je manji nego kod ženki istog uzrasta.** Gustinski protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju molekula CD4 na CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD4+ ćelija u okviru CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelija je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

#### 4.1.3.6. Veća ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine mladih pacova ispitivana je i ekspresija gena za TNF- $\alpha$ , za koji je pokazano da ima važnu ulogu u nastanku oštećenja tkiva u organ-specifičnim autoimunskim bolestima (Kollias i sar., 1999). Takođe, ispitivana je ekspresija gena i za enzim iNOS, koji katalizuje sintezu NO-a iz L-arginina i ima važnu ulogu u oštećenju tkiva u MS-i i EAE-u (Kim i sar., 2000; Liu i sar., 2001). Nađeno je da je ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  (p < 0.001), kao i za iNOS (p < 0.01), bila veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki mladih pacova (Slika 17).

Osim toga, ispitivana je i ekspresija iRNK za Arg-1, enzima koji je inverzno eksprimiran u tkivu u odnosu na iNOS, budući da koristi isti supstrat L-arginin. Shodno tome, ovaj enzim deluje protektivno u EAE-u ograničavanjem količine supstrata za produkciju toksičnog NO-a (Ahn i sar., 2012). Ekspresija iRNK za Arg-1 je bila manja (p < 0.05) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka u poređenju sa ženkama istog uzrasta (Slika 17).

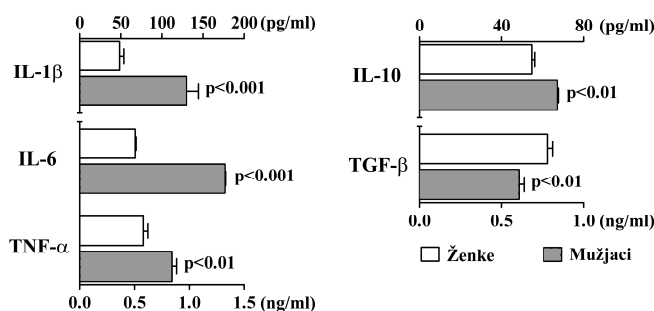


**Slika 17. U mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS je veća, a ekspresija iRNK za Arg-1 manja na vrhuncu bolesti nego kod ženki istog uzrasta.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK za (levo) TNF- $\alpha$  i iNOS i (desno) Arg-1 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za prikazane citokine je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ , iNOS i Arg-1 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajući citokin i enzim kod ženki  $\pm$  SEM (n = 6/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.3.6.1. Veća ekspresija proinflamatornih medijatora u CD11b+ ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

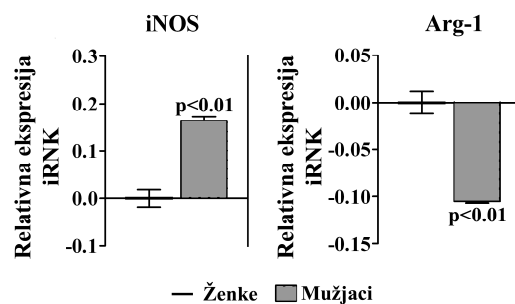
Da bi se ispitala uloga CD11b+ (mijeloidnih) ćelija u neuroinflamaciji indukovanoj inokulacijom singene kičmene moždine pacovima, analizirana je (i) koncentracija proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u supernatantima kultivisanih CD11b+ ćelija i (ii) ekspresija iRNK za oštećujuće i anti-inflamatorne/imunoregulatorne enzime u kultivisanim CD11b+ ćelijama.

Nađeno je da su koncentracije IL-6 ( $p < 0.001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) i IL-10 ( $p < 0.01$ ), bile veće u supernatantima kultura CD11b+ ćelija koje su bile magnetno izdvojene iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine mužjaka nego ženki (Slika 18). S druge strane, koncentracija TGF- $\beta$  je bila manja ( $p < 0.01$ ) u supernatantima kultura CD11b+ ćelija kičmene moždine mužjaka u poređenju sa kulturama istih ćelija ženki pacova (Slika 18).



**Slika 18. Polni dimorfizam u koncentraciji proinflamatornih i anti-inflamatornih/imunoregulatornih citokina u supernatantima kultura CD11b+ ćelija koje su izdvojene iz kičmene moždine mladih pacova na vrhuncu bolesti.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) proinflamatornih (IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i (desno) anti-inflamatornih/imunoregulatornih (IL-10 i TGF- $\beta$ ) citokina u supernatantima kultura CD11b+ ćelija koje su magnetno izdvojene iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

Osim toga, ekspresija iRNK za iNOS je bila veća ( $p < 0.01$ ), a ekspresija iRNK za kompetitivni enzim Arg-1 manja ( $p < 0.01$ ) u kultivisanim CD11b+ ćelijama kičmene moždine mužjaka nego u istim ćelijama ženki mladih pacova (Slika 19).



**Slika 19. U kultivisanim CD11b+ ćelijama kičmene mladih mužjaka pacova ekspresija iRNK za iNOS je veća, a ekspresija iRNK za Arg-1 manja na vrhuncu bolesti nego kod ženki istog uzrasta.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK za (levo) iNOS i (desno) Arg-1 u kultivisanim CD11b+ ćelijama koje su magnetno izdvojene iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova (opisano u poglavlju Materijal i metode). Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za prikazane enzime je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za iNOS i Arg-1 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajući enzim kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 6/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

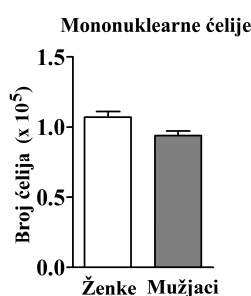
#### ***4.1.4. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti***

Imajući u vidu podatke koji ukazuju na postojanje polnog dimorfizma u parametrima neuroinflamacije u kičmenoj moždini mladih pacova kojima je inokulisana singena kičmena moždina, nametnulo se pitanje da li ovaj polni dimorfizam potiče od polnih razlika u imunskom odgovoru na periferiji ili se uspostavlja na nivou ciljnog organa. Da bi se odgovorilo na ovo pitanje, analizirane su fenotipske i funkcijske karakteristike CD4+ T-limfocita i mijeloidnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova.

4.1.4.1. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti

4.1.4.1.1. Veća zastupljenost CD134+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita i njihova efikasnija reaktivacija u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

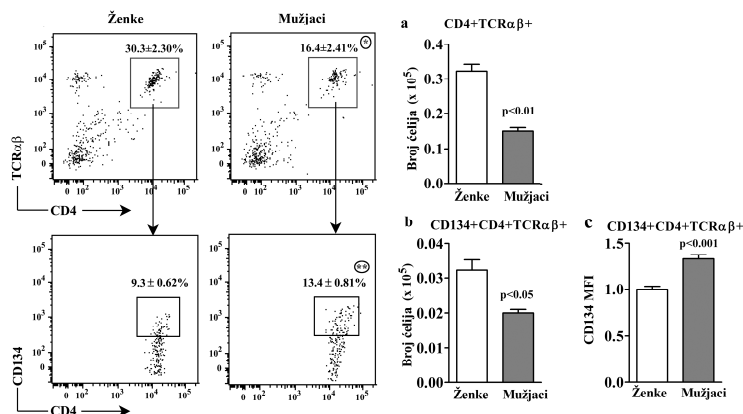
Ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova se nije značajno razlikovao u induktivnoj fazi EAE-a (Slika 20).



**Slika 20. Broj ukupnih mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti se ne razlikuje između polova.** Histogram prikazuje ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

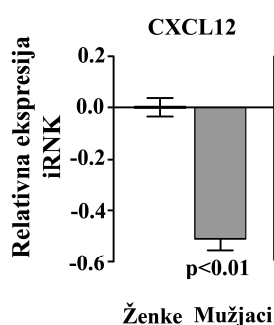
Analizom ekspresije površinskih markera, pokazano je da su procentualna zastupljenost CD4+ ćelija u okviru T-limfocita ( $p < 0.05$ ), kao i broj ( $p < 0.01$ ) ovih ćelija bili manji u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta (Slika 21). Međutim, analiza ekspresije aktivacijskog markera CD134 je pokazala da je procenat reaktivisanih, CD134+ ćelija bio veći ( $p < 0.01$ ) u okviru subpopulacije CD4+ limfocita kod mužjaka u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 21). Sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescence, površinska gustina ekspresije ovog molekula je takođe bila veća ( $p < 0.001$ ) na CD134+ CD4+ T-ćelijama mužjaka nego ženki pacova (Slika 21). Međutim, manji ( $p < 0.05$ ) broj

CD134+ CD4+ T-ćelija je izolovan iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta (Slika 21).



**Slika 21. Procenat CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita i površinska gustina ekspresije CD134 molekula na tim ćelijama su veći u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova, ali je apsolutni broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita manji nego kod ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvojeni ("gejtovani") kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCRαβ+ limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (a) broj CD4+TCRαβ+ limfocita, (b) broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita i (c) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za molekul CD134 na CD4+TCRαβ+CD134+ limfocitima iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. MFI za molekul CD134 na CD4+TCRαβ+CD134+ limfocitima za mužjake je prikazivan u odnosu na MFI za ovaj molekul na odgovarajućim ćelijama ženki (vrednost 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Da bi se utvrdilo da li je manji broj CD4+ T-ćelija kod mužjaka odražavao manju transmigraciju ovih ćelija kroz hemato-spinalnu barijeru, analizirana je ekspresija iRNK za hemokin CXCL12, za koji je pokazano da ima važnu ulogu u kontroli transmigracije CD4+ T-ćelija kroz hemato-encefalnu/hemato-spinalnu barijeru kod glodara (McCandless i sar., 2006; Miljković i sar., 2011). Nađeno je da je ekspresija iRNK za CXCL12 bila manja ( $p < 0.01$ ) u tkivu kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova (Slika 22).

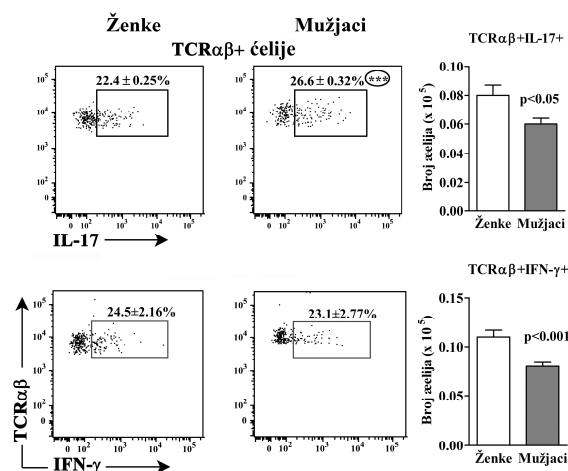


**Slika 22. Ekspresija iRNK za CXCL12 je u induktivnoj fazi bolesti manja u tkivu kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za CXCL12 u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za CXCL12 je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za CXCL12 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za CXCL12 kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.4.1.2. Veća zastupljenost IL-17+ ćelija, a manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

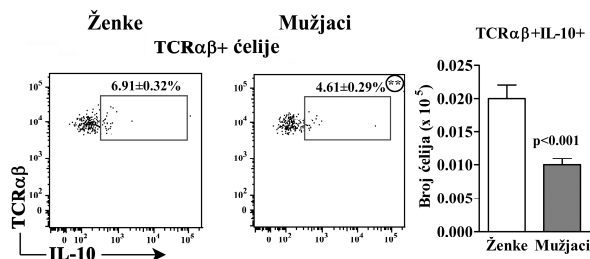
Protočno-citofluorometrijska analiza je pokazala da je procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija bila veća ( $p < 0.001$ ) u okviru populacije T-limfocita koji su 7. d.p.i. izolovani iz kičmene moždine mužjaka nego ženki mladih pacova (Slika 23). Procenat IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita kičmene moždine se nije razlikovao između polova (Slika 23). Broj ćelija koje sintetišu IL-17 je, međutim, bio manji kod mužjaka u ovoj fazi bolesti ( $p < 0.05$ ), kao i broj ćelija koje sintetišu IFN- $\gamma$  ( $p < 0.001$ ) u poređenju sa ženkama mladih pacova (Slika 23).





Slika 23. Manji broj TCRαβ+IL-17+ i TCRαβ+IFN-γ+ ćelija je izolovan u induktivnoj fazi bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta. Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju (gornji) IL-17 i (donji) IFN-γ u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-17+ i IFN-γ+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita prikazani su na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju broj (gornji) TCRαβ+IL-17+ i (donji) TCRαβ+IFN-γ+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

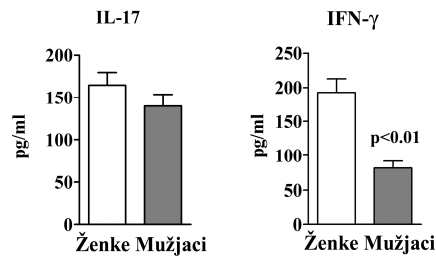
Analizom T-limfocita koji su 7. d.p.i. izolovani iz kičmene moždine mužjaka, dobijeno je da je procentualna zastupljenost ćelija koje eksprimiraju IL-10 manja ( $p < 0.01$ ), kao i broj ( $p < 0.001$ ) ovih ćelija u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 24).



**Slika 24. Manji broj TCRαβ+IL-10+ limfocita je izolovan u induktivnoj fazi bolesti iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita prikazan je na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCRαβ+IL-10+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ .

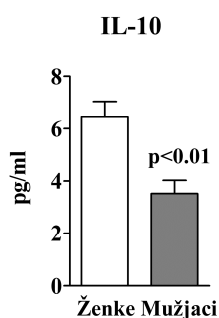
#### 4.1.4.1.3. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN-γ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova

Koncentracija IL-17 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz kičmene moždine mladih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom, se nije razlikovala između polova, dok je koncentracija IFN-γ bila manja ( $p < 0.01$ ) u ovim supernatantima mužjaka nego ženki pacova (Slika 25).



**Slika 25. U supernatantima kultura restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova koncentracija IL-17 se ne razlikuje, a koncentracija IFN- $\gamma$  je manja u odnosu na ženke u induktivnoj fazi bolesti.** Histogrami prikazuju koncentracije (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova i restimulirane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

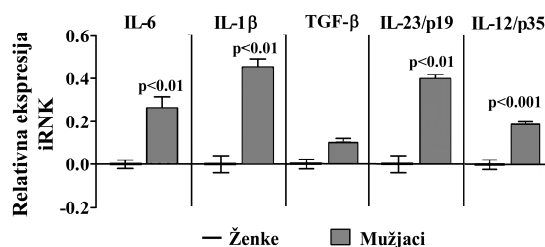
U skladu sa manjim brojem T-limfocita koji ekspimiraju IL-10 kod mužjaka pacova, u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine ovih životinja, posle restimulacije PMA-om i jonomicinom, koncentracija IL-10 je bila manja ( $p < 0.01$ ) u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 26).



**Slika 26. Mononuklearne ćelije koje su izolovane iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova u induktivnoj fazi bolesti posle restimulacije *in vitro* sekretuju manje IL-10 nego odgovarajuće ćelije ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova i restimulirane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.4.1.4. Veća ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U sledećem koraku, u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih životinja, analizirana je ekspresija gena za citokine koji imaju važnu ulogu u diferencijaciji Th17 i Th1 limfocita. Nađeno je da je ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 limfocita (IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19) (Veldhoen i sar., 2006, Stockinger i Veldhoen, 2007) veća ( $p < 0.01$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka u odnosu na iste ćelije ženki pacova (Slika 27). Ekspresija iRNK za TGF- $\beta$ , za koji se takođe smatra da učestvuje u polarizaciji Th ćelija ka Th17 ćelijskoj liniji (Veldhoen i sar., 2006), se nije značajno razlikovala između polova (Slika 27). Ekspresija iRNK za IL-12/p35, citokina od najvećeg značaja za diferencijaciju Th1 ćelija (Prochazkova i sar., 2012), je takođe bila veća ( $p < 0.001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego u istim ćelijama ženki pacova (Slika 27).

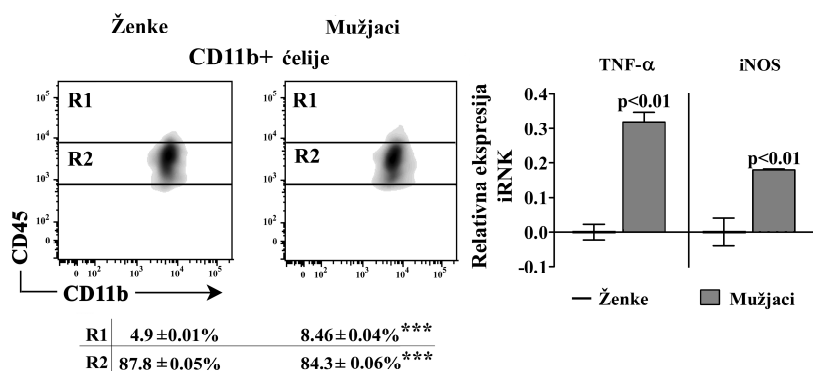


**Slika 27. Ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 ćelija u induktivnoj fazi bolesti je veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19) i Th1 (IL-12/p35) limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19 i IL-12/p35 je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19 i IL-12/p35 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajući citokin kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.4.1.5. Veća zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Analiza ekspresije CD45 molekula na površini CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine je pokazala da je zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija, pre pojave prvih neuroloških znakova EAE-a, bila veća ( $p < 0.001$ ) u kičmenoj moždini mužjaka u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 28). Procentualna zastupljenost CD45<sup>+/+</sup> ćelija u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija je u ovoj fazi bolesti bila veća kod mužjaka nego kod ženki pacova ( $p < 0.001$ ) (Slika 28).

Pored toga, ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) i iNOS ( $p < 0.01$ ) je takođe bila veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka, u poređenju sa ženkama mladih pacova (Slika 28).

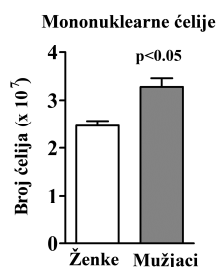


**Slika 28. Zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija i ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine su veći u induktivnoj fazi bolesti kod mužjaka nego kod ženki mladih pacova.** Gustinski protočno-citofluorometrijski profili prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD45 na CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenti CD45<sup>++</sup> i CD45<sup>+/+</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija su prikazani u svakom regionu (R). R1 = CD45<sup>++</sup> ćelije; R2 = CD45<sup>+/+</sup> ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka mladih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za TNF- $\alpha$  i iNOS je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

4.1.4.2. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti

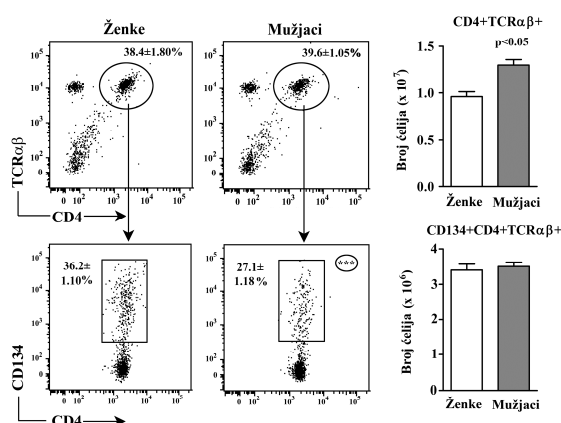
4.1.4.2.1. *Manja procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

Ukupan broj mononuklearnih ćelija izdvojen iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka je bio veći ( $p < 0.05$ ) u induktivnoj fazi EAE-a u odnosu na ženke mladih pacova (Slika 29).



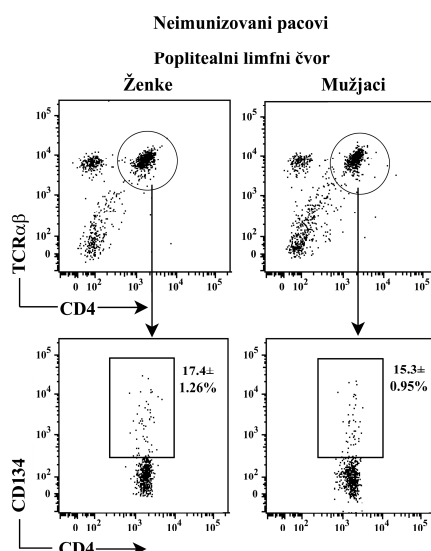
**Slika 29. Više ukupno mononuklearnih ćelija je izolovano u induktivnoj fazi bolesti iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova.** Histogram prikazuje ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

U skladu sa prethodnim nalazom, broj CD4+ T-ćelija koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka je bio veći ( $p < 0.05$ ) nego kod ženki pacova, iako se procentualni udeo CD4+ T-limfocita u ukupnim mononuklearnim ćelijama nije razlikovao između polova (Slika 30). Međutim, procenat CD4+ T-limfocita koji su ispoljavali aktivacijski marker CD134 je bio manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki pacova (Slika 30). Broj ovih ćelija koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora se nije razlikovao između oba pola mladih pacova (Slika 30).



**Slika 30. Više CD4+TCRαβ+ limfocita je izolovano u induktivnoj fazi bolesti iz drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova, a procenat CD134+ ćelija u ovoj subpopulaciji limfocita je manji nego kod ženki istog uzrasta.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvajani (“gejtovani”) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCRαβ+ limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (gornji) broj CD4+TCRαβ+ limfocita i (donji) broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

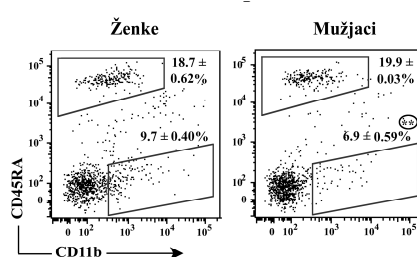
Prethodni nalaz je nametnuo pitanje da li su polne razlike u procentualnoj zastupljenosti aktivisanih, CD134+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova, odraz polnih razlika u sposobnosti aktivacije ovih ćelija na inokulaciju antigena singene kičmene moždine. Da bi se odgovorilo na to pitanje, ispitan je procenat CD134+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita poplitealnog čvora neimunizovanih mladih pacova oba pola. Nađeno je da se on nije značajno razlikovao između neimunizovanih ženki i mužjaka pacova (Slika 31). Međutim, poređenjem nalaza kod neimunizovanih i imunizovanih pacova, indirektno se može zaključiti da je procentualni porast u zastupljenosti aktivisanih CD4+ T-limfocita poplitealnog limfnog čvora bio manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka ( $42,1 \pm 2,48\%$ ) u odnosu na ženke ( $100,0 \pm 3,87\%$ ) mladih pacova.



**Slika 31. Odsustvo polnog dimorfizma u procentu CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita poplitealnog limfnog čvora kod neimunizovanih mladih pacova.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocitima poplitealnog limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih neimunizovanih pacova. CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfociti su izdvajani ("gejtovani") kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD134+ ćelija u okviru CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu ( $n = 5/\text{pol}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.



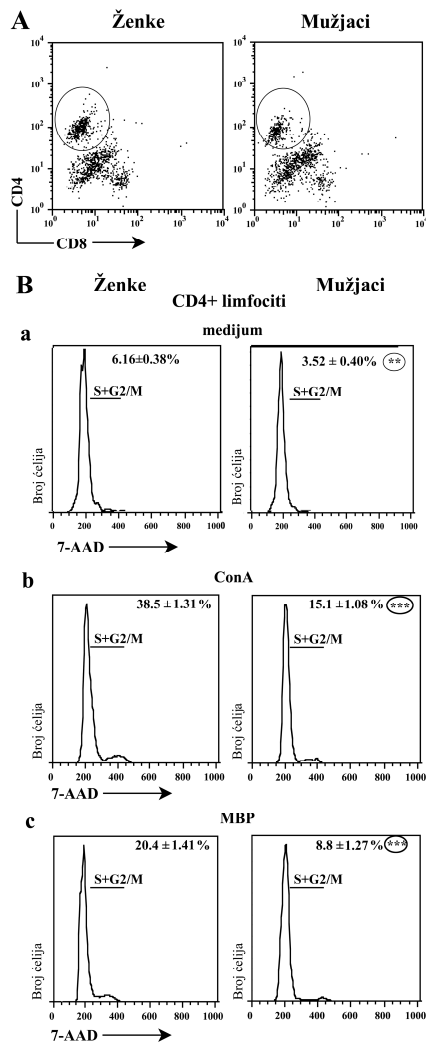
Imajući u vidu ulogu APC u aktivaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita, analizirana je zastupljenost CD11b+CD45RA- ćelija, kojima pripadaju konvencionalne dendritske ćelije i makrofagi (Robinson i sar., 1986), u drenirajućem limfnom čvoru mladih životinja. Nađeno je da je procenat ovih ćelija bio značajno manji ( $p < 0.01$ ) među mononuklearnim ćelijama koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova (Slika 32).



**Slika 32. Procentualna zastupljenost CD11b+CD45RA- ćelija je manja u okviru mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD45RA i CD11b na mononuklearnim ćelijama koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD11b+CD45RA- ćelija je označen na svakom protočno-citofluorimetrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ .

*4.1.4.2.2. Manja in vitro proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora na stimulaciju MBP-om kod mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

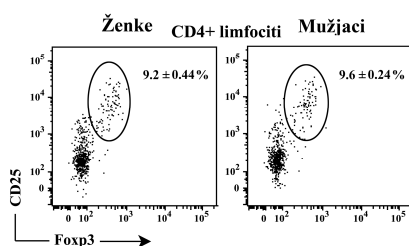
Znajući da aktivacija limfocita specifičnim antigenima, u ovom slučaju autoantigenima kičmene moždine, po pravilu dovodi do njihove klonske ekspanzije, ispitivano je postojanje polnog dimorfizma u proliferativnom odgovoru CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora. U bazalnim uslovima, procenat CD4+ limfocita u aktivnim (S+G2/M) fazama ćelijskog ciklusa je bio manji ( $p < 0.01$ ) u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka, u poređenju sa istim ćelijskim kulturama ženki pacova (Slika 33). Slično, u kulturama stimulisanim sa ConA ili MBP-om, procenat CD4+ limfocita u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa je bio manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki mladih pacova (Slika 33).



**Slika 33. Proliferacija CD4+ limfocita u odgovoru na stimulaciju MBP-om je manja u kulturama mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta. (A)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju strategiju za izdvajanje (“gejtovanje”) CD4+ limfocita iz kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova. **(Panel B)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju distribuciju CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova, kultivisanih (a) samo u medijumu ili u prisustvu (b) ConA i (c) MBP-a, po fazama ćelijskog ciklusa na osnovu bojenja fluorescentnom DNK-vezujućom bojom 7-AAD. Procenat ćelija u aktivnim (S+G2/M) fazama ćelijskog ciklusa je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom histogramu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

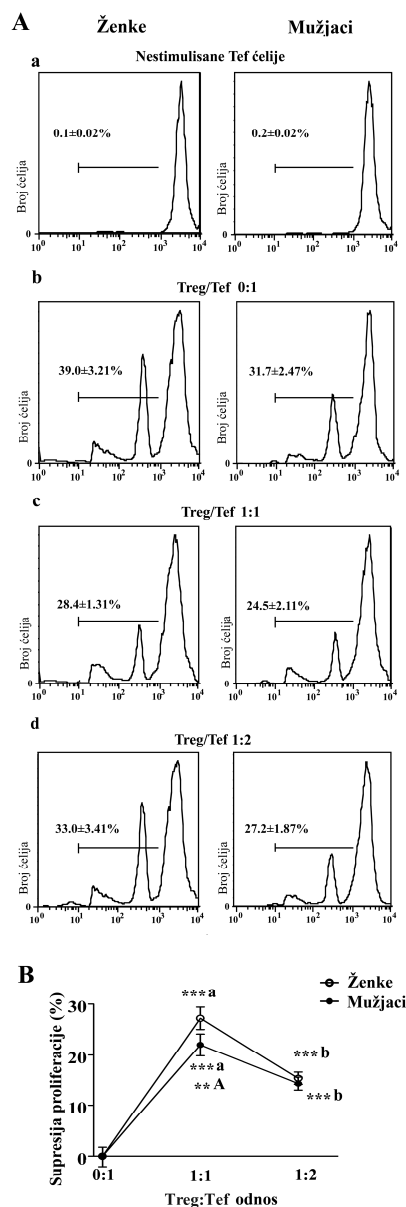
#### 4.1.4.2.3. Polni diergizam u supresorskoj funkciji Treg ćelija limfnog čvora mladih pacova

Pokazano je da regulatorne CD4+ T-ćelije mogu da suprimiraju proliferaciju efektorskih CD4+ limfocita *in vivo* i *in vitro* (de la Rosa i sar., 2004; Reddy i sar., 2005), kao i da polne razlike u supresorskom kapacitetu regulatornih ćelija mogu da doprinose polnim razlikama u osetljivosti miševa na indukciju EAE-a (Reddy i sar., 2005). Imajući u vidu prethodno izneto, u sledećem koraku je ispitivano da li je manja *in vitro* proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora mužjaka posledica polnih razlika u zastupljenosti i/ili supresorskoj funkciji regulatornih CD4+ limfocita. Nađeno je da se procenat CD25+Foxp3+ ćelija nije značajno razlikovao u okviru CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova oba pola (Slika 34).



**Slika 34. Procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora se ne razlikuje kod mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD25 i Foxp3 bojenje CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorimetrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

Zatim je, u *in vitro* testu supresije proliferacije, ispitivan funkcijski kapacitet Treg ćelija limfnih čvorova. U kulturama u kojima je odnos Treg:Tef ćelija bio 1:1, supresija proliferacije je bila manja ( $p < 0.01$ ) nego kod ženki pacova (Slika 35). Ova razlika nije uočena pri odnosu Treg:Tef 1:2 (Slika 35).

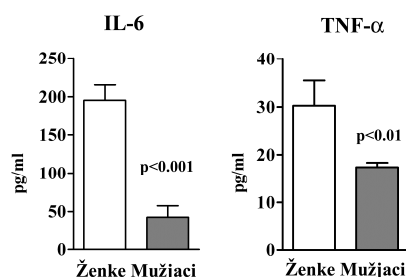


**Slika 35. U *in vitro* testu, supresija proliferacije je manja kod mladih mužjaka pacova u kulturama u kojima je odnos Treg:Tef ćelija 1:1 u poređenju sa ovim kulturama ćelija ženki istog uzrasta. (Panel A)** Treg i Tef ćelije su magnetno izdvojene iz suspenzije mononuklearnih ćelija limfnih čvorova ženki i mužjaka mladih pacova (opisano u poglavlju Materijal i metode) i stimulisane anti-CD3 i anti-CD28 antitelima tokom 72 h u odnosu Treg:Tef 0:1, 1:1 i 1:2. Procenat proliferišućih Tef ćelija je određivan na osnovu dilucije fluorescentne boje CFSE (opisano u poglavlju Materijal i metode). Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju diluciju boje CFSE (a) nestimulisanih i stimulisanih Tef ćelija kultivisanih (b) bez ili u prisustvu Treg ćelija u odnosu (c) Treg:Tef 1:1 i (d) Treg:Tef 1:2 kod (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Procenat

proliferišućih Tef ćelija je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. **(B)** Linijski grafikon prikazuje procenat supresije proliferacije Tef ćelija u kulturama sa različitim odnosom broja Tef i Treg ćelija. Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i Treg:Tef odnosa ( $F_{(1,20)} = 6.42$ ;  $p < 0.05$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova i različitih odnosa Treg i Tef ćelija. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6/\text{pol}$ ). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; <sup>A</sup> u odnosu na ženke; <sup>a</sup> u odnosu na Treg:Tef 0:1; <sup>b</sup> u odnosu na Treg:Tef 1:1.

Imajući u vidu prethodni nalaz, određen je i odnos broja reaktivisanih, CD134+ CD4+ T-limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u drenirajućem limfnom čvoru i on je bio povoljniji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka ( $2,9 \pm 0,14$ ) nego kod ženki ( $5,0 \pm 0,12$ ) pacova.

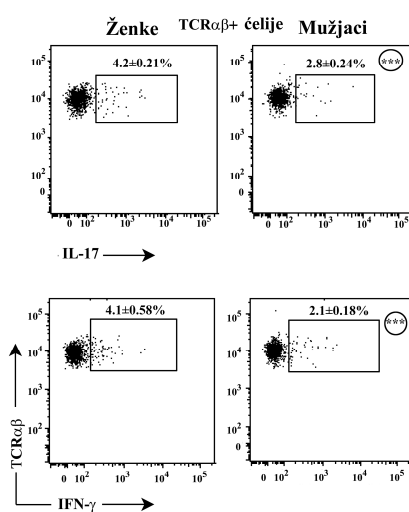
Pored toga, budući da je pokazano da u modelima autoimunske inflamacije proinflamatorni citokini (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) inhibišu supresorsku funkciju regulatornih limfocita (Korn i sar., 2007; Schadenberg i sar., 2011), ispitana je sekrecija ovih citokina u nestimulisanim kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova. Nađeno je da je sekrecija IL-6 ( $p < 0.001$ ) i TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) bila manja u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka u odnosu na iste kulture ćelija ženki pacova (Slika 36).



**Slika 36. Koncentracija IL-6 i TNF- $\alpha$  je manja u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) IL-6 i (desno) TNF- $\alpha$  u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova i kultivisane 72 h u bazalnim uslovima (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.4.2.4. Manja zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

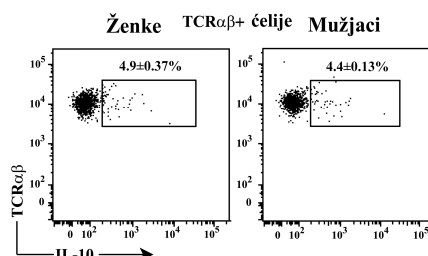
U cilju sagledavanja doprinosa polnih razlika u funkcijskim karakteristikama T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora za nastanak polnog dimorfizma koji je prethodno opisan u citokinskom profilu ovih ćelija kičmene moždine, ispitivan je citokinski profil T-limfocita koji su 7. d.p.i. izolovani iz drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova. Procentualna zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u populaciji T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mužjaka je bila manja ( $p < 0.001$ ) u odnosu na ženke pacova (Slika 37).



**Slika 37. U kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova procentualna zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita je manja nego kod ženki u induktivnoj fazi bolesti. Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-17+ i IFN $\gamma$ + ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita su označeni na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\*  $p < 0.001$ .**



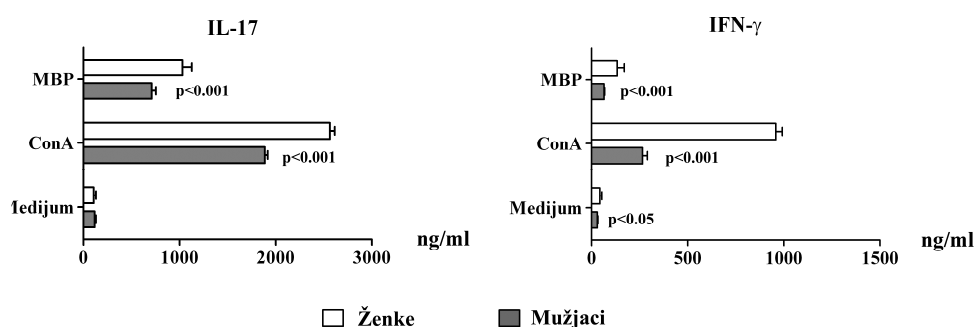
S druge strane, procentualna zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora se nije značajno razlikovala između ženki i mužjaka mladih pacova (Slika 38).



**Slika 38. U kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova nije bilo polnog dimorfizma u zastupljenosti IL-10+ ćelija u populaciji TCRαβ+ limfocita u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka mladih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita su označeni na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

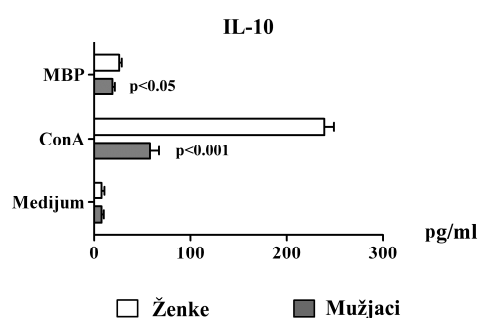
4.1.4.2.5. Manja koncentracija IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10 u supernatantima kultura restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U skladu sa nalazima iznetim u prethodnom poglavlju je bila i manja koncentracija IL-17 ( $p < 0.001$ ) i IFN- $\gamma$  ( $p < 0.001$ ) u supernatantima kultiviranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka stimuliranih MBP-om i sa ConA (Slika 39). Za razliku od IL-17, čija je koncentracija bila slična u supernatantima nestimuliranih ćelija ženki i mužjaka mladih pacova, koncentracija IFN- $\gamma$  je u bazalnim uslovima bila manja kod mužjaka nego kod ženki pacova (Slika 39).



**Slika 39. Koncentracija IL-17 i IFN- $\gamma$  je manja u supernatantima MBP-om stimuliranih kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova i kultivisane 72 h u bazalnim uslovima ili u prisustvu ConA ili MBP-a (opisano u poglavlju Materijal i metode). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i stimulatora na sekreciju IL-17 ( $F_{(2,48)} = 22.65$ ;  $p < 0.001$ ) i IFN- $\gamma$  ( $F_{(2,48)} = 133.8$ ;  $p < 0.001$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

Koncentracija IL-10 je takođe bila manja u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka, u prisustvu MBP-a ( $p < 0.001$ ) i ConA ( $p < 0.05$ ), u poređenju sa istim kulturama ćelija ženki mladih pacova (Slika 40). Koncentracija ovog citokina se nije razlikovala u supernatantima nestimuliranih kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova (Slika 40).



**Slika 40. Koncentracija IL-10 je manja u supernatantima MBP-om stimuliranih kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka mladih pacova i kultivisane 72 h u bazalnim uslovima ili u prisustvu ConA ili MBP-a (opisano u poglavlju Materijal i metode). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i stimulatora na sekreciju IL-10 ( $F_{(2,48)} = 144.1$ ;  $p < 0.001$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.



Neurološki znaci EAE-a su se kod starih pacova javili nešto kasnije u odnosu na mlade pacove, ali je bolest takođe bila akutnog, monofaznog toka i trajala je kraće kod mužjaka ( $p < 0.05$ ) nego kod ženki pacova (Tabela 3). Posle 22. d.p.i., nijedna životinja nije pokazivala neurološke znake bolesti (Slika 41).

**Tabela 3. Uticaj pola na kliničke parametre EAE-a kod starih pacova.**

Pol	Incidenca	Početak bolesti <sup>a</sup>	Srednji maksimalni znak <sup>b</sup>	Indeks težine bolesti <sup>c</sup>	Trajanje bolesti (dani) <sup>d</sup>
Ženke	6/18 (33,3%)	11,3 ± 0,21	1,4 ± 0,37	0,9 ± 0,15	9,0 ± 1,59
Mušjaci	3/18 (16,7%)	12,3 ± 0,33	0,5 ± 0,00*	0,5 ± 0,00*	4,2 ± 0,33*

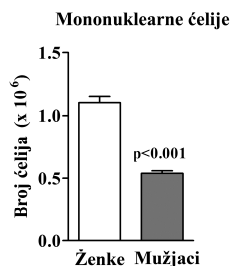
<sup>a</sup> Dan posle imunizacije kada su pacovi ispoljili prve kliničke znake EAE-a; <sup>b</sup> suma maksimalnih kliničkih znakova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj pacova sa kliničkim znacima EAE-a u grupi; <sup>c</sup> suma kumulativnih kliničkih skorova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj dana sa klinički manifestnim EAE-om; <sup>d</sup> trajanje bolesti kod pacova koji su ispitivani na kliničke znake EAE-a do oporavka (9 ženki i mužjaka). Svi podaci predstavljeni su kao srednja vrednost ± SEM iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*  $p < 0.05$ .

#### ***4.2.2. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova na vrhuncu bolesti***

S obzirom na to da je pokazano da je smer polnog dimorfizma u težini kliničke slike EAE-a (lakši neurološki deficit kod mužjaka nego kod ženki), kod starih pacova bio suprotan u odnosu na onaj koji je pokazan kod mladih pacova, ispitivani su ćelijski i molekularni mehanizmi koji bi mogli da stoje u osnovi ovog fenomena.

4.2.2.1. Manje ukupno mononuklearnih ćelija i manje CD134+ CD4+ T-limfocita je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta

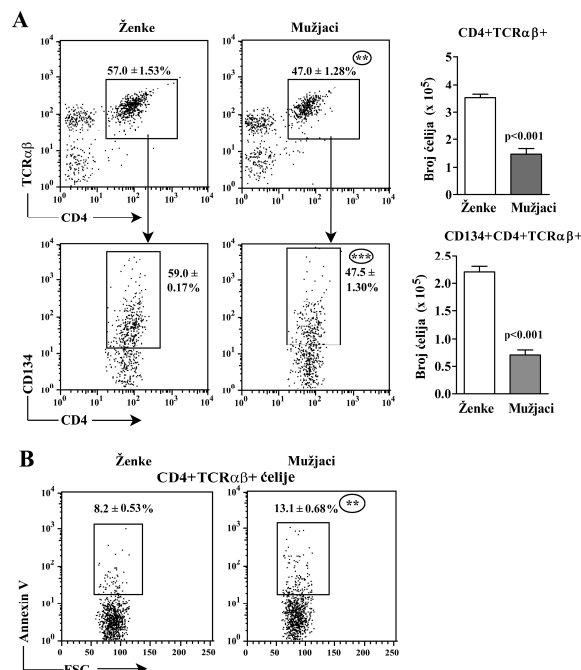
U skladu sa lakšom kliničkom slikom EAE-a, manje ( $p < 0.001$ ) mononuklearnih ćelija je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka nego ženki istog uzrasta na vrhuncu bolesti (Slika 42).



**Slika 42. Manje ukupno mononuklearnih ćelija je izolovano na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta.** Histogram prikazuje ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

U izolovanim ćelijskim suspenzijama, CD4+ T-limfociti su procentualno bili manje zastupljeni ( $p < 0.01$ ) i njihov broj je takođe bio manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 43). Procenat reaktivisanih, CD134+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita je takođe bio manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka, kao i broj ovih ćelija ( $p < 0.001$ ) u poređenju sa starim ženkama pacova (Slika 43).

Zastupljenost apoptotičnih, aneksin V+ ćelija je bila veća ( $p < 0.01$ ) u okviru CD4+ T-limfocita koji su izolovani iz kičmene moždine mužjaka, u odnosu na ženke starih pacova (Slika 43).

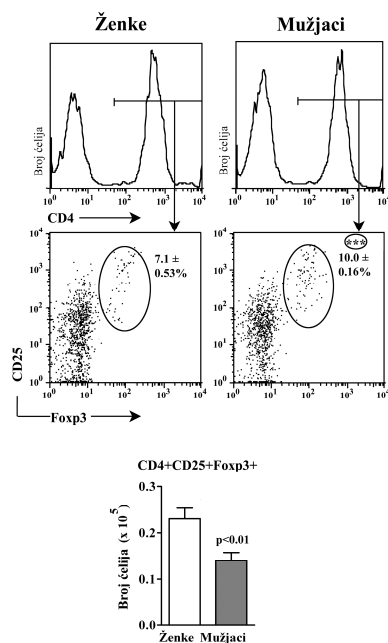


**Slika 43. Manje CD4+TCRαβ+ i CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita je izolovano na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova, a procenat aneksin V+ ćelija je veći u subpopulaciji CD4+TCRαβ+ limfocita nego kod ženki istog uzrasta. (Panel A)** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvajani (“gejtovani”) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCRαβ+ limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (gornji) broj CD4+TCRαβ+ limfocita i (donji) broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. **(B)** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju bojenje fluorescentnom bojom obeleženim aneksinom V CD4+TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat apoptotičnih (aneksin V+) ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

4.2.2.2. U kičmenoj moždini starih mužjaka pacova zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita je veća i odnos CD4+TCR $\alpha\beta$ +CD134+ i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je povoljniji nego kod ženki istog uzrasta

Imajući u vidu ulogu regulatornih ćelija u supresiji autoimunske neuroinflamacije (McGeachy i sar., 2005), ispitivana je zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija kičmenoj moždini starih pacova. Nađeno je da je procenat CD25+Foxp3+ ćelija bio veći ( $p < 0.001$ ) u subpopulaciji CD4+ limfocita iz kičmene moždine starih mužjaka pacova (Slika 44). Međutim, budući da je apsolutni broj CD4+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine starih mužjaka bio manji nego kod ženki, i apsolutni broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je takođe bio manji ( $p < 0.01$ ) kod mužjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 44).



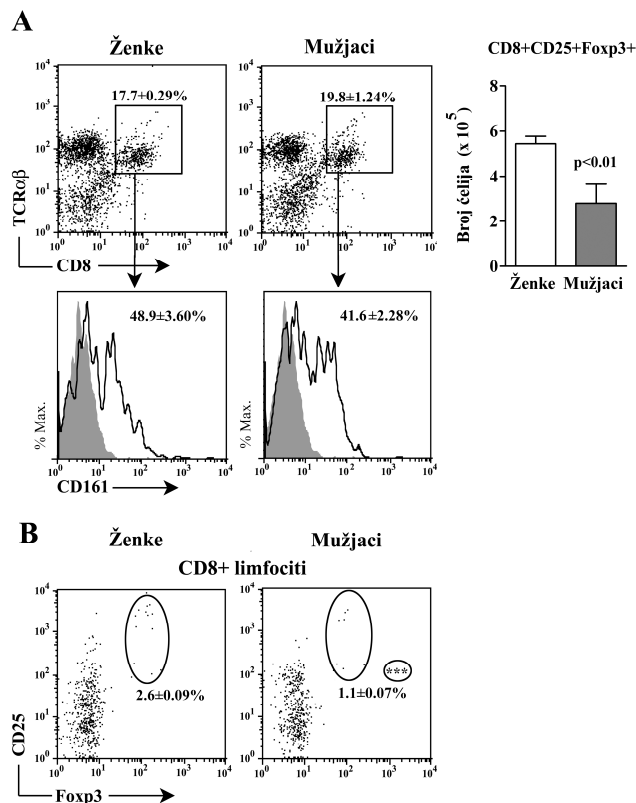


**Slika 44. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita je veći, a broj CD4+CD25+Foxp3+ ćelija manji na vrhuncu bolesti u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju CD25 i Foxp3 bojenje CD4+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. CD4+ limfociti su izdvajani ("gejtovani") kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim histogramima. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj CD4+CD25+Foxp3+ Treg limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

U skladu sa lakšim neurološkim deficitom kod starih mužjaka, odnos broja reaktivisanih, CD134+ CD4+ T-limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija je bio povoljniji (p < 0.01) kod mužjaka (5,0 ± 0,65) u poređenju sa odnosom broja ovih ćelija kod životinja ženskog pola (9,2 ± 0,80).

4.2.2.3. Manja zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru subpopulacije CD8+ limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Slično kao kod mladih životinja, procentualna zastupljenost CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita se nije statistički razlikovala između polova, ali je broj ovih ćelija bio manji ( $p < 0.01$ ) kod starih mužjaka pacova u poređenju sa ženkama (Slika 45). Analizom ispoljavanja specifičnih antigena, utvrđeno je da je procenat CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD8+ limfocita bio manji kod starih mužjaka pacova ( $p < 0.001$ ), dok se procenat CD161+ ćelija u okviru CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita nije razlikovao u poređenju sa ženkama istog uzrasta (Slika 45).



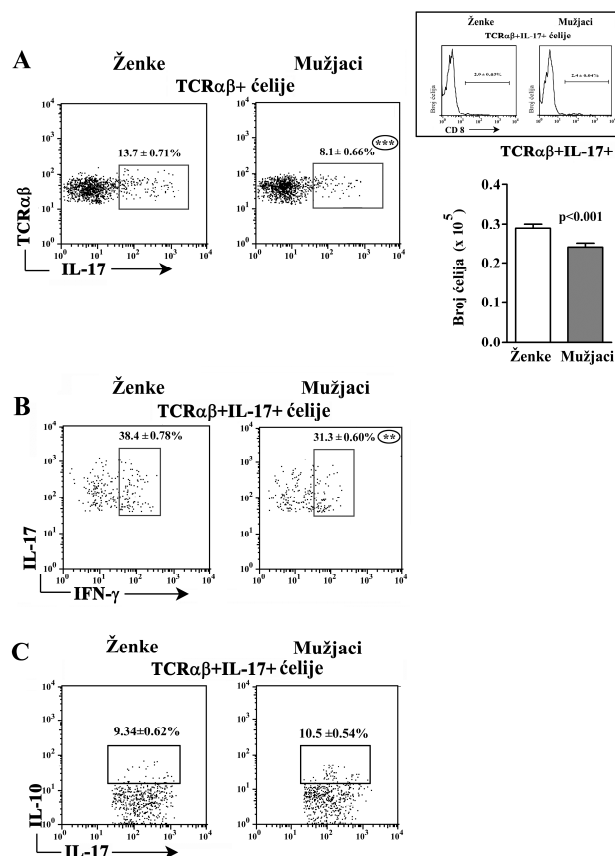
**Slika 45. Manji broj CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je izolovan na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova i procenat CD25+Fxp3+ ćelija u subpopulaciji CD8+ limfocita je manji nego kod ženki istog uzrasta. (Panel A)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju ekspresiju molekula CD161 na CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Sivi histogrami predstavljaju izotipsku kontrolu. CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfociti su izdvajani („gejtovani“) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD161+ ćelija u okviru CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj CD8+TCR $\alpha\beta$ + ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. **(B)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju CD25 i Fxp3 bojenje CD8+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD25+Fxp3+ ćelija u okviru CD8+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

4.2.2.4. Mononuklearne ćelije kičmene moždine starih mužjaka eksprimiraju manje IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10 u odnosu na odgovarajuće ćelije ženki pacova istog uzrasta

Imajući u vidu da je kod mladih životinja polni dimorfizam u težini EAE-a korelirao sa polnim razlikama u zastupljenosti Th17 ćelija, ispitivano je postojanje polnog dimorfizma u ekspresiji patogenih citokina i u T-limfocitima kičmene moždine starih pacova.

*4.2.2.4.1. Manja zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru populacije T-limfocita i manja zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru Th17 limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

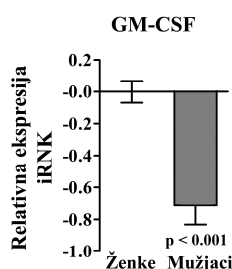
Dobijeni rezultati pokazali su da su procenat IL-17+ ćelija ( $p < 0.001$ ), u okviru populacije T-limfocita iz kičmene moždine starih mužjaka, kao i njihov broj ( $p < 0.001$ ), bili manji nego kod ženki istog uzrasta (Slika 46). U okviru IL-17+ subpopulacije T-limfocita, zastupljenost ćelija sa izrazito patogenim, IL-17+IFN- $\gamma$ + fenotipom je takođe bila manja ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke starih pacova (Slika 46). Procentualna zastupljenost ćelija sa IL-17+IL-10+ fenotipom se nije značajno razlikovala u okviru IL-17+ T-limfocita ženki i mužjaka starih pacova (Slika 46). Analiza površinske ekspresije antigena CD8 na TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ćelijama iz kičmene moždine starih pacova je pokazala da su, kao i kod mladih životinja, ove ćelije uglavnom imale fenotip Th17 limfocita (Slika 46).



**Slika 46. U kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova procenat IL-17+ ćelija u populaciji TCRαβ+ limfocita i IL-17+IFN-γ+ ćelija u okviru Th17 limfocita je manji na vrhuncu bolesti nego kod ženki istog uzrasta. (Panel A)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-17 u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-17+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCRαβ+IL-17+ ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCRαβ+IL-17+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. **(Panel B)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IFN-γ u okviru TCRαβ+IL-17+ ćelija iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Procenat IL-17+IFN-γ+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. **(C)** Tačkasti protočno-

citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ limfocita iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Procenat IL-17+IL-10+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ +IL-17+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

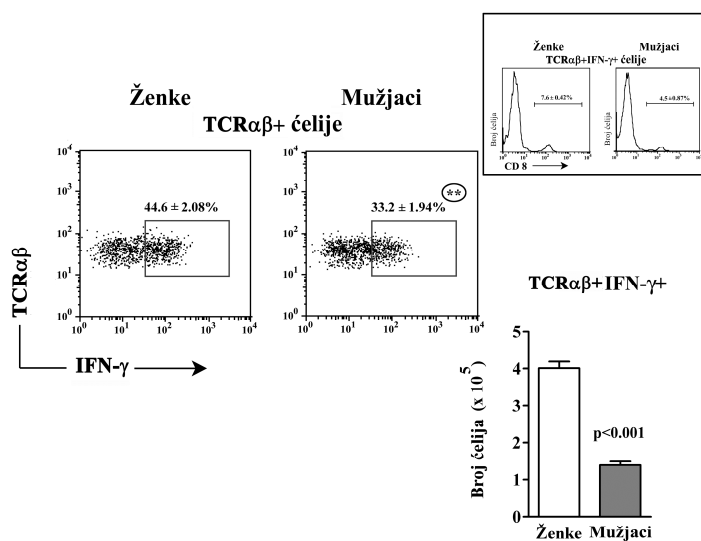
U skladu sa nalazom manje zastupljenosti IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije Th17 limfocita kos starih mužjaka pacova je bila i manja (p < 0.001) ekspresija gena za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki starih pacova (Slika 47).



**Slika 47. Ekspresija iRNK za GM-CSF je manja na vrhuncu bolesti u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za GM-CSF je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za GM-CSF kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za GM-CSF kod ženki  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.2.2.4.2. Manja zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Kao i kod mladih životinja, zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija je bila manja ( $p < 0.01$ ) u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini mužjaka starih pacova (Slika 48). Takođe, manji broj ( $p < 0.001$ ) IFN- $\gamma$ + T-ćelija je izolovan iz kičmene moždine starih mužjaka u odnosu na ženke pacova (Slika 48). Analiza fenotipa IFN- $\gamma$ + T-ćelija je, slično kao i kod mladih pacova, pokazala da su u najvećem procentu ove ćelije imale fenotip Th1 limfocita (Slika 48).



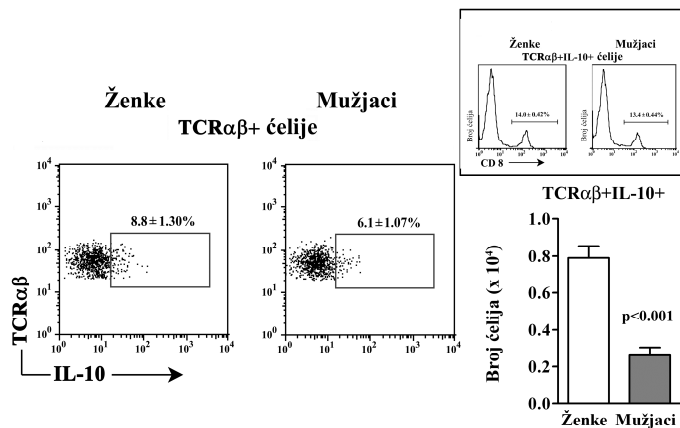
**Slika 48. Manja procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita u kulturama resimuliranih mononuklearnih ćelija i manji broj ovih ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka nego ženki na vrhuncu bolesti.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IFN- $\gamma$  u TCR $\alpha\beta$ + limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCR $\alpha\beta$ +IFN- $\gamma$ + limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*  $p < 0.01$ .

Iz iznetih podataka sledi da je odnos broja Th17 i Th1 ćelija u kičmenoj moždini teže obolelih ženki ( $0,29 \pm 0,015$ ) bio više ( $p < 0,05$ ) pomeren na stranu Th17 limfocita, u poređenju sa odnosom broja ovih ćelija kod mužjaka ( $0,24 \pm 0,010$ ) istog uzrasta.

#### *4.2.2.4.3. Manja zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

Procentualna zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita infiltriranih u kičmenu moždinu starih pacova se nije statistički razlikovala između polova (Slika 49). Međutim, manji ( $p < 0,001$ ) broj ovih ćelija je izolovan iz kičmene moždine starih mužjaka u poređenju sa ženkama pacova (Slika 49). Ispitivanje površinske ekspresije CD8 antigena na TCR $\alpha\beta$ +IL-10+ ćelijama je pokazalo da je najveći procenat ovih ćelija bio CD4+ (Slika 49).

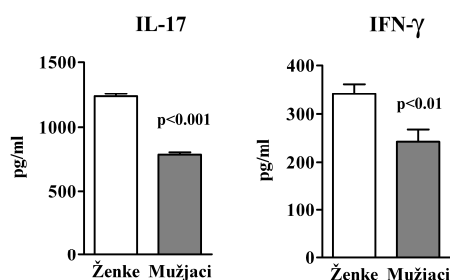




**Slika 49. Manji broj TCRαβ+IL-10+ ćelija je izolovan na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogram prikazuje broj TCRαβ+IL-10+ limfocita koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. **(Umetak)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju površinsku ekspresiju molekula CD8 na TCRαβ+IL-10+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD8+ ćelija u okviru TCRαβ+IL-10+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

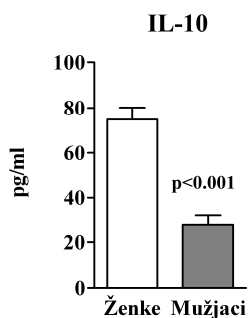
#### 4.2.2.4.4. Uticaj pola na koncentraciju IL-17, IFN-γ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih pacova

Posle kratkotrajne restimulacije mononuklearnih ćelija kičmene moždine PMA-om i jonomicinom, koncentracije IL-17 (p < 0.001) i IFN-γ (p < 0.01) izmerene u supernatantima ovih ćelijskih kultura su bile manje kod starih mužjaka nego kod ženki pacova (Slika 50).



**Slika 50. Mononuklearne ćelije izolovane na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova sekretuju manje IL-17 i IFN- $\gamma$  posle restimulacije *in vitro* nego odgovarajuće ćelije ženki istog uzrasta.** Histogrami prikazuju koncentracije (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

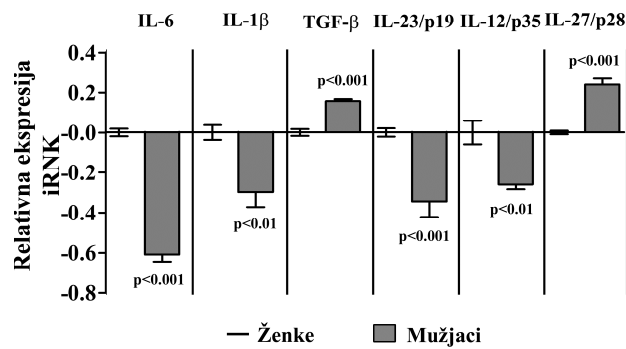
U supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih mužjaka je izmerena manja (p < 0.001) koncentracija IL-10 u odnosu na odgovarajuće supernatante ženki pacova (Slika 51).



**Slika 51. Mononuklearne ćelije izolovane na vrhuncu bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova sekretuju manje IL-10 posle restimulacije *in vitro* nego odgovarajuće ćelije ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

*4.2.2.4.5. Mononuklearne ćelije kičmene moždine starih mužjaka pacova eksprimiraju manje citokina koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 ćelija u odnosu na ženke istog uzrasta*

U sledećem koraku je ispitivana ekspresija citokina u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih životinja, koji utiču na fenotip Th ćelija na vrhuncu bolesti. Analiza sveže izolovanih mononuklearnih ćelija kičmene moždine je pokazala da je ekspresija iRNK za: IL-6 ( $p < 0.001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ) i IL-23/p19 ( $p < 0.001$ ), citokina za koje je ranije pomenuto da su važni za diferencijaciju i održavanje fenotipa Th17 ćelija, bila manja u ćelijama mužjaka nego u odgovarajućim ćelijama ženki pacova (Slika 52). Ekspresija iRNK za IL-27/p28, citokina koji pomaže diferencijaciju Th1 ćelija (Fitzgerald i sar., 2007) i recipročno inhibiše diferencijaciju Th17 ćelija (Stumhofer i sar., 2006), je bila veća ( $p < 0.001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke (Slika 52). Ekspresija iRNK za IL-12/p35, glavnog citokina za polarizaciju Th ćelija u Th1 smeru (Prochazkova i sar., 2012), je bila manja ( $p < 0.01$ ) (Slika 52), dok je ekspresija iRNK za TGF- $\beta$ , za koji je pokazano da suprimira transkripcioni faktor T-bet (Lee i sar., 2009), bila veća ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke pacova (Slika 52).



**Slika 52. Ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za polarizaciju Th17 i Th1 ćelija je manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19) i Th1 (IL-12/p35, IL-27/p28) limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za prikazane citokine je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19, IL-12/p35, IL-27/p28 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajuće citokine kod ženki  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

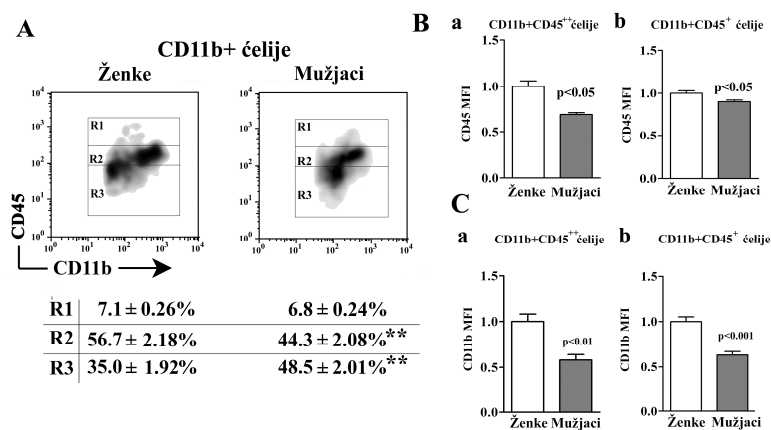
#### 4.2.2.5. Polne razlike u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih pacova

Prema nivou površinske ekspresije molekula CD45 na CD11b<sup>+</sup> ćelijama koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova, razdvojene su tri frakcije ovih ćelija: (i) CD45<sup>++</sup> ćelije, koje fenotipski u najvećoj meri odgovaraju ćelijama monocitnog porekla (inflamatorni makrofagi i dendritske ćelije) koje perifernom krvlju dolaze u kičmenu moždinu (Croxford i sar., 2015b); (ii) CD45<sup>+</sup> ćelije, koje odgovaraju aktivisanim ćelijama mikroglije (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009) i (iii) CD45<sup>-</sup> ćelije neaktivisane, „mirujuće” mikroglije (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009).

Nađeno je da je procentualna zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih pacova oba pola bila vrlo mala i da se statistički nije razlikovala između polova (Slika 53). Međutim, zastupljenost

subpopulacije CD45<sup>+</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija je bila manja ( $p < 0.01$ ), dok je zastupljenost CD45<sup>-</sup> ćelija bila veća ( $p < 0.01$ ) kod mušjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 53).

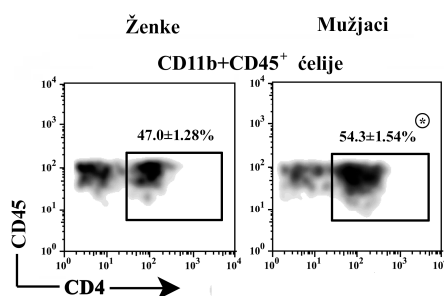
U prilog manjoj aktivaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih mušjaka pacova je bila i manja ( $p < 0.05$ ) površinska gustina ekspresije (sudeći prema izmerenim MFI vrednostima) CD45 molekula na njihovim CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelijama (Slika 53). Slično, i MFI za CD11b molekul je bio manji na CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> ( $p < 0.01$ ) i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ) ćelijama mušjaka nego ženki starih pacova (Slika 53).



**Slika 53. Procentualna zastupljenost CD45<sup>+</sup> ćelija je manja, a CD45<sup>-</sup> ćelija veća u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih mušjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti. (A)** Gustinski protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju molekula CD45 na CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mušjaka starih pacova. Procenti CD45<sup>++</sup>, CD45<sup>+</sup> i CD45<sup>-</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija su prikazani u svakom regionu (R). R1 = CD45<sup>++</sup> ćelije, R2 = CD45<sup>+</sup> i R3 = CD45<sup>-</sup> ćelije. **(Panel B)** Histogrami prikazuju srednji intenzitet fluorescence (MFI) za molekul CD45 na (a) CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> i (b) CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mušjaka starih pacova. **(Panel C)** Histogrami prikazuju MFI za molekul CD11b na (a) CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> i (b) CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mušjaka starih pacova. MFI za molekule CD45 i CD11b na CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelijama za mušjake je prikazivan u odnosu na MFI za ove molekule na odgovarajućim ćelijama ženki (vrednost 1). Rezultati su

prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\* p < 0.01.

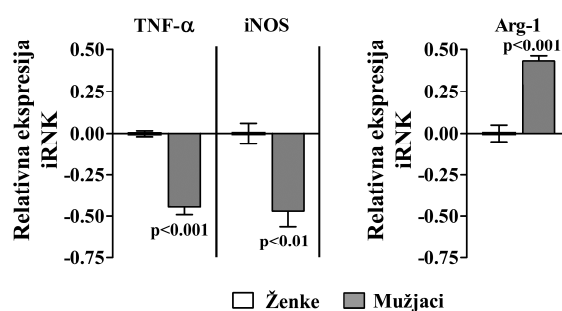
Imajući u vidu fenotipsku i funkcijsku heterogenost aktivisanih ćelija mikroglije, ispitivana je zastupljenost ćelija koje ispoljavaju CD4 molekul na njihovoj površini i za koje je ranije pomenuto da imaju imunoregulatorna svojstva. Nađeno je da je procenat CD4+ ćelija u okviru subpopulacije CD11b+CD45+ ćelija kičmene moždine mužjaka bio veći (p < 0.05) nego kod ženki starih pacova (Slika 54).



**Slika 54. Procentualna zastupljenost CD4+ ćelija je veća u subpopulaciji CD11b+CD45+ ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti.** Gustinski protočno-citofluorimetrijski profili prikazuju ekspresiju CD4 molekula na CD11b+CD45+ ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD4+ ćelija u okviru CD11b+CD45+ ćelija označen je na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.\* p < 0.05.

#### 4.2.2.6. Manja ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Analiza sveže izolovanih mononuklearnih ćelija kičmene moždine je pokazala da je ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), kao i za enzim iNOS ( $p < 0.01$ ) bila manja u ovim ćelijama mužjaka nego ženki starih pacova (Slika 55). S druge strane, ekspresija iRNK za enzim Arg-1 je bila veća ( $p < 0.001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka u odnosu na ženke starih pacova (Slika 55).



**Slika 55. Ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS je manja, a ekspresija iRNK za Arg-1 veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki na vrhuncu bolesti.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK za (levo) TNF- $\alpha$  i iNOS i (desno) Arg-1 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za prikazane citokine je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$ , iNOS i Arg-1 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajući citokin i enzim kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

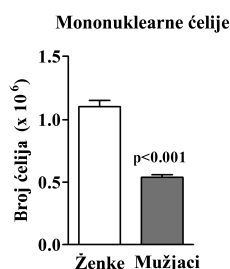
#### 4.2.3. Ispitivanje uticaja pola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora starih pacova u induktivnoj fazi bolesti

Budući da je polni dimorfizam u težini kliničke slike EAE-a pokazan i kod starih pacova, analizirane su fenotipske i funkcijske karakteristike CD4+ T-limfocita i mijeloidnih ćelija koje su 7. d.p.i. izolovane iz njihove kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora, kako bi se ispitala uloga ciljnog organa u oblikovanju polnog dimorfizma u kliničkim manifestacijama EAE-a kod ovih životinja.

4.2.3.1. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova u induktivnoj fazi bolesti

4.2.3.1.1. Manja zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

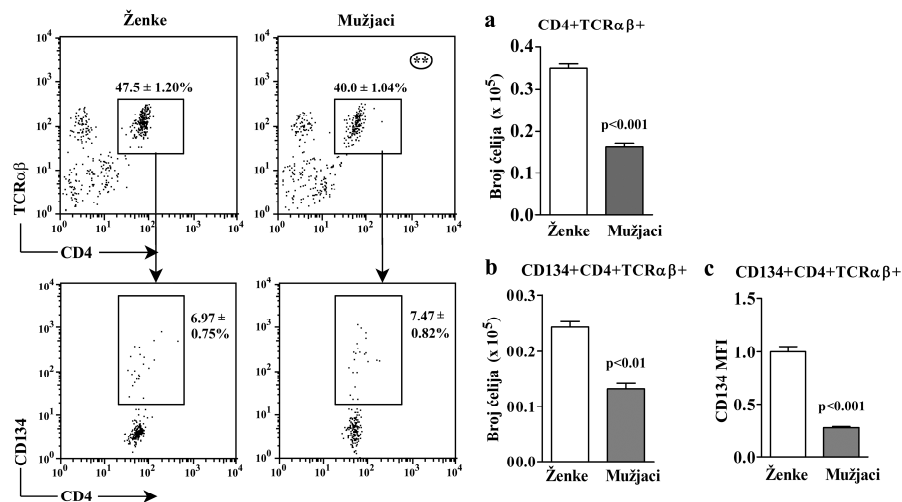
Apsolutni broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan u induktivnoj fazi EAE-a iz kičmene moždine starih mužjaka pacova je bio manji ( $p < 0.001$ ) nego kod ženki istog uzrasta (Slika 56).



**Slika 56. Manje mononuklearnih ćelija je izolovano u induktivnoj fazi bolesti iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

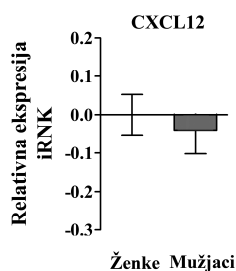
Među izolovanim mononuklearnim ćelijama, procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita ( $p < 0.01$ ), kao i broj ( $p < 0.001$ ) ovih ćelija su bili manji kod mužjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 57). Analizom površinske ekspresije CD134 molekula na CD4+ T-limfocitima, nađeno je da približno isti procenat ovih ćelija eksprimira taj aktivacijski marker kod oba pola starih pacova (Slika 57). Međutim, broj reaktivisanih, CD134+ CD4+ T-ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova je i u ovoj, ranoj fazi bolesti bio manji ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa ženkama istog uzrasta (Slika 57). Sudeći prema MFI, gustina površinske ekspresije molekula CD134 je takođe bila manja ( $p < 0.001$ ) na CD4+ T-ćelijama mužjaka nego na tim ćelijama ženki starih pacova (Slika 57).





**Slika 57. Manje CD4+TCRαβ+ i CD134+ CD4+TCRαβ+ limfocita je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka pacova i površinska gustina ekspresije CD134 molekula na CD4+TCRαβ+ limfocitima je manja nego na istim ćelijama ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvojeni (“gejtovani”) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCRαβ+ limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (a) broj CD4+TCRαβ+ limfocita, (b) broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita i (c) srednji intenzitet fluorescence (MFI) za molekul CD134 na CD4+TCRαβ+CD134+ limfocitima iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. MFI za CD134 molekul na CD4+TCRαβ+CD134+ limfocitima za mužjake je prikazivan u odnosu na MFI za ovaj molekul na odgovarajućim ćelijama ženki (vrednost 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\* p < 0.01.

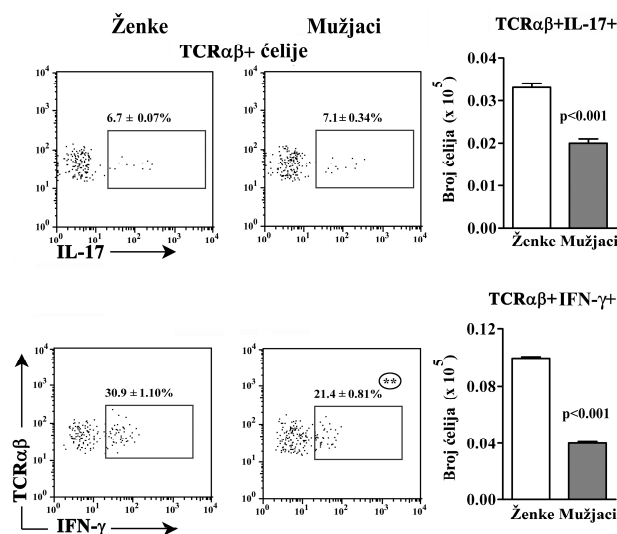
U sledećem koraku ispitivana je ekspresija iRNK za hemokin CXCL12 u tkivu kičmene moždine, kako bi se utvrdilo da li je polni dimorfizam u broju CD4+ T-ćelija posledica polno dimorfne ekspresije ovog hemokina u kičmenoj moždini starih pacova. Međutim, iako je ekspresija iRNK za CXCL12 bila manja u tkivu mužjaka nego ženki starih pacova, razlika nije bila statistički značajna (Slika 58)



**Slika 58. Ekspresija iRNK za CXCL12 u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova se ne razlikuje u induktivnoj fazi bolesti.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za CXCL12 u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za CXCL12 je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za CXCL12 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za CXCL12 kod ženki  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

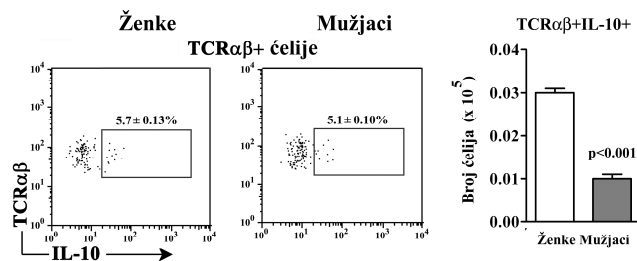
#### 4.2.3.1.2. Manje Th17, Th1 i IL-10+ Th ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Ispitivanje procentualne zastupljenosti ćelija koje sintetišu IL-17 u okviru populacije T-limfocita iz kičmene moždine starih pacova je pokazalo da se ona nije razlikovala između polova u ovoj fazi bolesti (Slika 59). S druge strane, procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu IFN- $\gamma$  je bila manja ( $p < 0.01$ ) u okviru populacije T-ćelija iz kičmene moždine mužjaka (Slika 59). Međutim, apsolutni broj T-ćelija koje eksprimiraju IL-17 i IFN- $\gamma$  je bio manji ( $p < 0.001$ ) u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki starih životinja (Slika 59).



**Slika 59. Manje TCRαβ+IL-17+ i TCRαβ+IFN-γ+ ćelija je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju (gornji) IL-17 i (donji) IFN-γ u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h stimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-17+ i IFN-γ+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita označeni su na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju broj (gornji) TCRαβ+IL-17+ i (donji) TCRαβ+IFN-γ+ ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\* p < 0.01.

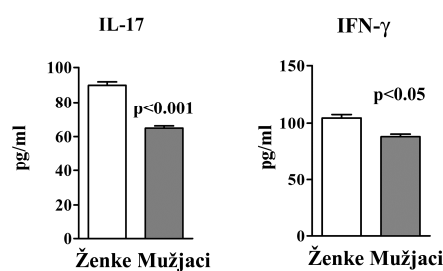
Procentualna zastupljenost subpopulacije T-limfocita koji eksprimiraju IL-10 se takođe nije značajno razlikovala između oba pola starih životinja u ranoj fazi bolesti (Slika 60). Međutim, manji (p<0.001) broj ovih ćelija je izolovan iz kičmene moždine mužjaka nego ženki starih pacova (Slika 60).



**Slika 60. Manje TCRαβ+IL-10+ćelija je izolovano iz kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Reprezentativni tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCRαβ+ limfocita iz kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h stimulacije PMA-om i jonomycinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat IL-10+ ćelija u okviru TCRαβ+ limfocita prikazan je na svakom protočno-citofluorimetrijskom profilu. Histogram prikazuje broj IL-10+TCRαβ+ ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

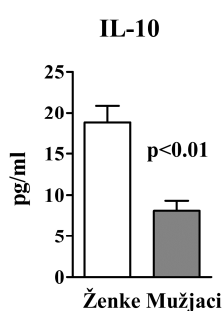
#### 4.2.3.1.3. Manja koncentracija IL-17, IFN-γ i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U saglasnosti sa manjim brojem Th17 i Th1 ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka, koncentracije IL-17 (p < 0.001) i IFN-γ (p < 0.05) su bile manje u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine ovih pacova, u odnosu na ženke istog uzrasta (Slika 61).



**Slika 61. Mononuklearne ćelije koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz kičmene moždine starih mužjaka pacova sekretuju manje IL-17 i IFN- $\gamma$  posle restimulacije *in vitro* nego odgovarajuće ćelije ženki istog uzrasta.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

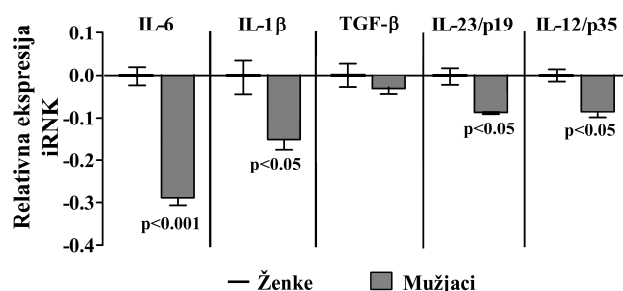
Slično, i koncentracija IL-10 je bila manja (p < 0.01) u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih mužjaka, nego u supernatantima istih kultura ćelija ženki pacova (Slika 62).



**Slika 62. Mononuklearne ćelije koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz kičmene moždine starih mužjaka pacova sekretuju manje IL-10 posle restimulacije *in vitro* nego odgovarajuće ćelije ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova i restimulisane PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.2.3.1.4. Manja ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U skladu sa manjim procentom Th17 limfocita u kičmenoj moždini mužjaka starih pacova je bila i manja ekspresija iRNK za IL-6 ( $p < 0.001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) i IL-23/p19 ( $p < 0.05$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka u odnosu na odgovarajuće ćelije ženki pacova (Slika 63). Ekspresija iRNK za IL-12/p35 je takođe bila manja ( $p < 0.05$ ) u mononuklearnim ćelijama koje su izolovane iz kičmene moždine starih mužjaka nego u istim ćelijama ženki pacova (Slika 63). Ekspresija gena koji kodira TGF- $\beta$ , u ovoj fazi EAE-a, nije se razlikovala između ženki i mužjaka starih pacova (Slika 63).

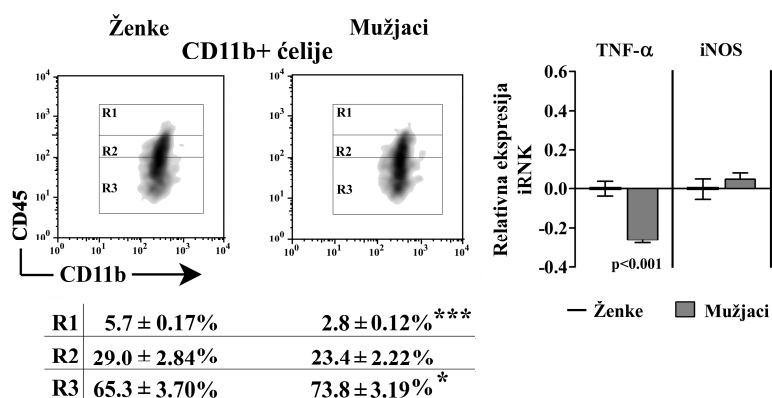


**Slika 63. Ekspresija iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 i Th1 ćelija je manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke u induktivnoj fazi bolesti.** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za citokine koji su značajni za diferencijaciju Th17 (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19) i Th1 limfocita (IL-12/p35) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena za IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19 i IL-12/p35 je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-23/p19 i IL-12/p35 kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za odgovarajući citokin kod ženki  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

*4.2.3.1.5. Manja zastupljenost ćelija CD45<sup>++</sup> fenotipa, a veća zastupljenost ćelija CD45<sup>-</sup> fenotipa u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta*

Analiza ekspresije CD45 molekula na površini CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih pacova je pokazala da je procenat CD45<sup>++</sup> ćelija u ovoj fazi EAE-a bio veoma mali kod životinja oba pola (Slika 64). Međutim, procentualna zastupljenost ovih ćelija u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih mužjaka pacova je ipak bila manja ( $p < 0.001$ ) nego kod ženki (Slika 64). Zastupljenost subpopulacije ćelija CD45<sup>+</sup> se nije statistički razlikovala između polova (Slika 64). S druge strane, procenat CD45<sup>-</sup> ćelija je bio veći kod starih mužjaka ( $p < 0.05$ ), ukazujući na manju aktivaciju ćelija mikroglije mužjaka u odnosu na ženke starih pacova (Slika 64).

U skladu sa ovim nalazima je bila i manja ekspresija iRNK za proinflamatorni citokin TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka u poređenju sa odgovarajućim ćelijama ženki (Slika 64). Ekspresija iRNK za enzim iNOS u istim ćelijama se u ranoj fazi bolesti nije razlikovala između ženki i mužjaka starih životinja (Slika 64).



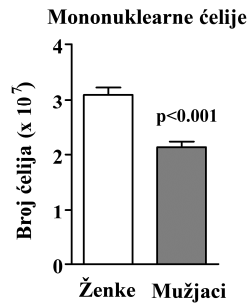
**Slika 64. Manja zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija i manja ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Gustinski protočno-citofluorometrijski profili prikazuju površinsku ekspresiju CD45 molekula na CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenti CD45<sup>++</sup>, CD45<sup>+</sup> i CD45<sup>-</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija su prikazane u svakom regionu (R). R1 = CD45<sup>++</sup> ćelije, R2 = CD45<sup>+</sup> ćelije i R3 = CD45<sup>-</sup> ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM (n = 9). Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka starih pacova. Budući da je pokazano da pol i uzrast ne utiču na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin, ekspresija gena TNF- $\alpha$  i iNOS je „normalizovana” u odnosu na ekspresiju ovog gena. Ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS kod mužjaka je izražavana u odnosu na ekspresiju iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS kod ženki  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

4.2.3.2. Polni dimorfizam u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora starih pacova u induktivnoj fazi bolesti

4.2.3.2.1. Manji broj CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-ćelija je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta

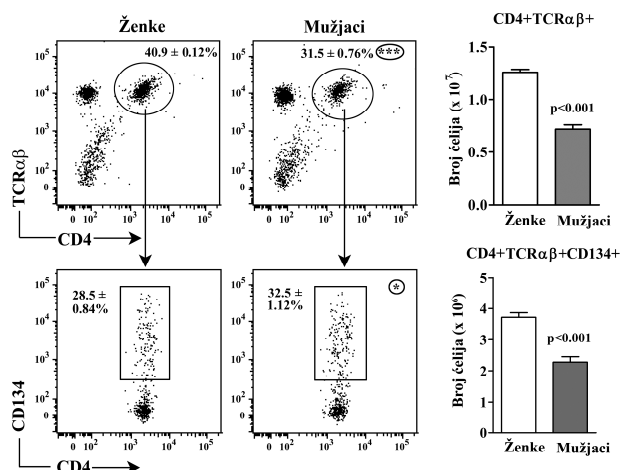
Broj mononuklearnih ćelija koji je 7. d.p.i. izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka je bio manji (p < 0.001) u poređenju sa brojem ćelija koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora ženki starih pacova (Slika 65).





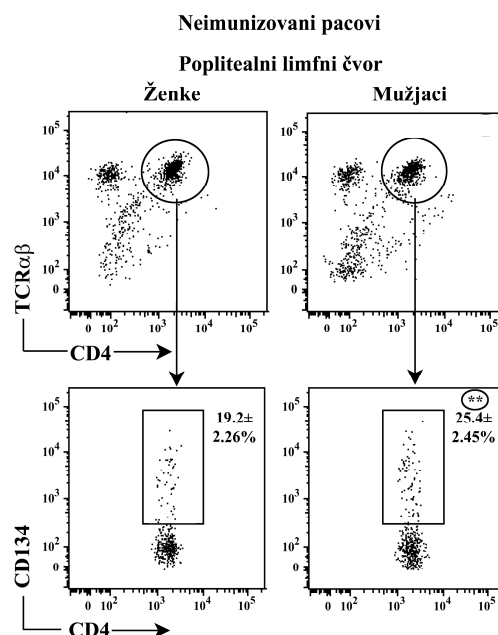
**Slika 65. Manje ukupno mononuklearnih ćelija je izolovano u induktivnoj fazi bolesti iz drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Histogram prikazuje ukupan broj mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

Procentualna zastupljenost i broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita su takođe bili manji ( $p < 0.001$ ) kod mužjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 66). S druge strane, procenat CD4<sup>+</sup> T-ćelija koje su ispoljavale aktivacijski marker CD134 je bio veći ( $p < 0.05$ ) kod mužjaka nego kod ženki starih pacova (Slika 66). Međutim, manji broj aktivisanih, CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-ćelija je izolovan ( $p < 0.001$ ) iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka u odnosu na ženke starih pacova (Slika 66).



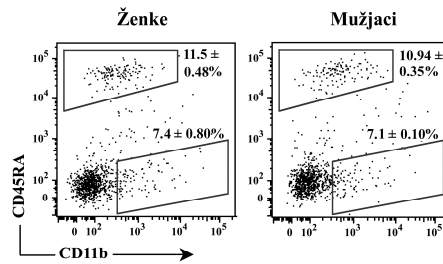
**Slika 66. Manje CD4+TCRαβ+ i CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita je izolovano u induktivnoj fazi bolesti iz drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvajani (“gejtovani”) kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorimetrijskim tačkastim profilima. Procenat CD4+TCRαβ+ limfocita i CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Histogrami prikazuju (gornji) broj CD4+TCRαβ+ limfocita i (donji) broj CD134+CD4+TCRαβ+ limfocita koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

Za procenu aktivacije CD4+ T-ćelija starih životinja na inokulaciju antigena singene kičmene moždine, analizirana je i procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita poplitealnog limfnog čvora neimunizovanih starih pacova oba pola. Nađeno je da je ona bila veća (p < 0.01) kod neimunizovanih starih mužjaka pacova nego kod neimunizovanih ženki tog uzrasta (Slika 67). Međutim, poređenjem nalaza dobijenih kod neimunizovanih i imunizovanih pacova, indirektno se može zaključiti da je procentualni porast u zastupljenosti ovih ćelija bio manji (p < 0.001) kod starih mužjaka (28,0 ± 1,18%), u odnosu na ženke (50,0 ± 2,00%) istog uzrasta.



**Slika 67. Procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+TCRαβ+ limfocita poplitealnog limfnog čvora je veća kod mužjaka nego kod ženki neimunizovanih starih pacova.** Donji protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD134 na CD4+TCRαβ+ limfocitima poplitealnog limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka neimunizovanih starih pacova. CD4+TCRαβ+ limfociti su izdvajani ("gejtovani") kao što je prikazano na odgovarajućim (gornjim) protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima. Procenat CD134+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. (n = 5/pol). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. \*\* p < 0.01.

U sledećem koraku, u izolovanim mononuklearnim ćelijama drenirajućeg limfnog čvora starih pacova je ispitivana zastupljenost CD11b+CD45RA- ćelija, za koje je ranije pomenuto da obuhvataju konvencionalne dendritske ćelije i makrofage i koje imaju ulogu APĆ. Nađeno je da se njihova procentualna zastupljenost nije razlikovala između ženki i mužjaka starih pacova (Slika68).

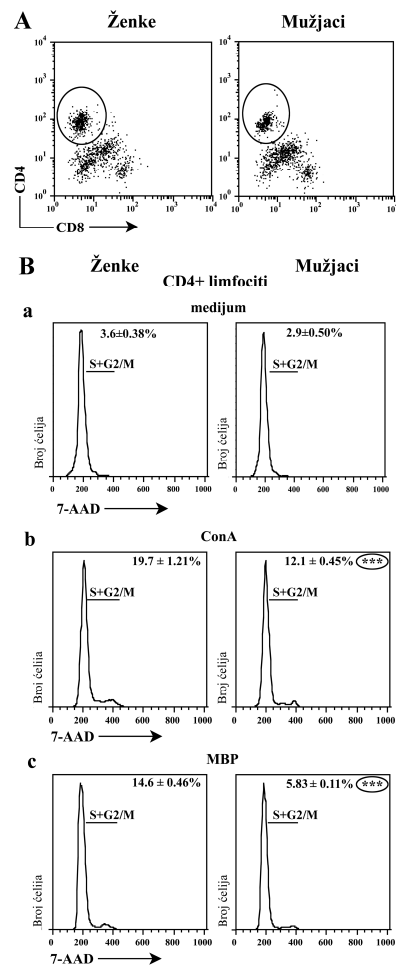


**Slika 68. Odsustvo polnog dimorfizma u procentualnoj zastupljenosti CD11b+CD45RA- ćelija u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora starih pacova u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju molekula CD45RA i CD11b na mononuklearnim ćelijama koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD11b+CD45RA- ćelija je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9/\text{pol}$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

#### 4.1.3.2.2. Manja *in vitro* proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora na stimulaciju MBP-om kod starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

Imajući u vidu nalaze koji ukazuju da je proliferativni odgovor CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova imao polno dimorfni karakter, ispitivano je postojanje polnog dimorfizma i u proliferativnom odgovoru ovih ćelija kod starih pacova.

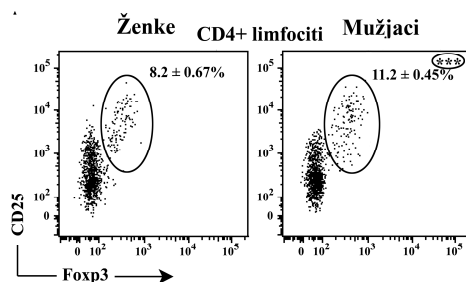
Utvrđeno je da je procenat CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa, u bazalnim uslovima (samo u medijumu za kultivaciju), bio sličan između oba pola starih pacova (Slika 69). Međutim, u prisustvu ConA ili MBP-a, proliferativni odgovor CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora mužjaka je bio značajno manji ( $p < 0.001$ ) u odnosu na iste ćelije ženki starih pacova (Slika 69).



**Slika 69. Proliferacija CD4+ limfocita u odgovoru na ConA i MBP je u induktivnoj fazi bolesti manja u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki. (A)** Tačkasti protočno-citofluorometrijski profili prikazuju strategiju za izdvajanje (“gejtovanje”) CD4+ limfocita iz kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova. **(Panel B)** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju distribuciju CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova, kultivisanih (a) samo u medijumu ili u prisustvu (b) ConA i (c) MBP-a, po fazama ćelijskog ciklusa na osnovu bojenja fluorescentnom DNK-vezujućom bojom 7-AAD (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenat ćelija u aktivnim (S+G2/M) fazama ćelijskog ciklusa je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom histogramu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\* p < 0.001.

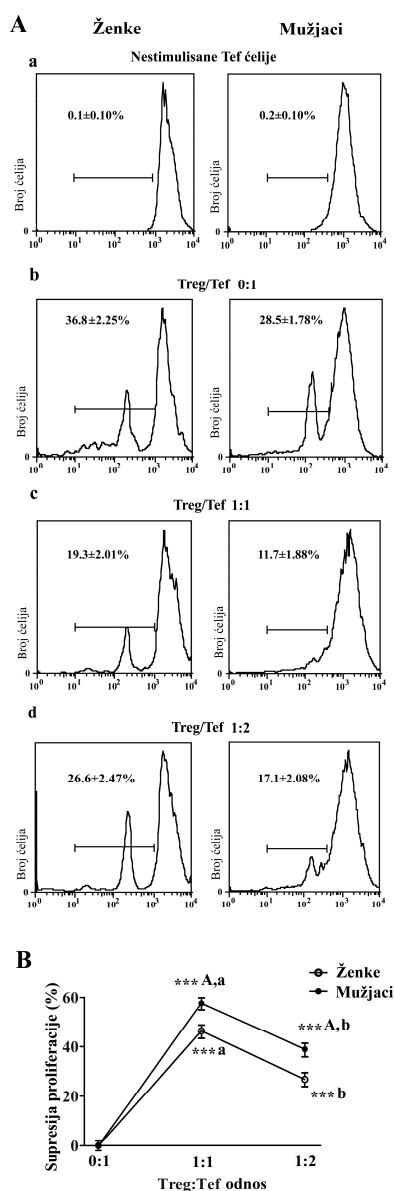
4.2.3.2.3. Veća zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg limfocita i veći supresorski potencijal Treg ćelija limfnog čvora starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta

U sledećem koraku ispitivane su polne razlike u zastupljenosti i funkciji regulatornih CD4+ limfocita limfnog čvora starih pacova. Pokazano je da je učestalost CD25+Foxp3+ ćelija bila veća ( $p < 0.001$ ) u okviru subpopulacije CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta (Slika 70).



**Slika 70. Veća procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova nego ženki u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD25 i Foxp3 bojenje CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ( $n = 9/pol$ ). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati. \*\*\*  $p < 0.001$ .

*In vitro* test supresije proliferacije je pokazao da je supresija proliferacije, u oba ispitivana Treg:Tef ćelijska odnosa, kod mužjaka bila značajno efikasnija ( $p < 0.001$ ) nego kod starih ženki pacova (Slika 70).



**Slika 70. Veća supresija proliferacije Tef ćelija limfnog čvora je nađena u *in vitro* testu kod mužjaka nego kod ženki starih pacova. (Panel A)** Treg i Tef ćelije su magnetno izdvojene iz suspenzije mononuklearnih ćelija limfnih čvorova ženki i mužjaka starih pacova (opisano u poglavlju Materijal i metode) i stimulisane anti-CD3 i anti-CD28 antitelima tokom 72 h u odnosu Treg:Tef 0:1, 1:1 i 1:2. Procenat proliferišućih Tef ćelija je određivan na osnovu dilucije fluorescentne boje CFSE (opisano u poglavlju Materijal i metode). Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju diluciju boje CFSE (a) nestimulisanih i stimulisanih Tef ćelija kultivisanih (b) bez ili u prisustvu Treg ćelija u odnosu (c) Treg:Tef 1:1 i (d) Treg:Tef 1:2 kod (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Procenat proliferišućih Tef je označen na svakom protočno-citofluorometrijskom

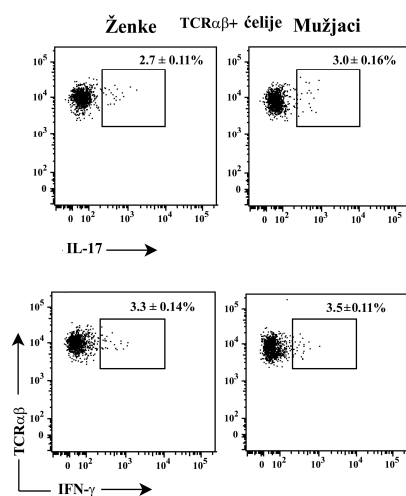
profilu. **(B)** Linijski grafikon prikazuje procenat supresije proliferacije Tef ćelija u kulturama sa različitim odnosom broja Tef i Treg ćelija. Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i Treg/Teff odnosa ( $F_{(2,24)} = 22.01$ ;  $p < 0.001$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova i različitih Treg:Tef odnosa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6/\text{pol}$ ). \*\*\*  $p < 0.001$ ; <sup>A</sup> u odnosu na ženke; <sup>a</sup> u odnosu na Treg:Tef 0:1; <sup>b</sup> u odnosu na Treg:Tef 1:1.

U suspenzijama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora, nađeno je da je odnos broja aktivisanih, CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-limfocita i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija bio povoljniji ( $p < 0.01$ ) kod mužjaka ( $3,09 \pm 0.72$ ), u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod starih ženki ( $4,0 \pm 0.63$ ) pacova.



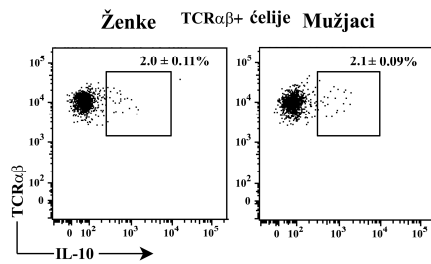
#### 4.2.3.2.4. Slična zastupljenost IL-17+, IFN- $\gamma$ + i IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova

Budući da je analiza T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih pacova pokazala postojanje polnog dimorfizma u ekspresiji glavnih patogenih citokina, na isti način su analizirani i T-limfociti drenirajućeg limfnog čvora starih pacova. Utvrđeno je da se zastupljenost T-ćelija koje ekspimiraju IL-17 i IFN- $\gamma$  ne razlikuje značajno između ženki i mužjaka starih pacova u ranoj fazi bolesti (Slika 71).



**Slika 71. Procenat IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru populacije T-limfocita u kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova se ne razlikuje u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju (gornji) IL-17 i (donji) IFN- $\gamma$  u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-17+ i IFN $\gamma$ + ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita su označeni na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

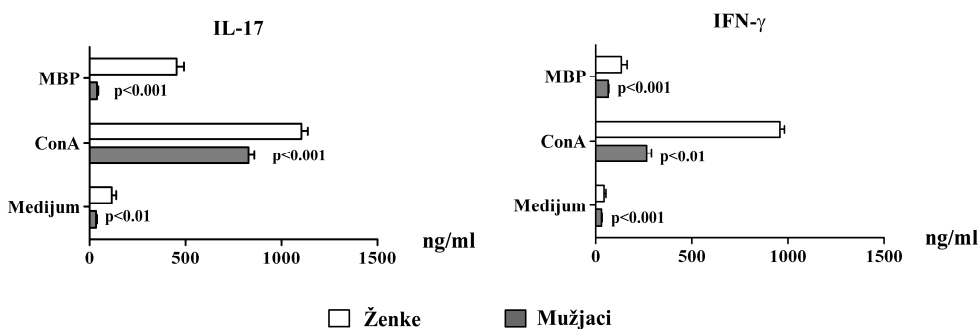
Slično, procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 se nije razlikovala u okviru populacije T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova (Slika 72).



**Slika 72. Procenat IL-10+ ćelija u okviru populacije T-limfocita u kulturama restimuliranih mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova se ne razlikuje u induktivnoj fazi bolesti.** Protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju ekspresiju IL-10 u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita drenirajućeg limfnog čvora (levo) ženki i (desno) mužjaka starih pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4 h restimulacije PMA-om i jonomicinom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Procenti IL-10+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + limfocita su označeni na svakom protočno-citofluorometrijskom profilu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 9/pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

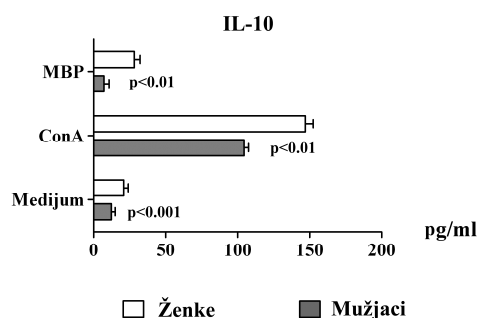
4.2.3.2.5. Manja koncentracija IL-17+, IFN- $\gamma$  i IL-10 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka u odnosu na ženke pacova istog uzrasta

U supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka, koncentracija IL-17 je bila manja, kako u nestimulisanim ( $p < 0.01$ ), tako i u kulturama ćelija kojima je bio dodat MBP ili ConA ( $p < 0.001$ ), u poređenju sa ženkama starih pacova (Slika 73). Slično, manje koncentracije IFN- $\gamma$  su izmerene u supernatantima nestimulisanih ( $p < 0.001$ ) ćelijskih kultura, kao i u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora restimulisanih MBP-om ( $p < 0.001$ ) ili sa ConA ( $p < 0.01$ ), kod starih mužjaka pacova nego kod ženki istog uzrasta (Slika 73).



**Slika 73. Koncentracija IL-17 i IFN- $\gamma$  je manja u supernatantima MBP-om stimulisanih kultura mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova.** Histogrami prikazuju koncentraciju (levo) IL-17 i (desno) IFN- $\gamma$  u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova i kultivisane 72 h u bazalnim uslovima ili u prisustvu ConA ili MBP-a (opisano u poglavlju Materijal i metode). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i stimulatora na produkciju IL-17 ( $F_{(2,48)} = 12,76$ ;  $p < 0.001$ ) i IFN- $\gamma$  ( $F_{(2,48)} = 44,50$ ;  $p < 0.001$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

I koncentracija IL-10 je bila manja ( $p < 0.01$ ) u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka u prisustvu MBP-a ili ConA, kao i u bazalnim uslovima ( $p < 0.001$ ), u odnosu na onu izmerenu u odgovarajućim supernatantima kultura ćelija ženki istog uzrasta (Slika 74).



**Slika 74. Koncentracija IL-10 je manja u supernatantima MBP-om stimuliranih kultura mononuklearnih ćelija koje su u induktivnoj fazi bolesti izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka nego ženki mladih pacova.** Histogram prikazuje koncentraciju IL-10 u supernatantima mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora ženki i mužjaka starih pacova i kultivisane 72 h u bazalnim uslovima ili u prisustvu ConA ili MBP-a (opisano u poglavlju Materijal i metode). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajnu interakciju uticaja pola i stimulatora na produkciju IL-10 ( $F_{(2,48)} = 4,057$ ;  $p < 0.05$ ). Bonferroni *post hoc* test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između polova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /pol). Prikazani su podaci iz jednog od dva nezavisna eksperimenta u kojima su dobijeni slični rezultati.

## 5. DISKUSIJA

Rezultati dobijeni u toku izrade ove doktorske disertacije su pokazali da: (i) postoji polni dimorfizam u osetljivosti na indukciju i u težini EAE-a indukovano inokulacijom homogenata singene kičmene moždine u KFA-u, kako kod mladih, tako i kod starih DA pacova; (ii) starenjem se smanjuje osetljivost na indukciju i težina bolesti kod životinja oba pola i (iii) starenje dovodi do inverzije smeru polnog dimorfizma u težini neurološkog deficita EAE-a. Drugim rečima, rezultati sugerišu da u ovom modelu EAE-a, pol, uzrast i ciljni organ utiču na osetljivost na indukciju bolesti i težinu neuroloških znakova EAE-a.

### **5.1. Polni dimorfizam u kliničkoj i histološkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod mladih pacova**

#### ***5.1.1. Polni dimorfizam u kliničkoj i histološkoj slici EAE-a koji je indukovano inokulacijom homogenata singene kičmene moždine kod mladih pacova***

Prvi deo studije je bio posvećen ispitivanju polnog dimorfizma u kliničkim karakteristikama EAE-a kod životinja uzrasta 3 meseca. Rezultati prikazani u ovom delu studije su pokazali da inokulacija singene kičmene moždine u KFA-u izaziva akutni, monofazni EAE, ne samo kod ženki DA pacova, kako je ranije pokazano (Stošić-Grujičić i sar., 2004; Djikić i sar., 2014), već i kod mužjaka ovog soja. Međutim, interesantno je pomenuti da DA pacovi iz drugih uzgajivačnica, imunizovani pacovskom kičmenom moždinom u inkompletnom Freundovom adjuvansu ili u KFA-u, razvijaju hronični ili relapsirajući oblik bolesti (Tanuma i sar., 2000). Razlika u kliničkom toku EAE-a između različitih studija možda nije iznenađujuća, ako se uzmu u obzir sledeće činjenice: (i) da je razvoj EAE-a pod strogom genetskom kontrolom (Butterfield i sar., 1998; Summers deLuca i sar., 2010) i (ii) da životinje istog srodničkog soja iz različitih uzgajivačnica mogu biti genetski alogene, zbog slučajne promene učestalosti alela kroz generacije (genetičkog drifta) i niza drugih faktora koji mogu da utiču na genetske varijacije srodničkih životinja (Bailey, 1982; Smits, 2004). U prilog tome govore i istraživanja koja pokazuju da se pacovi DA (Rintisch i Holmdahl, 2008) i Lewis (Kallen i

Logdberg, 1982) soja ili miševi soja SJL/J (Summers deLuca i sar., 2010), koji su uzgajani u različitim kolonijama, razlikuju u osetljivosti na indukciju autoimunskih bolesti (uključujući i EAE), ali i da klinički tok autoimunskih bolesti kod njih može da varira. Pored toga, razlike u kliničkom toku EAE-a mogu biti i posledica varijacija u indukcionom protokolu (npr. količina inokulisanog antigena, imunizacija homogenatom kičmene moždine ili specifičnim antigenima CNS-a i sl.) (Di Rosa i sar., 2000).

Pored toga, dobijeni rezultati su pokazali i da su mužjaci DA pacova manje osetljivi na indukciju EAE-a od ženki, što je rezultovalo manjom incidencom klinički manifestne bolesti kod mužjaka. S druge strane, oboleli mladi mužjaci su imali teži neurološki deficit od ženki pacova. Manja incidenca EAE-a kod oglednih životinja muškog pola zabeležena je i u drugim studijama (Papenfuss i sar., 2004; Reddy i sar., 2005; Harpaz i sar., 2012), kao i klinički teža bolest kod mužjaka nego kod ženki oglednih životinja (Sinha i sar., 2008; Taylor i sar., 2009; Massella i sar., 2012). Međutim, polni dimorfizam u suprotnom smeru, ali i odsustvo polnog dimorfizma u incidenci i težini EAE-a su takođe pokazani kod različitih sojeva oglednih životinja (Voskuhl i Palaszynski, 2001; Staykova i sar., 2002; Papenfuss i sar., 2004; van den Broek i sar., 2005; Caruso i sar., 2010; Giatti i sar., 2010; Kremontsov i sar., 2014). Heterogenost nalaza bi se, pre svega, mogla objasniti različitom genetskom konstitucijom oglednih životinja korišćenih u ovim studijama (Papenfuss i sar., 2004; Summers deLuca i sar., 2010), ali i razlikama u uzrastu životinja i indukcionom protokolu (da li je bolest indukovana aktivnom ili pasivnom imunizacijom, koji je antigen korišćen i u kojoj količini, da li je korišćen adjuvans i/ili pertusis toksin), godišnjeg doba kada se indukuje bolest, prisustva/odsustva različitih patogena na/u životinjama i sl. (Fritz i McFarlin, 1989; Encinas i sar., 2001; Teuscher i sar., 2004; Baxter, 2007; Miller i Karpus, 2007; Merrill, 2008; Columba-Cabezas i sar., 2009; Pachner, 2011).

U skladu sa klinički težom bolešću kod mužjaka pacova, patohistološka analiza preseka tkiva njihove kičmene moždine je pokazala veću infiltraciju inflamatornih ćelija u parenhim ovih životinja nego kod ženki istog uzrasta. Demijelinizacija nije uočena ni kod mužjaka ni kod ženki, što odgovara podacima objavljenim za druge modele akutnog EAE-a kod pacova (Wekerle i Sun, 2010).

Smatra se da u odsustvu demijelinizacije, neurološki znaci EAE-a nastaju usled edema i kompresije nerava (Paterson, 1976; Simmons i sar., 1982; 1983) ili poremećaja monoaminergičke neurotransmisije (Carnegie, 1971; White, 1984).

### **5.1.2. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine mladih pacova na vrhuncu bolesti**

Budući da je pokazan polni dimorfizam u težini neuroloških znakova EAE-a kod mladih pacova, ispitivani su potencijalno odgovorni patogenetski mehanizmi. Na vrhuncu bolesti, više mononuklearnih ćelija je izolovano iz kičmene moždine teže obolelih mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta. Pozitivna korelacija između broja izolovanih inflamatornih/imunskih ćelija iz kičmene moždine životinja sa EAE-om i težine bolesti pokazana je i u drugim studijama (Black i sar., 2007). U suspenziji mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine, broj reaktivisanih, CD134+ CD4+ T-ćelija je bio značajno veći kod mladih mužjaka nego kod ženki pacova. Ovakav nalaz bi mogao da ima više objašnjenja. Naime, reaktivacija antigen-specifičnih ćelija dovodi do ushodne regulacije ekspresije molekula CD134 na reaktivisanim CD4+ T-limfocitima i, sledstveno, do ekspanzije tih ćelija (Gramaglia i sar., 1998). Budući da je pokazano da regulatorne T-ćelije *in vitro* suprimiraju aktivaciju autoreaktivnih CD4+ T-ćelija na dozno-zavisan način (Thornton i Shevach, 1998; Takahashi i sar., 2000), prethodni nalaz bi se mogao povezati i sa nepovoljnijim odnosom broja CD134+CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u kičmenoj moždini mužjaka, u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod ženki pacova. Nalaz veće zastupljenosti reaktivisanih CD4+ limfocita kod mužjaka bi se takođe mogao povezati sa podacima koji ukazuju da su regulatorne CD4+ ćelije koje su izolovane iz jako inflamirane sredine insuficijentne u pogledu supresije neuroantigen-specifičnih ćelija, kao i da proinflamatorni citokini „štite“ efektorske CD4+ limfocite od supresorskog dejstva regulatornih CD4+ ćelija (Korn i sar., 2007; Schadenberg i sar., 2011). U prilog ovoj pretpostavci idu nalazi koji ukazuju na veću ekspresiju proinflamatornih citokina, kako u CD4+ T-limfocitima (IL-17), tako i u mijeloidnim ćelijama (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) koje su izolovane iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova. Manja zastupljenost drugih subpopulacija regulatornih ćelija

(CD8+CD25+Foxp3+ i NKT ćelije) u kičmenoj moždini mladih mužjaka, je, verovatno, takođe doprinela većoj zastupljenosti reaktivisanih CD4+ T-limfocita u ciljnom organu mužjaka u odnosu na ženke istog uzrasta.

Analiza TCR $\alpha\beta$ + ćelija izolovanih iz kičmene moždine mladih mužjaka pacova je pokazala da je u okviru ove populacije ćelija, procentualna zastupljenost IL-17+ limfocita bila veća, a procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija manja nego kod ženki. Takođe, u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine mužjaka pacova, kojima je bio dodat PMA i jonomicin, izmerena je veća koncentracija IL-17, a manja koncentracija IFN- $\gamma$  nego kod ženki istog uzrasta. U skladu sa većim procentom Th17 ćelija u kičmenoj moždini mužjaka je bila i veća ekspresija iRNK za citokine koji imaju ključnu ulogu u diferencijaciji ćelija Th17 fenotipa u EAE-u (IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23/p19) (McGeachy i Cua, 2008; Chung i sar., 2009), u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Ovi citokini se smatraju negativnim regulatorima diferencijacije Th1 ćelija (Diehl i sar., 2000; Wheeler i sar., 2006; Waite i Skokos, 2012). U skladu sa ovom tezom, procentualna zastupljenost Th1 ćelija, u okviru populacije T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu, je bila manja kod mladih mužjaka nego kod ženki pacova. U prilog ovim nalazima je bila i manja ekspresija iRNK za IL-12/p35, citokina koji je od ključnog značaja za diferencijaciju Th1 limfocita (Prochazkova i sar., 2012), u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka u odnosu na ženke pacova. Iako se smatra da je TGF- $\beta$  takođe važan za diferencijaciju Th17 limfocita (Veldhoen i sar., 2006; McGeachy i Cua, 2008; Chung i sar., 2009), ekspresija gena za ovaj citokin je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova. Ovaj, na prvi pogled, neočekivan nalaz, objašnjavaju podaci koji su objavili Ghoreschi i njegovi saradnici (2010). Oni su pokazali da je u odsustvu TGF- $\beta$ , diferencijacija Th17 ćelija ne samo moguća, već da takvo citokinsko okruženje generiše patogenije forme Th17 limfocita, koji uz IL-17 sintetišu i IFN- $\gamma$  (Ghoreschi i sar., 2010).

Iako rezultati mnogih studija sugerišu da Th17 limfociti imaju važnu ulogu u patogenezi autoimunskih poremećaja koji su posredovani CD4+ T-ćelijama (Park i sar., 2005), uloga Th1 limfocita u nastanku ovih poremećaja se ne može zanemariti (Jäger i Kuchroo, 2010). U prilog ovoj tvrdnji ide činjenica da EAE razvijaju



životinje kojima je uklonjen gen za IL-17, ali i one kojima je uklonjen gen za IFN- $\gamma$  (Jäger i Kuchroo, 2010). Iako uloga Th17 i Th1 limfocita u patogenezi EAE-a nije u potpunosti razjašnjena, pokazano je da u onim modelima u kojima se EAE indukuje aktivnom imunizacijom oglednih životinja mijelinskim antigenima, obe subpopulacije Th limfocita imaju patogenetski značaj (Jäger i Kuchroo, 2010). Podaci iz literature ukazuju da odnos ovih subpopulacija zavisi od vrste i soja oglednih životinja, kao i od indukcionog protokola (El-Behi i sar., 2010). U modelu EAE-a koji je prikazan u ovoj disertaciji, apsolutni broj Th17 limfocita u kičmenoj moždini mladih životinja oba pola je bio manji nego apsolutni broj Th1 ćelija. Međutim, odnos broja Th17 i Th1 limfocita je bio više pomeren na stranu Th17 ćelija kod teže obolelih mladih mužjaka pacova, u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod ženki pacova. Slično je pokazano i u nekim drugim modelima EAE-a (Langrish i sar., 2005; Savarin i sar., 2012). Manja procentualna zastupljenost Th1 ćelija u okviru T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu mužjaka je u saglasnosti sa podacima iz drugih studija u kojima je ispitivan CD4<sup>+</sup> T-ćelijski odgovor na modelu EAE-a. Naime, pokazano je da mijelin-specifični CD4<sup>+</sup> limfociti izolovani iz adultnih mužjaka glodara kod kojih je indukovano EAE, eksprimiraju manje IFN- $\gamma$  u odnosu na te ćelije ženki glodara istog uzrasta (Cua i sar., 1995b; Bebo i sar., 1996; Voskuhl i sar., 1996; Bebo i sar., 1999b, Zhang i sar., 2012).

Smatra se da se Th17 i Th1 imunski odgovor međusobno recipročno regulišu *in vivo*, što je posebno izraženo u onim modelima autoimunosti u kojima se koristi KFA prilikom indukcije bolesti (Damsker i sar., 2010). Jedan od mehanizama kojima se ostvaruje ova uzajamna regulacija je inhibicija sinteze IL-17 od strane samog IFN- $\gamma$ . Naime, pokazano je da IFN- $\gamma$  suprimira ekspresiju IL-23 u dendritskim ćelijama i makrofagima, destabilišući iRNK za podjedinicu p19 ovog heterodimernog citokina (Qian i sar., 2011). Još jedan faktor koji učestvuje u recipročnoj regulaciji Th17 i Th1 imunskog odgovora u efektorskoj fazi EAE-a je IL-27, citokin iz IL-12 porodice citokina (Fitzgerald i sar., 2007). Naime, sekrecija IL-27 od strane APC u CNS-u i aktivisanih astrocita (Pflanz i sar., 2004; Fitzgerald i sar., 2007), favorizuje ekspanziju CD4<sup>+</sup> limfocita i njihovu diferencijaciju u smeru ćelija sa Th1 fenotipom, stimulacijom transkripcionog faktora T-bet (Pflanz i sar., 2004). Pored toga, IL-27 povećava osetljivost naivnih Th limfocita na delovanje IL-

12, budući da indukuje ekspresiju receptora za ovaj citokin na njihovoj površini (Fitzgerald i sar., 2007). U isto vreme, IL-27, suprimirajući ekspresiju transkripcionog faktora ROR- $\gamma$ t, inhibiše sintezu IL-17 u CD4+ T-ćelijama (Batten i sar., 2006; Stumhofer i sar., 2006; Fitzgerald i sar., 2007). Uz sve prethodno pomenuto, IL-27 stimuliše i ekspresiju IL-10, koji takođe suprimira ekspresiju ROR- $\gamma$ t, te tako IL-27 i indirektno inhibiše sintezu IL-17 u CD4+ limfocitima koji su specifični za neuroantigene (Fitzgerald i sar., 2007; Stumhofer i sar., 2007; Gu i sar., 2008). Imajući u vidu prethodno iznete podatke, veća zastupljenost Th17 limfocita u kičmenoj moždini mužjaka bi se mogla povezati i sa manjom ekspresijom IL-27 i IL-10 koja je nađena u njihovim mononuklearnim ćelijama, u poređenju sa ekspresijom ovih citokina u istim ćelijama ženki pacova.

Razdvajanje uloga Th17 i Th1 limfocita u patogenezi autoimunske neuroinflamacije koja je posredovana CD4+ T-ćelijama se dodatno komplikuje plastičnošću ovih ćelija, kako u perifernim limfoidnim organima, tako i u ciljnom organu (McGeachy i sar., 2007; Kaufmann i sar., 2012; Zielinski i sar., 2012). Pokazano je da Th17 limfociti, zavisno od okruženja, mogu da sintetišu i IFN- $\gamma$  i da takve ćelije imaju izražen destruktivni potencijal (McGeachy i sar., 2007; Duhon i sar., 2013). Takođe, postoje podaci koji ukazuju da Th17 ćelije mogu da sintetišu i IL-10 i da te ćelije imaju minimalno oštećujući kapacitet, ili čak potencijalno imunoregulatorne funkcije (McGeachy i sar., 2007; Ghoreschi i sar., 2010). U skladu sa težim neurološkim deficitom kod mladih mužjaka pacova, u mononuklearnom ćelijskom infiltratu kičmene moždine ovih životinja je bilo više izrazito patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija, u odnosu na IL-17+IL-10+ ćelije, nego kod ženki istog uzrasta. Ovakav nalaz je bio u saglasnosti sa većom ekspresijom IL-23 i IL-6 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova (McGeachy i sar., 2007, Ghoreschi i sar., 2010; Duhon i sar., 2013). S druge strane, manja zastupljenost IL-17+IL-10+ ćelija u subpopulaciji Th17 limfocita koji su izolovani iz kičmene moždine mužjaka, se može pripisati manjoj ekspresiji gena za TGF- $\beta$  i IL-27 u njihovim mononuklearnim ćelijama, nego u ovim ćelijama ženki pacova (Fitzgerald i sar., 2007; McGeachy i sar., 2007; Ghoreschi i sar., 2010).

Ispitivanje polnog dimorfizma u citokinskom profilu mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova je pokazalo i veću ekspresiju gena za GM-CSF u

ćelijama koje su izolovane iz kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova. Mehanizam patogenog delovanja GM-CSF-a još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Studije na miševima su pokazale da su Th ćelije glavni izvor GM-CSF-a u EAE-u i da se patogenost IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija može pripisati ovom citokinu (El-Behi i sar., 2011; Coddari i sar., 2013; Duhon i sar., 2013; McWilliams i sar., 2015). Nedavno je subpopulacija GM-CSF+IL-17+IFN- $\gamma$ + Th limfocita pokazana i kod pacova Albino Oxford soja (Stojić-Vukanić i sar., 2015). Osim toga, pokazano je da GM-CSF inhibiše regulatorne CD4+ limfocite i na taj način doprinosi neuroinflamaciji u EAE-u (Kurschus, 2015). Pored dejstva na limfocite, GM-CSF deluje i na ćelije urođene imunosti. Nekoliko studija je pokazalo da IL-23 stimuliše ekspresiju GM-CSF-a u Th17 ćelijama, što uzvratno indukuje sintezu IL-23 od strane dendritskih ćelija monocitnog porekla (Sonderregger i sar., 2008; El-Behi i sar., 2011; Ko i sar., 2014). Na ovaj način, uspostavlja se pozitivna povratna sprega koja dovodi do ekspanzije IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija i pojačava imunski/inflamatorni odgovor u CNS-u (El-Behi i sar., 2011; Duhon i sar., 2013). Uzimajući u obzir prethodno navedene podatke, veća ekspresija iRNK za IL-23 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka je bila u skladu sa većom ekspresijom iRNK za GM-CSF u ovim ćelijama i većom procentualnom zastupljenošću IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji Th17 limfocita ovih životinja. U prilog većoj ekspresiji iRNK za GM-CSF kod mladih mužjaka bi išla i manja ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, budući da je pokazano da je ekspresija GM-CSF-a veća u mikrosredini u kojoj je ekspresija TGF- $\beta$  manja (El-Behi i sar., 2011). Pored podataka da GM-CSF povećava sposobnost dendritskih ćelija monocitnog porekla da usmere diferencijaciju Th limfocita u izrazito patogene Th17 ćelije (El-Behi i sar., 2011; Ko i sar., 2014), postoje podaci koji ukazuju da GM-CSF indukuje i proliferaciju i aktivaciju mikroglije (Ponomarev i sar., 2007; Parajuli i sar., 2012).

U skladu sa prethodno iznetim su bili i nalazi dobijeni ispitivanjem mijeloidnih (CD11b+) ćelija kičmene moždine na vrhuncu EAE-a. Procenat CD11b+CD45<sup>++</sup> ćelija, koje fenotipski odgovaraju inflamatornim makrofagima/dendritskim ćelijama monocitnog porekla i potencijalno jako aktivisanim ćelijama mikroglije (Zhang i sar., 2002; Croxford i sar., 2015b), je bio drastično veći u

kičmenoj moždini mužjaka nego ženki mladih pacova. Osim toga, gustina površinske ekspresije molekula CD11b i CD45 na CD11b+CD45<sup>++</sup> ćelijama ukazuje i na to da su ove ćelije bile jače aktivisane kod mužjaka nego kod ženki mladih pacova. (Watanabe i sar., 1999). Osim toga, kod mladih mužjaka pacova je nađena i veća gustina površinske ekspresije CD11b i CD45 molekula na CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelijama, koje fenotipski odgovaraju ćelijama mikroglije (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009). Ovaj nalaz ukazuje i na jaču aktivaciju ćelija mikroglije mužjaka nego ženki mladih pacova. Poznato je da aktivisane mijeloidne ćelije u CNS-u sekretuju neurotoksične medijatore, kao što su reaktivni oblici kiseonika i azota, glutamat i TNF- $\alpha$  (Parajuli i sar., 2012). U skladu sa ovim podacima, izdvojene CD11b+ ćelije kičmene moždine mladih mužjaka su u kulturi sekretovale više TNF- $\alpha$  i pokazivale veću ekspresiju gena za iNOS, ključni enzim u sintezi NO. Osim toga, CD11b+ ćelije izdvojene iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih mužjaka su pokazivale veću sekreciju i drugih proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6) u odnosu na ove ćelije ženki pacova.

S druge strane, u supernatantima kultivisanih CD11b+ ćelija kičmene moždine mužjaka pacova, nađena je veća koncentracija IL-10. Ovaj nalaz bi se mogao povezati sa autoregulatornim svojstvima ćelija mikroglije (Aloisi, 2001). Naime, pokazano je da u uslovima izražene neuroinflamacije, koja može dovesti do teškog oštećenja nervnog tkiva i tako potencijalno ugroziti funkcije CNS-a koje su od vitalnog značaja, aktivisane ćelije mikroglije sekretuju IL-10. Delujući autokrino, IL-10 reguliše aktivnost samih ćelija mikroglije, a time i sekreciju inflamatornih medijatora, sprečavajući prekomerno oštećenje nervnog tkiva (Aloisi i sar., 1999; O'Keefe i sar, 1999; Ledebouer i sar., 2002). U tom kontekstu, veća koncentracija IL-10 koja je izmerena u supernatantima kultivisanih CD11b+ ćelija kičmene moždine mužjaka, bi mogla da se posmatra kao homeostatski mehanizam koji ima za cilj da reguliše aktivnost ćelija mikroglije i minimizira oštećenje nervnog tkiva kod ovih životinja, kod kojih je inflamatorni proces bio jače izražen (Aloisi, 1999; Ledebouer i sar., 2002).

U skladu sa prethodno iznetim, procenat ćelija mikroglije (CD11b+CD45<sup>-/+</sup> ćelija) koje su na svojoj površini ispoljavale CD4 molekul, koji se smatra markerom imunoregulatornih ćelija mikroglije (Almolda i sar., 2009), je bio drastično manji

kod mužjaka nego kod ženki pacova. Pretpostavlja se da imunoregulatorne ćelije mikroglije svoju funkciju ostvaruju uklanjanjem apoptotičnih limfocita fagocitozom (Magnus i sar., 2001). Smatra se da fagocitoza apoptotičnih limfocita od strane aktivisanih ćelija mikroglije sprečava njihovu sekundarnu nekrozu i sledstveni razvoj inflamacije (Magnus i sar., 2001). Pokazano je da ćelije mikroglije koje fagocituju apoptotične ćelije stiču tolerogena svojstva i da se njihov proinflamatorni potencijal značajno smanjuje (Magnus i sar., 2001). U prilog ovim pretpostavkama je bio veći procenat apoptotičnih CD4+ T-ćelija koji je nađen u kičmenoj moždini mužjaka u odnosu na ženke pacova. U korelaciji sa polnim dimorfizmom u zastupljenosti CD4+ ćelija mikroglije, i koncentracija TGF- $\beta$ , citokina za koji se smatra da ima ključnu ulogu u kontroli neuroinflamacije (Shin i sar., 2012), je bila manja u supernatantima kultivisanih CD11b+ ćelija mužjaka pacova. Takođe, i ekspresija iRNK za Arg-1, enzima koji se smatra markerom mijeloidnih ćelija koje imaju anti-inflamatorna/imunoregulatorna svojstva u EAE-u (Ahn i sar., 2012), je bila manja u CD11b+ ćelijama mužjaka nego ženki pacova.

Na osnovu svega prethodno iznetog, može se zaključiti da je smer polnog dimorfizma u težini kliničke slike EAE-a, na vrhuncu bolesti u potpunosti odslikavao smer polnog dimorfizma i diergizma ne samo CD4+ limfocita, već i mijeloidnih ćelija koje učestvuju u neuroinflamaciji kod mladih pacova.

### ***5.1.3. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti***

Imajući u vidu smer polnih razlika u imunskom odgovoru u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti, postavilo se pitanje da li on odslikava polni dimorfizam u imunskom odgovoru na periferiji ili se ove razlike razvijaju na nivou ciljnog organa, i, ako je tako, u kojoj fazi bolesti dolazi do njihove pojave.

Da bi se odgovorilo na ova pitanja, ispitivane su mononuklearne ćelije izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine mladih pacova u induktivnoj fazi bolesti, odnosno, 7. d.p.i. Rezultati dobijeni u tom delu studije sugerišu da je procentualni porast u zastupljenosti CD134+ CD4+ T-limfocita poplitealnog limfnog čvora, posle imunizacije bio manji kod mužjaka nego kod

ženki mladih pacova. Manji procenat aktivisanih CD4+ T-ćelija bi se mogao povezati sa manjim procentom makrofaga i konvencionalnih dendritskih ćelija (CD11b+CD45RA- ćelije) kod ovih životinja i, sledstveno, nepovoljnijim odnosom APC i CD4+ T-limfocita u drenirajućem limfnom čvoru mužjaka. Ovaj nalaz je u skladu i sa podacima koji ukazuju da muškarci imaju 1,7 puta manje autoreaktivnih limfocita nego žene (Su i sar., 2013). U prilog takvom nalazu idu i rezultati koji pokazuju manji procenat aktivisanih CD4+ limfocita u odgovoru na unos mijelinskih antigena kod mužjaka miševa (Dunn i sar., 2007). Ovakav nalaz se objašnjava polnim dimorfizmom u ekspresiji transkripcionog faktora PPAR $\alpha$  (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (receptor koji se aktivira uz proliferaciju peroksizoma- $\alpha$ ), koji reguliše ekspresiju brojnih gena koji su relevantni za imunske funkcije (Dunn i sar., 2007).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji takođe ukazuju da su CD4+ limfociti koji su izolovani iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka, značajno manje proliferisali *in vitro* u odgovoru na stimulaciju MBP-om. Budući da klonska ekspanzija autoreaktivnih ćelija u velikoj meri zavisi od supresorskog delovanja regulatornih CD4+ limfocita (Sojka i sar., 2008; Corthay, 2009), nametnulo se pitanje da li je manji proliferativni odgovor na antigensku stimulaciju intrinzično svojstvo CD4+ limfocita mužjaka, kako je sugerisano kod glodara i muškaraca (Santoli i sar., 1976; Bilbo i Nelson, 2003; Zhang i sar., 2012), ili posledica polnih razlika u zastupljenosti i/ili funkcijskom kapacitetu regulatornih CD4+ limfocita. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da se procentualna zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u drenirajućem limfnom čvoru nije statistički razlikovala između ženki i mužjaka mladih pacova. S druge strane, u *in vitro* testu supresije proliferacije, smanjenje proliferacije Tef ćelija limfnog čvora mužjaka je bilo manje nego kod ženki, samo onda kada je odnos Treg i Tef ćelija u kulturi bio 1:1. Međutim, ova razlika se gubila povećanjem broja Tef ćelija u odnosu na Treg ćelije. Ovakav nalaz implicira nešto manji supresorski kapacitet Treg ćelija koje su izdvojene iz limfnih čvorova mužjaka i, na prvi pogled, nije u skladu sa prethodnim nalazom koji ukazuje na manji proliferativni odgovor CD4+ limfocita u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka. U traženju objašnjenja za ovaj nalaz treba imati u vidu da je odnos CD134+ CD4+ T- limfocita

i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija bio povoljniji u drenirajućem limfnom čvoru mladih mužjaka nego ženki pacova. Osim toga, pokazano je da supresorska funkcija regulatornih T-ćelija zavisi, kao što je prethodno navedeno, od prisustva proinflamatornih citokina u njihovom okruženju (Korn i sar., 2007; Schadenberg i sar., 2011). Pokazano je da je sekrecija IL-6 i TNF- $\alpha$  bila manja u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka nego ženki pacova istog uzrasta. Shodno tome, može se pretpostaviti da su, u uslovima povoljnijeg odnosa aktivisanih CD4+ T- limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija i manje koncentracije proinflamatornih citokina, kako je nađeno u drenirajućem limfnom čvoru mladih mužjaka pacova, CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelije mužjaka efikasnije suprimirale proliferaciju CD4+ limfocita u poređenju sa Treg ćelijama ženki.

Imajući sve prethodno navedeno u vidu, moglo bi se spekulirati da je brojčano manji pul autoreaktivnih CD4+ limfocita, uz procentualno manju aktivaciju ovih ćelija u odgovoru na imunizaciju neuroantigenima u drenirajućem limfnom čvoru, uslovio sporije generisanje encefalitogenih CD4+ T-limfocita i, posledično, njihovu sporiju akumulaciju u kičmenoj moždini mužjaka pacova. I zaista, u induktivnoj fazi bolesti je izolovan manji broj CD4+ T-limfocita iz kičmene moždine mužjaka nego ženki mladih pacova. U skladu sa iznetom pretpostavkom, logično je očekivati da je kod mladih mužjaka pacova bilo potrebno duže vreme da se dosegne kritičan („pražni“) broj CD4+ T-ćelija, odnosno, broj ćelija koji je neophodan za započinjanje autoimunske neuroinflamacije (Siegmund i sar., 2011). Ova pretpostavka je korelirala i sa nešto kasnijim početkom neuroloških manifestacija EAE-a kod mužjaka u odnosu na pacove ženskog pola. Slična korelacija između pojave simptoma EAE-a i brzine akumulacije imunskih ćelija u CNS-u, pokazana je i u drugim modelima EAE-a. Naime, Siegmund i njeni saradnici (2011) su pokazali da je kod genetski modifikovanih životinja koje su ispoljile defekt u aktivaciji T-limfocita u drenirajućem limfnom čvoru, kao i manju proliferaciju i sintezu citokina u odgovoru na stimulaciju mijelinskim antigenima *in vitro*, akumulacija kritičnog broja CD4+ T-ćelija, koji je neophodan za otpočinjanje autoimunske neuroinflamacije, u kičmenoj moždini bila sporija. U skladu s tim, i kliničke manifestacije bolesti su kod tih životinja bile odložene (Siegmund i sar.,

2011). Međutim, važno je naglasiti da uprkos tome što je kod ovih životinja aktivacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora bila slabija (kao što je to bio slučaj kod mladih mužjaka pacova), posle reaktivacije u CNS-u, ove ćelije su imale isti, ili čak i veći potencijal da indukuju autoimunsku neuroinflamaciju kao i ćelije iz intaktnih životinja (Siegmund i sar., 2011).

U traženju objašnjenja za manji broj CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini mužjaka u induktivnoj fazi bolesti, ispitivana je ekspresija gena za hemokin CXCL12 u tkivu kičmene moždine mladih pacova. Naime, smatra se da ovaj hemokin ima plejotropnu imunoregulatornu ulogu u EAE-u (Karin, 2010), koju, između ostalog, ostvaruje ograničavanjem infiltracije autoreaktivnih CD4+ limfocita u parenhim CNS-a i njihovim zadržavanjem u perivaskularnom prostoru (McCandless i sar., 2006, Miljković i sar., 2011). Na osnovu ekspresije iRNK za CXCL12, koja je bila manja u tkivu kičmene moždine mužjaka, može se očekivati restriktivnija migracija CD4+ limfocita u parenhim kičmene moždine ženki nego mužjaka pacova. Pored toga, pokazano je i da CXCL12 selektivno nishodno reguliše ekspresiju molekula CXCR4 na površini monocita i na taj način ograničava njihovu transmigraciju u parenhim CNS-a (Man i sar., 2012). U skladu sa ovim, procentualna zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija, kojima uglavnom fenotipski odgovaraju inflamatorni makrofagi i dendritske ćelije monocitnog porekla (Croxford i sar., 2015b), je bila veća u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine mužjaka. U skladu sa većim procentom CD45<sup>++</sup> ćelija je bila i veća ekspresija iRNK za TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama mužjaka nego u istim ćelijama ženki pacova. U saglasnosti sa većim procentom CD45<sup>++</sup> CD11b<sup>+</sup> ćelija, za koje se smatra da predstavljaju ključne APC u ranoj fazi EAE-a (Goverman, 2009; Mensah-Brown i sar., 2011; Croxford i sar., 2015a), i većom ekspresijom proinflamatornih medijatora u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, nađena je veća zastupljenost, mada ne i broj, aktivisanih CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-ćelija kod mužjaka nego kod ženki mladih pacova.

Inverzija smeru polnog dimorfizma u broju CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-limfocita na vrhuncu bolesti u odnosu na njenu induktivnu fazu, bi se, pored restriktivnijeg „ulaska“ CD4<sup>+</sup> ćelija u kičmenu moždinu mladih ženki u poređenju sa mužjacima istog uzrasta, mogla objasniti i većom površinskom gustinom ekspresije CD134



molekula na površini CD4+ T-ćelija mladih mužjaka pacova. Naime, pokazano je da ushodna regulacija ekspresije molekula CD134 na CD4+ limfocitima obezbeđuje njihovo bolje preživljavanje (Rogers i sar., 2001) i proliferaciju posle reaktivacije (Gramaglia i sar., 1998).

Bez obzira na manji broj CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini mužjaka pacova u ranoj fazi EAE-a, citokinski „milje“ u tkivu njihove kičmene moždine je, sudeći prema većoj ekspresiji iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 u mononuklearnim ćelijama, već u toj fazi bolesti podržavao razvoj Th17 limfocita. U skladu sa ovim nalazom, nađen je veći procenat IL-17+ ćelija u populaciji T-limfocita kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova. S druge strane, procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u populaciji T-limfocita kičmene moždine se nije razlikovala između ženki i mužjaka pacova u ovoj fazi bolesti.

Rezultati dobijeni analizom fenotipa i funkcijskih karakteristika mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine i drenirajućeg limfnog čvora u induktivnoj fazi bolesti, sugerišu da je dinamika razvoja EAE-a kod mladih životinja imala polno dimorfni karakter. Osim toga, rezultati koji su dobijeni u studiji na mladim životinjama su pokazali da je polni dimorfizam u težini EAE-a bio u obrnutom smeru od onog koji je uočen u imunskom odgovoru na periferiji, a korelirao sa polnim razlikama u imunskom odgovoru u kičmenoj moždini. Imajući ovo u vidu, moglo bi se zaključiti da je ciljni organ imao determinativnu ulogu u određivanju težine neurološkog deficita u EAE-u kod mladih životinja.

## **5.2. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a kod starih pacova**

### ***5.2.1. Polni dimorfizam u kliničkoj slici EAE-a koji je indukovano inokulacijom homogenata singene kičmene moždine kod starih pacova***

Uzimajući u obzir postojanje polnog dimorfizma u incidenci i težini EAE-a kod mladih pacova, kao i činjenicu da starenje na polno dimorfan način utiče na imunski odgovor (Caruso i sar., 2013; Hirokawa i sar., 2013), postavilo se pitanje

da li starenje utiče na polne razlike u kliničkim parametrima EAE-a, i, ako utiče, kako to čini.

Rezultati dobijeni u drugom delu istraživanja koja su vezana za ovu disertaciju su potvrdili da starenje značajno smanjuje incidencu i težinu EAE-a, ne samo kod ženki DA pacova, kako je ranije pokazano (Djikić i sar., 2014; 2015), već i kod mužjaka ovog soja. Podaci o uticaju starenja na osetljivost na indukciju EAE-a koji se mogu naći u literaturi su kontradiktorni. Smanjenje osetljivosti na indukciju EAE-a starenjem pokazano je i u drugim studijama, na različitim sojevima oglednih životinjskih vrsta (Levine i Sowinski, 1976; Endoh i sar., 1990; Ditamo i sar., 2005; Tatari-Calderone i sar., 2012). Međutim, u literaturi se nalaze i podaci koji ukazuju na razvoj teže bolesti kod starih životinja u odnosu na mlade (Spach i sar., 2009; Seo i sar., 2013). Kontradiktorni nalazi su u najvećoj meri posledica genetskih razlika između različitih vrsta i sojeva korišćenih oglednih životinja, varijacija u njihovom hronološkom/biološkom uzrastu, ali i razlika u protokolu za indukciju EAE-a (Ben-Nun i sar., 1980; Källén i Nilsson, 1989; Endoh i sar., 1990; Lydowik i sar., 1993; Di Rosa i sar., 2000; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005; Tatari-Calderone i sar., 2012).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su ukazali na postojanje polnog dimorfizma u osetljivosti na indukciju bolesti i težini kliničkih manifestacija EAE-a i kod starih životinja. Naime, stari mužjaci, za razliku od starih ženki, su, po pravilu, razvijali vrlo blag motorni deficit, koji se manifestovao samo atonijom vrha repa. Međutim, treba napomenuti da i klinički inaparentni EAE može biti praćen ćelijskim i molekularnim promenama u ciljnom tkivu koje su karakteristične za autoimunsku neuroinflamaciju (Endoh i sar., 1990; Smith i sar., 1999). Iz prikazanih rezultata takođe proizilazi i zaključak da starenje dovodi do inverzije smera polnog dimorfizma u težini kliničkih parametara bolesti, u odnosu na onaj koji je opisan kod mladih životinja.

Generalno, o polnim razlikama u neuroinflamaciji kod starih životinja se malo zna. Dostupni literaturni podaci sugerišu postojanje polnog dimorfizma u odgovoru na ishemijsko oštećenje CNS-a, u smislu da stare ženke miševa razvijaju težu inflamaciju, usled veće propustljivosti hemato-encefalne barijere i veće ekspresije proinflamatornih citokina u odnosu na stare mužjake, što se pripisuje

smanjenju koncentracije cirkulišućih estrogena kao važnog neuroprotektivnog faktora (Manwani i McCullough, 2011). Druga istraživanja, međutim, ukazuju da starosno uslovljene razlike u koncentraciji polnih steroida nisu jedini faktor koji utiče na polne razlike u težini neuroinflamacije kod starih, u odnosu na mlade životinje (Li i sar., 2006).

### ***5.2.2. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih pacova na vrhuncu bolesti***

Imajući u vidu da je starenje dovelo do inverzije smeru polnog dimorfizma u težini EAE-a, sledeći korak u istraživanju je bio da se ispituju karakteristike imunskog odgovora u kičmenoj moždini starih pacova na vrhuncu bolesti i da se identifikuju patogenetski mehanizmi potencijalno odgovorni za razlike u težini EAE-a kod životinja ovog uzrasta.

Slično kao i kod mladih pacova, težina neurološkog deficita je pozitivno korelirala sa ukupnim brojem mononuklearnih ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine starih životinja na vrhuncu bolesti. Uočeno je da je ovaj broj kod starih pacova oba pola bio značajno manji nego kod mladih životinja u istoj fazi bolesti. Međutim, u skladu sa lakšom bolešću kod starih mužjaka pacova, iz njihove kičmene moždine je izolovan značajno manji broj reaktivisanih CD134+ CD4+ T-ćelija nego iz kičmene moždine teže obolelih ženki istog uzrasta. Ovakvom nalazu je verovatno doprinela i veća zastupljenost apoptotičnih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova. Veća apoptoza CD4+ T-ćelija bi mogla da bude posledica njihove manje efikasne reaktivacije u kičmenoj moždini mužjaka (Rogers i sar., 2001). Osim toga, veća procentualna zastupljenost apoptotičnih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini mužjaka, u poređenju sa ženkama, je bila u korelaciji i sa većim procentom CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija kod ovih životinja. Naime, jedan od prominentnih mehanizama kojim CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelije suprimiraju imunski odgovor u modelima autoimunske inflamacije, je indukcija apoptoze efektorskih CD4+ limfocita, deprivacijom citokina koji su neophodni za njihovo preživljavanje u cilnom organu (Pandiyan i sar., 2007). Budući da je pokazano da broj reaktivisanih ćelija zavisi od broja i supresorskog kapaciteta regulatornih CD4+ limfocita (Gültner i sar., 2010), u skladu sa manjim brojem

CD134+ CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova je bio i povoljniji odnos broja ovih i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u poređenju sa ženka istog uzrasta. Takođe, u skladu sa ranije navedenim podacima o efikasnijoj supresiji autoreaktivnih CD4+ limfocita u kičmenoj moždini u kojoj je ekspresija proinflamatornih citokina manja, bila je i manja ekspresija gena za IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki starih pacova.

S obzirom na to da je prethodno pokazano da je težina EAE-a kod mladih životinja pozitivno korelirala sa većim procentom Th17 ćelija u inflamatornom ćelijaskom infiltratu kičmene moždine, a posebno sa većom procentualnom zastupljenošću izrazito patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija među njima, postavilo se pitanje da li takva korelacija postoji i kod starih životinja. Nađeno je da je procenat Th17 ćelija bio manji u populaciji T-limfocita iz kičmene moždine mužjaka nego ženki starih pacova. Osim toga, nađeno je da je odnos broja Th17 i Th1 ćelija u kičmenoj moždini starih ženki pacova bio pomećen na stranu Th17 limfocita, u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod mužjaka. Ovaj nalaz, zajedno sa onim dobijenim kod mladih životinja, ukazuje da je, u poređenju sa lakše obolelim životinjama, kod teže obolelih, nezavisno od njihovog uzrasta, odnos broja Th17 i Th1 ćelija u kičmenoj moždini bio više pomećen na stranu Th17 limfocita.

Manji procenat Th17 ćelija u okviru populacije T-limfocita koji su izolovani iz kičmene moždine starih mužjaka je bio u skladu sa manjom ekspresijom iRNK za citokine koji su neophodni za njihovu diferencijaciju (IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23/p19) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja, nego u istim ćelijama ženki pacova. Manji procenat Th17 ćelija u kičmenoj moždini starih mužjaka bi se mogao objasniti i većom ekspresijom iRNK za IL-27 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja. Sudeći prema podacima iz drugih radova, IL-27 inhibiše diferencijaciju Th17 ćelija i ograničava razvoj EAE-a (Batten i sar., 2006; Stumhofer i sar., 2006). S druge strane, veća ekspresija gena za IL-27 kod starih mužjaka pacova, naizgled nije korelirala sa manjom zastupljenošću Th1 ćelija kod ovih životinja, s obzirom na to da IL-27 stimuliše ekspresiju T-bet u Th limfocitima (Pflanz i sar., 2004). Međutim, Lucas i njeni saradnici (2003) su pokazali da IL-27, za razliku od IL-12, nije dovoljan da samostalno dovede do potpune diferencijacije

CD4+ T-ćelija u Th1 ćelije. Manja procentualna zastupljenost Th1 ćelija u populaciji T-limfocita iz kićmene moždine starih muđjaka je najverovatnije odrađavala manju ekspresiju iRNK za IL-12/p35 u mononuklearnim ćelijama kićmene moždine ovih životinja, u odnosu na ekspresiju ovog gena kod ženki istog uzrasta. Naime, pokazano je da je IL-12 glavni citokin za razvoj Th1 ćelija i da mođe samostalno da konvertuje Th limfocite u ćelije Th1 fenotipa (Prochazkova i sar., 2012). Manja zastupljenost Th1 ćelija kod muđjaka bi se dodatno mogla objasniti većom ekspresijom iRNK za TGF- $\beta$  u mononuklearnim ćelijama kićmene moždine ovih pacova. Naime, pokazano je da TGF- $\beta$  inhibiše ekspresiju transkripcionog faktora T-bet (Lee i sar., 2009). Na osnovu prethodno iznetog, moglo bi se zakljućiti da diferencijacija Th limfocita u ćelije određenog fenotipa zavisi od odnosa razlićitih citokina, a ne od apsolutne kolićine bilo kojeg od njih pojedinaćno (Kaufmann i sar, 2012).

U svetlu prethodne tvrdnje bi se mogla tumaćiti i manja procentualna zastupljenost Th17 limfocita u populaciji T-ćelija u kićmenoj moždini starih muđjaka, u odnosu na ženke istog uzrasta, u uslovima manje ekspresije IL-10. Naime, budući da IL-10 inhibira ekspresiju transkripcionog faktora ROR- $\gamma$ t (Gu i sar., 2008), oćekivalo bi se da manja ekspresija IL-10 u T-limfocitima iz kićmene moždine starih muđjaka omogući efikasniju diferencijaciju Th limfocita u Th17 ćelije, što nije naćeno kod ovih životinja. Veća ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  u mononuklearnim ćelijama kićmene moždine starih muđjaka, osim što je doprinela manjoj zastupljenosti Th1 ćelija u populaciji T-limfocita u kićmenoj moždini ovih životinja, verovatno je uticala i na manju zastupljenost Th17 ćelija sa izraćenim patogenim svojstvima (IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelije) (Ghoreschi i sar., 2010) kod starih muđjaka pacova. Osim toga, manji procenat IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija kod starih muđjaka pacova je bio u saglasnosti sa manjom ekspresijom gena za GM-CSF, citokina koji se smatra odgovornim za patogenost Th17 ćelija (El-Behi i sar., 2011; Coddari i sar., 2013; Duhon i sar., 2013; McWilliams i sar., 2015), u mononuklearnim ćelijama kićmene moždine ovih životinja, nego u istim ćelijama ženki pacova.

Znaćajno manja ekspresija gena za GM-CSF kod starih muđjaka je takođe bila u skladu sa manjom zastupljenošću aktivisanih (CD45<sup>+</sup>) ćelija mikroglije u populaciji mijeloidnih (CD11b<sup>+</sup>) ćelija kićmene moždine ovih životinja nego ženki

starih pacova. Pokazano je, naime, da GM-CSF indukuje aktivaciju i proliferaciju ćelija mikroglije (Ponomarev i sar., 2007; González i Pacheco, 2014). Takođe, pored manje zastupljenosti ćelija aktivisane mikroglije u kičmenoj moždini mužjaka, i površinska gustina ekspresije CD11b i CD45 molekula na njima je bila manja, u poređenju sa istim ćelijama ženki starih pacova. Manja aktivacija ćelija mikroglije bi mogla biti odgovorna za manji procenat reaktivisanih CD4+ T-limfocita koji je nađen na vrhuncu bolesti u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova. Naime, ćelije mikroglije stiču maksimalnu sposobnost prezentacije antigena na vrhuncu EAE-a, kada je, pod uticajem inflamatornog procesa, ekspresija MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula na površini ovih ćelija maksimalna (Almolda i sar., 2011, Mensah-Brown i sar., 2011). Procentualna zastupljenost ćelija sa CD45<sup>++</sup> fenotipom u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija je bila mala kod starih pacova oba pola i nije se statistički značajno razlikovala između polova. Ovaj podatak sugerise da je starenjem došlo do značajnog smanjenja transmigracije proinflamatornih monocita u kičmenu moždinu pacova oba pola. Imajući u vidu ključnu ulogu ovih ćelija za inicijaciju i razvoj neuroinflamatornog procesa u EAE-u, kako je ranije objašnjeno, mali procenat CD11b<sup>+</sup> ćelija sa CD45<sup>++</sup> fenotipom je verovatno značajno doprineo lakšoj kliničkoj slici EAE-a kod starih životinja u poređenju sa mladim pacovima. Osim toga, sudeći po gustini ekspresije molekula CD11b i CD45 na površini ovih ćelija, i njihova aktivacija je bila slabija kod mužjaka nego kod ženki starih pacova. Navedeni rezultati ukazuju da je aktivacija mijeloidnih ćelija bila manja u kičmenoj moždini mužjaka starih pacova, što je koreliralo sa blažom kliničkom slikom EAE-a kod ovih životinja u odnosu na ženke istog uzrasta.

U saglasnosti sa manjom aktivacijom mijeloidnih ćelija je bila i manja ekspresija gena za IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i iNOS u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego u odgovarajućim ćelijama ženki starih pacova (Parajuli i sar., 2012; González i sar., 2014). U skladu sa ovim nalazom je bila i manja procentualna zastupljenost IL-10<sup>+</sup> Th ćelija kod mužjaka starih pacova (de Waal Malefyt i sar., 1991; Saraiva i O'Garra, 2010). Naime, za razliku od TGF- $\beta$ , čiji je gen konstitutivno visoko ekspimiran u gotovo svim tkivima, ekspresija gena za IL-10 je minimalna u nestimulisanim tkivima i zahteva značajnu aktivaciju ćelija inflamatornim stimulusima (Banchereau i sar., 2012).

U korelaciji sa polno dimorfnom kliničkom slikom EAE-a kod starih životinja je bila i polno dimorfna procentualna zastupljenost CD4+ ćelija u populaciji aktivisanih ćelija mikroglije, za koje je ranije navedeno da imaju imunoregulatorna svojstva i da doprinose ograničavanju inflamatornog procesa (Almolda i sar., 2009). Naime, procenat ovih ćelija je bio veći kod mužjaka u poređenju sa ženkama starih pacova. U skladu s tim je bila i veća ekspresija gena za Arg-1, koji se smatra markerom imunoregulatornih mijeloidnih ćelija u EAE-u (Ahn i sar., 2012), u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta.

Imajući u vidu podatke diskutovane u ovom poglavlju, moglo bi se zaključiti da je polni dimorfizam u težini neurološkog deficita kod starih životinja, kao i kod mladih pacova, na vrhuncu bolesti pozitivno korelirao sa stepenom infiltracije kičmene moždine CD4+ limfocitima, njihovom reaktivacijom, procentualnom zastupljenošću Th17 ćelija i procentom IFN- $\gamma$ +IL-17+ ćelija u okviru te subpopulacije Th limfocita. Osim toga uočena je i pozitivna korelacija sa procentom aktivisanih ćelija mikroglije i stepenom njihove aktivacije izraženim kroz površinsku gustinu ekspresije CD11b i CD45 molekula.

### ***5.2.3. Polni dimorfizam i diergizam mononuklearnih ćelija koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine starih pacova u induktivnoj fazi bolesti***

Da bi se ispitalo da li se, kao kod mladih pacova, polne razlike u imunskom odgovoru u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti razvijaju na nivou ciljnog organa ili odslikavaju polni dimorfizam u imunskom odgovoru na periferiji starih životinja, analizirane su i mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine u induktivnoj fazi bolesti.

Rezultati koji se odnose na ovu fazu istraživanja pokazali su da je odgovor CD4+ T-ćelija na stimulaciju antigenima singene kičmene moždine, kao i kod mladih životinja, bio manji kod mužjaka nego kod ženki starih pacova. Naime, ako bi se posmatrao samo procenat aktivisanih, CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita, on je bio veći kod starih mužjaka pacova, te bi se moglo zaključiti da prethodna konstatacija nije tačna. Ovaj nalaz je verovatno odražavao povoljniji

odnos CD4+ T-limfocita i APC drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka pacova. Međutim, poređenjem procenta CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita poplitealnog limfnog čvora neimunizovanih i imunizovanih pacova, evidentno je da je procentualni porast u zastupljenosti aktivisanih CD4+ T-limfocita, u odgovoru na inokulaciju homogenata kičmene moždine, bio manji kod starih mužjaka pacova nego kod ženki istog uzrasta. Pri traženju objašnjenja za ovaj nalaz, treba uzeti u obzir podatke koji ukazuju da odrasli muškarci imaju manji pul autoreaktivnih limfocita nego žene (Su i sar., 2013). Takođe, treba imati u vidu i podatke studija koji sugerišu da je manja aktivacija CD4+ T-ćelija limfnog čvora kod adultnih mužjaka miševa, u odgovoru na unos mijelinskih antigena, polno specifično svojstvo (Dunn i sar., 2007). S druge strane, iako je procentualna zastupljenost aktivisanih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka bila veća nego kod ženki, s obzirom na to da je apsolutni broj CD4+ T-limfocita koji je izolovan iz drenirajućeg limfnog čvora mužjaka bio manji, i broj aktivisanih CD4+ T-ćelija je bio manji u poređenju sa ženkama starih pacova.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je ne samo aktivacija, već i proliferacija CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora, koji su specifični za neuroantigene, bila manja kod mužjaka nego kod ženki starih pacova. Na ovo ukazuje manja proliferacija CD4+ limfocita u kulturama mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora starih mužjaka u prisustvu MBP-a, u odnosu na odgovarajuće ćelije ženki pacova istog uzrasta. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koji pokazuju da CD4+ limfociti odraslih muškaraca i mužjaka glodara manje proliferišu u odnosu na ove ćelije žena, odnosno ženki glodara (Santoli i sar., 1976; Bilbo i Nelson, 2003; Zhang i sar., 2012), kao i da starenje više utiče na proliferativnu sposobnost limfocita muškaraca, nego žena (Hirokawa i sar., 2013).

Imajući u vidu da je proliferacija aktivisanih CD4+ limfocita i njihova diferencijacija u efektorske ćelije u velikoj meri determinisana i supresorskom aktivnošću regulatornih T-ćelija (Sojka i sar., 2008), analizirana je i zastupljenost i supresorska funkcija regulatornih CD4+ limfocita. Procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora je bila veća kod starih mužjaka nego kod ženki pacova. Pored toga, klasični *in vitro* test supresije proliferacije je, za razliku od onog kod mladih životinja, pokazao polni



diergzam u supresorskoj funkciji Treg ćelija starih pacova u oba odnosa Treg:Tef ćelija. Naime, supresija proliferacije Tef ćelija limfnog čvora je bila veća kod mužjaka nego kod ženki starih pacova i kada je odnos Treg:Tef ćelija u kulturi bio 1:1, ali i kada je ovaj odnos bio 1:2. U saglasnosti sa manjom aktivacijom i manjom proliferacijom CD4<sup>+</sup> limfocita kod mužjaka, u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ovih životinja, u prisustvu MBP-a, i koncentracija citokina ključnih za patogenezu EAE-a (IL-17 i IFN- $\gamma$ ) je bila manja nego kod ženki pacova.

Kao i na vrhuncu bolesti, 7. d.p.i. je izolovan manji broj ukupnih mononuklearnih ćelija, ali i manji broj CD4<sup>+</sup> T-ćelija i reaktivisanih, CD134<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-ćelija iz kičmene moždine starih mužjaka pacova u poređenju sa ženka istog uzrasta.

Prethodno izneti rezultati sugerišu da bi manja infiltracija CD4<sup>+</sup> T-ćelija koje su specifične za neuroantigene u kičmenu moždinu starih mužjaka pacova mogla da odražava njihovo manje generisanje u drenirajućem limfnom čvoru ovih životinja. Analiza ekspresije gena za CXCL12 (McCandless i sar., 2006, Miljković i sar., 2011) u tkivu kičmene moždine, pokazala je da se ona nije razlikovala između ženki i mužjaka starih pacova. Ovaj nalaz implicira da polni dimorfizam u broju CD4<sup>+</sup> T-ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine starih životinja, najverovatnije nije bio posledica polnih razlika u efikasnosti njihove transmigracije kroz hematoencefalnu barijeru.

Manja infiltracija CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenu moždinu starih mužjaka, uz njihovu manju reaktivaciju u ciljnom tkivu (sudeći prema procentu CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita), je izvesno doprinela klinički slabijoj bolesti kod starih mužjaka nego kod ženki pacova. Pored procentualno manje aktivacije infiltrišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita, površinska gustina ekspresije CD134 molekula je takođe bila manja na CD4<sup>+</sup> T-ćelijama koje su izolovane iz kičmene moždine starih mužjaka nego ženki istog uzrasta. Ovaj nalaz sugeriše slabiju aktivaciju CD4<sup>+</sup> T-ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu mužjaka, što bi moglo da utiče na manje preživljavanje reaktivisanih ćelija u njihovoj kičmenoj moždini. Naime, pokazano je da su slabije aktivisane CD4<sup>+</sup> ćelije podložnije apoptozi, budući da CD134 molekul stimuliše ekspresiju anti-apoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xL i

tako inhibiše apoptozu efektorskih CD4<sup>+</sup> limfocita u ciljnom tkivu (Rogers i sar., 2001).

Analiza citokinskog profila infiltriranih T-limfocita je pokazala da je zastupljenost Th1 ćelija, kao i na vrhuncu bolesti, bila manja u ćelijskim suspenzijama kičmene moždine starih mužjaka u odnosu na ženke pacova. Ovaj nalaz je bio u korelaciji sa manjom ekspresijom iRNK za IL-12/p35 (Prochazkova i sar, 2012) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka nego ženki pacova istog uzrasta. Međutim, procentualna zastupljenost Th17 ćelija u populaciji T-limfocita kičmene moždine starih pacova se nije značajno razlikovala između polova u ovoj fazi bolesti, iako je ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 (McGeachy i sar., 2007, Ghoreschi i sar., 2010) bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka pacova. Na osnovu ovih nalaza, moglo bi se zaključiti da polne razlike u ekspresiji citokina koji su determinativni za smer diferencijacije Th17 limfocita, u ranoj fazi bolesti, nisu bile dovoljne da obezbede značajnu polnu razliku u zastupljenosti glavne subpopulacije patogenih CD4<sup>+</sup> ćelija. Ovi rezultati, u kontekstu prethodno iznetih za vrednosti istih parametara na vrhuncu EAE-a, sugerišu da je evolucija imunskog i inflamatornog odgovora u kičmenoj moždini mužjaka, u funkciji vremena, „stvorila“ citokinsko okruženje koje je manje favorizovalo diferencijaciju Th limfocita u Th17 ćelije nego kod ženki pacova i, posledično, dovelo do polnih razlika u zastupljenosti Th17 ćelija na vrhuncu bolesti.

U prilog slabije izraženoj neuroinflamaciji kod starih pacova, u odnosu na mlade životinje, govore i rezultati ispitivanja mijeloidnih (CD11b<sup>+</sup>) ćelija koji pokazuju da je kod starih životinja oba pola, najveći procenat ovih ćelija u pretkliničkoj fazi bolesti pripadao subpopulaciji neaktivisanih (CD45<sup>-</sup>) (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009) ćelija mikroglije. Međutim, ova subpopulacija je bila procentualno više zastupljena kod starih mužjaka u odnosu na ženke pacova. S druge strane, subpopulacija inflamatornih makrofaga/dendritskih ćelija monocitnog porekla (CD45<sup>++</sup> ćelije) (Croxford i sar., 2015b), je bila značajno manje zastupljena kod mužjaka nego kod ženki starih pacova. Ako se ima u vidu da su ove ćelije poreklom sa periferije glavne APC u inicijalnoj reaktivaciji infiltrišućih CD4<sup>+</sup> limfocita i otpočinjanju EAE-a (Goverman, 2009; Mensah-Brown i sar., 2011;

Croxford i sar., 2015a), njihova manja zastupljenost je verovatno doprinela manjoj reaktivaciji CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih mužjaka pacova. Imajući u vidu ulogu CD45<sup>+</sup> ćelija u inicijaciji inflamatornog i imunskog odgovora u EAE-u (Mensah-Brown i sar., 2011, Croxford i sar., 2015a), manji procenat ovih ćelija u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine starih mužjaka, sugerise slabiji inflamatorni odgovor u ciljnom tkivu ovih životinja u odnosu na ženke starih pacova još u ranoj fazi bolesti. U korelaciji sa ovim rezultatima je bila i manja ekspresija gena za TNF- $\alpha$  (González i sar., 2014) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka, u poređenju sa istim ćelijama ženki starih pacova.

Na osnovu svega iznetog u ovom poglavlju, može se zaključiti da je kod starih pacova, za razliku od mladih životinja, smer polnih razlika u broju CD4+ ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu i u induktivnoj fazi bolesti i na vrhuncu EAE-a korelirao sa jačinom CD4+ T-ćelijskog odgovora u drenirajućem limfnom čvoru.

### **5.3. Uticaj starenja na polni dimorfizam u težini bolesti i fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a**

Poređenjem rezultata dobijenih kod mladih i starih pacova, evidentno je da je starenjem došlo do inverzije smera polnog dimorfizma u težini EAE-a kod pacova DA soja. Na osnovu ove observacije, moglo bi se pretpostaviti da kod pacova ovog soja, starenje značajno utiče na autoimunsku neuroinflamaciju koja je indukovana inokulacijom singene kičmene moždine, i to na polno dimorfan način. Iz ove pretpostavke je proizašlo i pitanje koje su to starenjem uslovljene promene polno dimorfnih karakteristika (auto)imunskog odgovora odgovorne za klinički uočeni fenomen.

Poređenjem rezultata koji su prikazani u prvom i drugom delu ove disertacije, može se zaključiti da se smer polnog dimorfizma u imunskom odgovoru na periferiji nije menjao starenjem. Kod pacova oba uzrasta, parametri aktivacije CD4+ T-ćelija u poplitealnom limfnom čvoru na inokulaciju antigena singene kičmene moždine su ukazivali na manji procenat aktivacije CD4+ T-ćelija kod mužjaka pacova nego kod ženki odgovarajućeg uzrasta. S druge strane, starenjem

se procenat aktivacije CD4+ T-limfocita smanjivao kod oba pola. Međutim, to smanjenje je bilo izraženije kod mužjaka, nego kod ženki pacova.

Osim toga, CD4+ limfociti drenirajućeg limfnog čvora mužjaka oba uzrasta su, *in vitro*, manje proliferisali u odgovoru na stimulaciju MBP-om u odnosu na iste ćelije ženki pacova. Starenjem je, takođe, zabeležen pad u proliferativnom odgovoru mijelin-specifičnih CD4+ limfocita kod pacova oba pola. Međutim, taj pad je bio nešto više izražen kod životinja muškog pola u odnosu na one ženskog pola. Ovakav nalaz je u skladu sa podacima da, kod čoveka, starenjem dolazi do izraženijeg smanjenja proliferativnog indeksa T-limfocita kod muškaraca nego kod žena (Hirokawa i sar., 2013).

Izraženije smanjenje proliferacije CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora mužjaka u odnosu na ženke pacova starenjem, može se povezati sa sledećim činjenicama. Prvo, zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u drenirajućem limfnom čvoru je bila slična kod mladih pacova oba pola, a veća kod starih pacova muškog pola u odnosu na ženke istog uzrasta. Drugo, kapacitet ovih ćelija da *in vitro* suprimiraju proliferaciju Tef ćelija, koje su izolovane iz limfnih čvorova, je bio manji kod mladih mužjaka pacova, ali samo u odnosu Treg:Tef 1:1, dok se u odnosu Treg:Tef 1:2 nije razlikovao između polova. S druge strane, supresorski kapacitet Treg ćelija, koje su izdvojene iz limfnih čvorova starih mužjaka pacova, je bio značajno veći u odnosu na Treg ćelije starih ženki pacova u oba ispitivana Treg:Tef odnosa. Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da su efekti starenja na povećanje procentualne zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija na periferiji i njihov supresorski kapacitet, imali polno dimorfni karakter. Literaturni podaci sugerišu da starenje dovodi do umnožavanja regulatornih CD4+ limfocita na periferiji, kod ljudi (Gregg i sar., 2005; Vukmanovic-Stejic i sar. 2006; Montoya-Ortiz, 2013) i ogleđnih životinja (Nishioka i sar., 2006; Sharma i sar., 2006; Zhao i sar., 2007; Lages i sar., 2008), kao i do povećanja efikasnosti njihove supresorske funkcije (Gregg i sar., 2005; Sharma i sar., 2006; Garg i sar., 2014). Međutim, nema podataka o polnom dimorfizmu u uticaju starenja na zastupljenost i funkciju regulatornih CD4+ limfocita.

Konačno, na osnovu iznetih podataka, može se zaključiti da iako starenje utiče na različite mehanizme koje stoje u osnovi polnog dimorfizma u imunskom

odgovoru na antigene singene kičmene moždine na periferiji, smer polnog dimorfizma u jačini imunskog odgovora posredovanog CD4+ limfocitima u drenirajućem limfnom čvoru se ne menja starenjem.

Rezultati koji su dobijeni analizom CD4+ T-ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu u induktivnoj fazi bolesti su pokazali inverziju smera polnih razlika u efikasnosti reaktivacije ovih ćelija u ciljnom organu. Naime, sudeći prema površinskoj gustini ekspresije za CD134, koji odražava gustinu površinske ekspresije CD134 molekula, reaktivacija CD4+ T-ćelija je bila efikasnija kod mladih mužjaka pacova. S druge strane, za razliku od mladih, kod starih mužjaka je MFI za CD134 molekul bio manji nego kod ženki istog uzrasta. Ovi nalazi su korelirali sa inverzijom smera polnih razlika u zastupljenosti CD11b+ ćelija sa CD45<sup>++</sup> fenotipom, za koje se smatra da su ključne za inicijalnu reaktivaciju infiltrišućih CD4+ limfocita i za otpočinjanje efektorske faze EAE-a (Goverman, 2009; Mensah-Brown i sar., 2011; Croxford i sar., 2015a). Naime, zastupljenost CD45<sup>++</sup> ćelija u okviru populacije CD11b+ ćelija kičmene moždine je kod mladih mužjaka bila veća, dok je kod starih mužjaka bila manja u odnosu na ženke pacova odgovarajućeg uzrasta. Efikasnija reaktivacija antigen-specifičnih CD4+ limfocita omogućava bolje preživljavanje i veću ekspanziju ovih ćelija (Gramaglia i sar., 1998), što je, između ostalog, verovatno doprinelo da veći broj reaktivisanih CD4+ T-ćelija bude izolovan iz kičmene moždine teže obolelih životinja oba uzrasta, na vrhuncu bolesti.

Jedna od najznačajnijih promena do koje je došlo starenjem je smanjenje broja mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a u kičmenoj moždini pacova oba pola. Ova promena, koja je, najverovatnije, najvećim delom uslovljena manjim „ulaskom“ patogenih ćelija sa periferije, je izvesno doprinela manje izraženoj neuroinflamaciji u kičmenoj moždini starih pacova oba pola, i sledstveno, lakšem neurološkom deficitu u odnosu na mlade životinje. Međutim, na osnovu iznetih podataka, može se zaključiti da je starenje na polno dimorfan način uticalo na smanjenje infiltracije patogenih ćelija u ciljni organ imunizovanih životinja. Naime, ova promena je bila izraženija kod pacova muškog pola i, verovatno, u velikoj meri je uticala na inverziju smera polnog dimorfizma u jačini (auto)imunskog odgovora u kičmenoj moždini ovih životinja, a time i na inverziju smera polnog dimorfizma u težini EAE-a u odnosu na mlade pacove.

Procenat reaktivisanih CD4+ T-ćelija u kićmenoj moždini na vrhuncu bolesti je bio veći kod mladih mućzjaka nego kod ženki pacova, za razliku od starih mućzjaka, kod kojih je procenat ovih ćelija bio manji nego kod ženki istog uzrasta. Ovi nalazi bi se, između ostalog, mogli povezati sa promenom odnosa reaktivisanih CD4+ T-limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija starenjem. Naime, suprotno nego kod starih mućzjaka pacova, taj odnos je bio manje povoljan u kićmenoj moždini mladih mućzjaka u poređenju sa odnosom ovih ćelija kod ženki pacova odgovarajućeg uzrasta. Inverziji smera polnog dimorfizma u odnosu broja reaktivisanih CD4+T-limfocita i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija kod starih pacova je verovatno doprinela starenjem uslovljena polno specifićna promena u zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u kićmenoj moždini ovih životinja. Naime, procenat ovih ćelija u suspenziji mononuklearnih ćelija iz kićmene moćdine mladih pacova se nije razlikovao između polova, dok je kod starih životinja, njihov procenat bio veći kod mućzjaka nego kod ženki istog uzrasta. Konaćno, starenjem je došlo do inverzije smera polnog dimorfizma u ekspresiji gena za proinflamatorne citokine i enzime, kako u limfocitima (IL-17), tako i u nelimfoidnim ćelijama (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS) kićmene moćdine pacova, tako da je ona bila veća kod mladih mućzjaka, a manja kod starih mućzjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta. Ova promena je, moguće, kao što je već rećeno, uticala da supresorska funkcija CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u kićmenoj moždini mladih mućzjaka pacova bude manja, a kod starih veća nego kod ženki odgovarajućeg uzrasta. Na osnovu svega prethodno iznetog, moglo bi se spekulisati da je starenje na polno dimorfan naćin uticalo na zastupljenost i efikasnost supresorske funkcije CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u ciljnom organu.

Poređenjem rezultata koji su prikazani u ovoj disertaciji, indirektno se moće zakljućiti da je starenjem došlo i do inverzije smera polnog dimorfizma u ekspresiji citokina koji su znaćajni za diferencijaciju Th17 limfocita (McGeachy i Cua, 2008; Chung i sar., 2009) u mononuklearnim ćelijama kićmene moćdine pacova. Naime, ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 u mononuklearnim ćelijama kićmene moćdine mladih mućzjaka je bila veća u odnosu na ženke pacova istog uzrasta. Ovaj nalaz je bio u saglasnosti sa većim procentom Th17 ćelija u okviru T-limfocita kićmene moćdine mladih mućzjaka, u poređenju sa ženkama pacova istog uzrasta.

Za razliku od toga, ekspresija iRNK za iste citokine je bila značajno manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova, što je dovelo do manje procentualne zastupljenosti Th17 ćelija u populaciji T-limfocita kičmene moždine ovih životinja u odnosu na ženke istog uzrasta. U prilog takvim nalazima ide i inverzija smera polnog dimorfizma u genskoj ekspresiji za IL-27, citokina za koji se smatra da suprimira diferencijaciju Th17 ćelija (Batten i sar., 2006; Stumhofer i sar., 2006). Naime, ekspresija gena za ovaj citokin je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki mladih pacova, dok je u istim ćelijama starih mužjaka pacova bila veća u odnosu na ženke tog uzrasta. Pored toga, starenje je dovelo i do inverzije smera polnog dimorfizma u ekspresiji iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Naime, ekspresija gena za ovaj citokin je u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka bila značajno veća nego u istim ćelijama ženki mladih pacova. Za razliku od toga, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova, ekspresija gena za ovaj citokin je bila daleko manja nego kod ženki pacova istog uzrasta. U skladu sa ovim nalazom, i zastupljenost izrazito patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji Th17 limfocita (Coddari i sar., 2013; Duhon i sar., 2013; McWilliams i sar., 2015) se menjala starenjem. Preciznije, procenat IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija je bio veći kod mladih mužjaka nego kod ženki pacova istog uzrasta, dok je procenat ovih ćelija bio manji kod starih mužjaka pacova nego kod teže obolelih ženki starih pacova. Na osnovu svega navedenog, moglo bi se zaključiti da starenje na polno specifičan način utiče na Th17 imunski odgovor u kičmenoj moždini DA pacova. Starenjem uslovljene kvantitativne i kvalitativne promene u Th17 imunskom odgovoru kod mužjaka pacova su dovele do inverzije smera polnog dimorfizma u ovom odgovoru u poređenju sa onim koji je pokazan kod mladih pacova. Ove promene su, izvesno, značajno uticale i na inverziju smera polnog dimorfizma u težini EAE-a kod starih životinja.

S druge strane, starenje nije uticalo na smer polnog dimorfizma u ekspresiji gena za IL-12/p35 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, koja je konzistentno bila manja kod mužjaka pacova, bez obzira na njihov uzrast. Sledstveno, i zastupljenost Th1 ćelija u okviru T-limfocita kičmene moždine (Prochazkova i sar., 2012), kao i sekrecija IFN- $\gamma$  u kulturama mononuklearnih

ćelija koje su bile restimulisane PMA-om i jonomicinom, je bila manja kod mužjaka pacova oba uzrasta. Ovi nalazi su u skladu sa podacima koji ukazuju da je IFN- $\gamma$  konstitutivno manje eksprimiran kod muškaraca u odnosu na žene (Zhang i sar., 2012), ali i da Th ćelije izolovane iz adultnih mužjaka glodara kod kojih je indukovana EAE, eksprimiraju manje IFN- $\gamma$  nego iste ćelije ženki (Cua i sar., 1995b; Bebo i sar., 1996; Voskuhl i sar., 1996; Bebo i sar., 1999b, Zhang i sar., 2012). Osim toga, podaci iz literature ukazuju i da se starenjem ekspresija ovog citokina smanjuje kod mužjaka glodara (Barrat i sar., 1997).

Analiza podataka dobijenih tokom izrade ove doktorske disertacije pokazuje da je starenje dovelo ne samo do polno specifičnih promena u fenotipu i funkciji CD4<sup>+</sup> limfocita specifičnih za neuroantigene, već i do fenotipskih i funkcijskih promena u nelimfoidnim (mijeloidnim) ćelijama. Zastupljenost različitih subpopulacija ćelija mijeloidne loze koje su izolovane iz kičmene moždine pacova, kao i stepen njihove aktivacije, su se takođe menjali starenjem na polno specifičan način. Naime, kod mladih mužjaka pacova, na vrhuncu bolesti, najveći udeo u populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija su imale CD45<sup>++</sup> ćelije, odnosno, kako je već navedeno, inflamatorni makrofagi/dendritske ćelije monocitnog porekla, čiji su prekursori iz periferne krvi transmigrirali u kičmenu moždinu. Za razliku od mladih, kod starih pacova, CD45<sup>-</sup> ćelije (ćelije neaktivisane mikroglije) su bile najzastupljenije u okviru CD11b<sup>+</sup> populacije, dok je procenat CD45<sup>++</sup> ćelija je bio veoma mali kod životinja oba pola. Ovi podaci sugerišu da je starenje na polno specifičan način uticalo na zastupljenost proinflamatornih mijeloidnih ćelija u kičmenoj moždini pacova. Drugim rečima, starenjem je došlo do drastičnijeg smanjenja infiltracije inflamatornih monocita u kičmenu moždinu pacova muškog pola, koji su, kako je ranije objašnjeno, posebno važni za inicijalnu reaktivaciju infiltrirajućih CD4<sup>+</sup> limfocita i otpočinjanje neuroinflamatornog procesa (Croxford i sar., 2015a). Pored toga, iz iznetih podataka sledi da je starenjem došlo do inverzije polnog dimorfizma i u stepenu aktivacije mijeloidnih ćelija. Naime, CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelije (aktivisane ćelije mikroglije) i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> ćelije (uglavnom inflamatorni makrofagi i dendritske ćelije monocitnog porekla), sudeći prema površinskoj gustini ekspresije molekula CD45 i CD11b na ovim ćelijama, su bile jače aktivisane kod mladih mužjaka nego kod ženki pacova. Za razliku od toga, sudeći na osnovu



istih parametara, aktivacija ovih ćelija je bila slabija kod starih mužjaka nego kod ženki pacova istog uzrasta. Osim toga, procenat imunoregulatornih CD4<sup>+</sup> ćelija u okviru aktiviranih ćelija mikroglije (Almolda i sar., 2009) je kod mladih mužjaka bio drastično manji u poređenju sa ženka, dok je kod starih mužjaka pacova, procenat ovih ćelija bio veći u odnosu na ženke istog uzrasta. U korelaciji sa prethodno iznetim rezultatima je bila i inverzija smera polnog dimorfizma u ekspresiji iRNK za proinflamatorne, odnosno anti-inflamatorne/imunoregulatorne faktore u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine pacova. Naime, ekspresija iRNK za proinflamatorne citokine (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) i za enzim iNOS je bila veća, dok je ekspresija gena za imunoregulatorni citokin TGF- $\beta$  i enzim Arg-1 bila manja kod mladih mužjaka pacova, u poređenju sa ekspresijom istih faktora kod ženki odgovarajućeg uzrasta. S druge strane, ekspresija gena za IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i iNOS je bila manja, a za TGF- $\beta$  i Arg-1 veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova nego ženki istog uzrasta. Ovi nalazi bi, makar delimično, mogli da se povežu sa podacima koji ukazuju da, kod čoveka i glodara, starenjem dolazi do većeg smanjenja ekspresije nekih proinflamatornih medijatora (IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF i dr.) kod jedinki muškog pola, nego kod jedinki ženskog pola (Barrat i sar., 1997; Hirokawa i sar., 2013; Poveshchenko i sar., 2014). Svi navedeni podaci sugerišu da je kod pacova muškog pola, starenje dovelo do izraženijih promena i u mijeloidnim ćelijama koje učestvuju u patogenezi EAE-a, u poređenju sa pacovima ženskog pola. Izraženiji pad u infiltraciji inflamatornih monocita i aktivaciji ćelija mikroglije do kojeg je došlo starenjem, je izvesno uticao i na smanjenje reaktivacije neuroantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita kod mužjaka pacova. Osim toga, veće smanjenje procentualne zastupljenosti mijeloidnih ćelija sa proinflamatornim fenotipom kod mužjaka pacova je, najverovatnije, doprinelo i inverziji smera polnog dimorfizma u ekspresiji proinflamatornih medijatora, kako onih koji nespecifično učestvuju u neuroinflamatornom procesu, tako i onih koji su ključni za razvoj Th17 imunskog odgovora kod ovih životinja.

Konačno, na osnovu svega iznetog, može se zaključiti da je starenjem došlo do inverzije smera polnog dimorfizma u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mononuklearnih ćelija kičmene moždine (infiltracija patogenih ćelija sa periferije, reaktivacija neuroantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita i

diferencijacija Th17 limfocita, aktivacija CD11b+ ćelija i ekspresija proinflamatornih medijatora, zastupljenost imunoregulatornih ćelija mikroglije i ekspresija anti-inflamatornih/imunoregulatornih medijatora). Osim toga, starenjem je došlo do pojave polnog dimorfizma, koji nije uočen u ciljnom organu mladih životinja, u nekim drugim patogenetskim korelatima EAE-a (zastupljenost i, moguće, supresorska aktivnost CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija). Ove promene su pozitivno korelirale sa inverzijom smera polnog dimorfizma u težini neurološkog deficita EAE-a kod starih pacova. Imajući u vidu ovu korelaciju, moglo bi se zaključiti da su polno dimorfne promene u kičmenoj moždini koje nastaju starenjem, najverovatnije, odgovorne za inverziju smera polnog dimorfizma u težini EAE-a kod pacova DA soja. U skladu sa ovom tezom su podaci iz drugih studija koji ukazuju da ciljni organ značajno utiče na težinu EAE-a (Kawakami i sar., 2004), ali i drugih organ-specifičnih autoimunskih bolesti, uključujući i MS-u (Hill i sar., 2007).

Na kraju, rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na značaj bioloških razlika između polova, kao i na značaj uzrasta za patogenezu, a konsekvantno i terapiju autoimunskih bolesti. U onoj meri u kojoj se istraživanja na eksperimentalnim modelima mogu ekstrapolirati na čoveka, ova studija ukazuje na potrebu za dizajniranjem terapijskih strategija koje bi uzimale u obzir i pol i uzrast bolesnika. Pored toga, ona ukazuju na ćelijske i molekularne patogenetske, ali i protektivne mehanizme od značaja za razvoj bolesti, što bi moglo da bude važno za definisanje novih ciljnih molekula u terapiji MS-e, a moguće i drugih autoimunskih bolesti koje su posredovane CD4+ limfocitima.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, moguće je izvesti 3 grupe zaključaka.

### I grupa:

1. Inokulacija homogenata singene kičmene moždine mladim pacovima DA soja rezultuje manjom incidencom, a težom kliničkom slikom EAE-a kod mužjaka u odnosu na ženke.

2. Teža klinička slika EAE-a kod mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta je korelirala sa:

a) većim brojem mononuklearnih ćelija, većim brojem reaktivisanih CD4+ T-ćelija i nepovoljnijim odnosom broja CD134+CD4+TCR $\alpha$  $\beta$ + i CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelija u njihovoj kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti;

b) većom procentualnom zastupljenošću Th17 ćelija u okviru populacije T-limfocita i većim procentom visoko patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije Th17 limfocita u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti;

c) većom ekspresijom iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine na vrhuncu bolesti;

d) većim procentom CD11b+CD45<sup>++</sup> ćelija (proinflamatorni makrofagi/dendritske ćelije monocitnog porekla/jako aktivisane ćelije mikroglije) u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti, njihovom jačom aktivacijom i, sledstveno, većom sekrecijom proinflamatornih medijatora u kulturama mijeloidnih (CD11b+) ćelija kičmene moždine ovih životinja;

e) manjom ekspresijom iRNK za CXCL12 u tkivu kičmene moždine, i sledstveno, najverovatnije, efikasnijom transmigracijom CD4+ limfocita i proinflamatornih monocita u parenhim kičmene moždine, što se moglo povezati sa većim brojem infiltrisanih i reaktivisanih CD4+ T-ćelija koji je izolovan na vrhuncu bolesti, bez obzira na nalaze koji ukazuju na manje efikasno generisanje neuroantigen-specifičnih CD4+ T-ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u induktivnoj fazi bolesti.

## **II grupa:**

1. Inokulacija homogenata singene kičmene moždine starim pacovima DA soja rezultuje manjom incidencom i težinom kliničke slike EAE-a kod mužjaka u odnosu na ženke pacova.

2. Lakša klinička slika EAE-a kod starih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta je korelirala sa:

a) manjim brojem ukupnih mononuklearnih ćelija i manjim brojem reaktivisanih CD4<sup>+</sup> T-ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine na vrhuncu bolesti, najverovatnije kao posledica manje efikasnog generisanja neuroantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> T-ćelija u drenirajućem limfnom čvoru, a na šta ukazuje manja proliferacija CD4<sup>+</sup> limfocita u kulturi u odgovoru na stimulaciju MBP-om (najverovatnije usled veće zastupljenosti i veće supresorske aktivnosti regulatornih CD4<sup>+</sup> limfocita);

b) manjim procentom Th17 ćelija u okviru populacije T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu i manjom zastupljenošću visoko patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru ove subpopulacije limfocita na vrhuncu bolesti;

d) manjom ekspresijom iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine na vrhuncu bolesti;

e) manjom procentualnom zastupljenošću CD11b+CD45<sup>+</sup> ćelija (aktivisane ćelije mikroglije) u kičmenoj moždini, njihovom slabijom aktivacijom i manjom ekspresijom iRNK za proinflamatorne medijatore u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine.

## **III grupa:**

1. Starenje na polno dimorfan način utiče na kliničko ispoljavanje EAE-a, tako da je kod starih životinja, za razliku od mladih, neurološki deficit manje izražen kod mužjaka.

2. Starenjem uslovljene polno dimorfne promene u kliničkim manifestacijama EAE-a bi se mogle povezati sa njegovim polno dimorfnim uticajem na: infiltraciju i/ili reaktivaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenu/oj moždinu/i, razvoj Th17 imunskog odgovora u ovom organu, na infiltraciju proinflamatornih monocita u parenhim kičmene moždine i aktivaciju i fenotipski/funkcijski profil ćelija mikroglije.

## 7. LITERATURA

1. Adams, B., Dubois, A., Delbauve, S., Debock, I., Lhommé, F., Goldman, M., Flamand, V., 2011. Expansion of regulatory CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells after neonatal alloimmunization. *Clin Exp Immunol.* 163, 354-361.
2. Ahn, M., Yang, W., Kim, H., Jin, J.K., Moon, C., Shin, T., 2012. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1453, 77-86.
3. Ahmed, S.A., Hissong, B.D., Verthelyi, D., Donner, K., Becker, K., Karpuzoglu-Sahin, E., 1999. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ. Health Perspect.* 107(Suppl. 5), 681-686 .
4. Almolda, B., Costa, M., Montoya, M., González, B., Castellano, B., 2009. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J Neuroimmunol.* 209, 65-80.
5. Almolda, B., Gonzales, B., Castelano, B., 2011. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci.* 16(1), 1157-1171.
6. Aloisi F., De Simone R., Columba-Cabezas S., Levi G., 1999. Opposite effects of interferon- $\gamma$  and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities. *J Neurosci Res.* 56, 571-580.
7. Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G. A., Clementi, M., Chieco-Bianchi, L., 1995. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med.* 1(12), 1279-1283.
8. Andersson, A., Karlsson, J., 2004. Genetics of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 52(5), 316-325.
9. Andrew, D., Aspinall, R., 2002. Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp Gerontol.* 37, 455-463.
10. Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol.* 121, 531-551.
11. Arnold, A., 2009. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav.* 55(5), 570-578.

12. Arruvito, L., Giulianelli, S., Flores, A., Paladino, N., Barboza, M., Lanari, C., Fainboim, L., 2008. NK Cells Expressing a Progesterone Receptor Are Susceptible to Progesterone-Induced Apoptosis. *J Immunol.* 180(8), 5746-5753.
13. Aspinall, R., 2000. Longevity and the immune response. *Biogerontology.* 1(3), 273-278.
14. Aspinall, R., Del Giudice, G., Effros, R., Grubeck-Loebenstien, B., Sambhara, S., 2007. Challenges for vaccination in the elderly. *Immun Ageing.* 4(1), 9.
15. Avidan, N., Le Panse, R., Berrih-Aknin, S., Miller, A., 2014. Genetic basis of myasthenia gravis – A comprehensive review. *J Autoimmun.* 52, 146-153.
16. Badovinac, V., Boggiano, C., Trajković, V., Frey, A.B., Vujanović, N.L., Gold, D.P., Mostarica-Stojković, M., Vukmanović, S., 1998. Rat NKR-P1+ CD3+ T cells: selective proliferation in interleukin-2, diverse T-cell-receptor-Vbeta repertoire and polarized interferon-gamma expression. *Immunology* 95(1), 117-125.
17. Bailey, D., 1982. How pure are inbred strains of mice? *Immunol Today.* 3(8), 210-214.
18. Baker, D., Gerritsen, W., Rundle, J., Amor, S., 2011. Critical appraisal of animal models of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 17(6), 647-657.
19. Banchereau, J., Pascual, V., O'Garra, A., 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol.* 13(10), 925-931.
20. Barrat, F., Lesourd, B., Boulouis, H., Thibault, D., Vincent-Naulleau, S., Gjata, B., Louise, A., Neway, T., Pilet, C., 1997. Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing. *Clin Exp Immunol.* 109(3), 562-568.
21. Barrett, E.L., Richardson, D.S., 2011. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell.* 10, 913-921.
22. Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N., Danilenko, D., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., Ghilardi, N., 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol.* 7(9), 929-936.
23. Baxter, A.G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 7, 904-912.
24. Beagley, K.W., Gockel, C.M., 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 38(1), 13-22.

25. Bearoff, F., Case, L., Kremontsov, D., Wall, E., Saligrama, N., Blankenhorn, E., Teuscher, C., 2015. Identification of genetic determinants of the sexual dimorphism in CNS autoimmunity. *PLOS ONE*, 10(2), e0117993.
26. Bebo, B.F.Jr., Vandenbark, A.A., Offner, H., 1996. Male SJL mice do not relapse after induction of EAE with PLP 139-151. *J Neurosci Res.* 45(6), 680–689.
27. a) Bebo, B.F.Jr., Adlard, K., Schuster, J.C., Unsicker, L., Vandenbark, A.A., Offner, H., 1999. Gender differences in protection from EAE induced by oral tolerance with a peptide analogue of MBP-Ac1-11. *J Neurosci Res.* 55, 432-440.
28. b) Bebo, B.F.Jr., Schuster, J.C., Vandenbark, A.A., Offner, H., 1999. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol.* 162, 35–40.
29. Beeton, C., Garcia, A., Chandy, K., 2007. Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Vis Exp.* (5).
30. Ben-Nun, A., Ron, Y., Cohen, I.R., 1980. Spontaneous remission of autoimmune encephalomyelitis is inhibited by splenectomy, thymectomy or ageing. *Nature* 288, 389–390.
31. Benedict, R.H., Zivadinov, R., 2011. Risk factors for and management of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 7, 332–342.
32. Berczi, I., 1994. The role of the growth and lactogenic hormone family in immune function. *Neuroimmunomodulation.* 1(4), 201-216.
33. Bergman, R.K., Munoz, J.J., Portis, J.L., 1978. Vascular permeability changes in the central nervous system of rats with hyperacute experimental allergic encephalomyelitis induced with the aid of a substance from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 21(2), 627–637.
34. Besedovsky, H.O., del Ray, A., 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17(1), 64-102.
35. Bielekova, B., Sung, M., Kadom, N., Simon, R., McFarland, H., Martin, R., 2004. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol.* 172(6), 3893-3904.
36. Bilbo, S., Nelson, R., 2003. Sex differences in photoperiodic and stress-induced enhancement of immune function in Siberian hamsters. *Brain Behav Immun.* 17(6), 462-472.
37. Black, J., Liu, S., Carrithers, M., Carrithers, L., Waxman, S., 2007. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis after withdrawal of phenytoin and carbamazepine. *Ann Neurol.* 62(1), 21-33.

38. Blaževski, J., Petković, F., Momčilović, M., Jevtic, B., Miljković, D., Mostarica Stojković, M., 2013. High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology*. 218, 1192-1199.
39. Bottazzo, G., Todd, I., Mirakian, R., Belfiore, A., Pujol-Borrell, R., 1986. Organ-Specific Autoimmunity: A 1986 Overview. *Immunol Rev*. 94(1), 137-169.
40. Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M., Faas, M., 2004. Gender Difference in the Non-Specific and Specific Immune Response in Humans. *Am J Reprod Immunol*. 52(1), 19-26.
41. Bove, R., Healy, B., Augustine, A., Musallam, A., Gholipour, T., Chitnis, T., 2012. Effect of gender on late-onset multiple sclerosis. *Mult Scler*. 18(10), 1472-1479.
42. Bove, R., 2013. Autoimmune diseases and reproductive aging. *Clin Immunol*. 149(2), 251-264.
43. Bove, R., Chitnis, T., 2013. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol*. 149(2), 201-210.
44. Bove, R., Chitnis, T., 2014. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 20(5), 520-526.
45. Bulati, M., Pellicanò, M., Vasto, S., & Colonna-Romano, G., 2008. Understanding ageing: Biomedical and bioengineering approaches, the immunologic view. *Immun Ageing*, 5(1), 9.
46. Butterfield, R., Sudweeks, J., Blankenhorn, E., Korngold, R., Marini, J., Todd, J., Randall, J.R., Teuscher, C., 1998. New genetic loci that control susceptibility and symptoms of experimental allergic encephalomyelitis in inbred mice. *J Immunol*. 161(4), 1860-1867.
47. Buyon, J., 1998. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 63(3), 281-287.
48. Calabrese, L., Kleiner, S., Barna, B., Skibinski, C., Kirkendall, D., Lahita, R., Lombardo, J., 1989. The effects of anabolic steroids and strength training on the human immune response. *Med Sci Sports Exerc*. 21(4), 386-392.
49. Campisi, J., 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*. 11(11), S27-S31.
50. Canto-Cetina, T., Cetina-Manzanilla, J., 2007. Oral contraceptives and autoimmune diseases. *Curr Womens Health Rev*. 3(2), 139-144.



51. Cao, Y., Goods, B., Raddassi, K., Nepom, G., Kwok, W., Love, J., Hafler, D., 2015. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 7(287), 287ra74-287ra74.
52. Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., Peña-Rossi, C., 2003. CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 145(1-2), 1-11.
53. Carnegie, P.R., 1971. Properties, structure and possible neuroreceptor role of the encephalitogenic protein of human brain, *Nature.* 229(5279), 25-28.
54. Carreras, E., Turner, S., Frank, M.B., Knowlton, N., Osban, J., Centola, M., Park, C.G., Simmons, A., Alberola-Ila, J., Kovats, S., 2009. Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4. *Blood.* 115(2), 238-246.
55. Carrieri, P. B., Provitera, V., de Rosa, T., Tartaglia, G., Gorga, F., Perrella, O., 1998. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 3(20), 373-382.
56. Caruso, D., D'Intino, G., Giatti, S., Maschi, O., Pesaresi, M., Calabrese, D., Garcia-Segura, L.M., Calza, L., Melcangi, R.C., 2010. Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem.* 114, 921-932.
57. Caruso, C., Accardi, G., Virruso, C., Candore, G., 2013. Sex, gender and immunosenescence: a key to understand the different lifespan between men and women? *Immun Ageing.* 10(1), 20.
58. Celius, E., Harbo, H., Egeland, T., Vartdal, F., Vandvik, B., Spurkiand, A., 2000. Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 178(2), 132-135.
59. Chitnis, T., Weiner, H., 2011. Multiple sclerosis in the elderly. In: Knoefel, J.E. (Ed), *Clinical Neurology of Aging* (pp. 535-543). USA: Oxford University Press.
60. Christianson, M., Mensah, V., Shen, W., 2015. Multiple sclerosis at menopause: Potential neuroprotective effects of estrogen. *Maturitas.* 80(2), 133-139.
61. Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C., 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 30, 576-587.

62. Čičin-Šain, L., Messaoudi, I., Park, B., Currier, N., Planer, S., Fischer, M., Tackitt, S., Nikolich-Žugich, D., Legasse, A., Axthelm, K.A., Picker, J.L., Mori, M., Nikolich-Žugich, J., 2007. Dramatic increase in naive T cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(50), 19960-19965.
63. Cikota, B., Janezic, A., Magic, Z., 2002. Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze. *Vojnosanit Pregl*. 59(5), 551-556.
64. Clark, R., 1997. The Somatogenic Hormones and Insulin-Like Growth Factor-1: Stimulators of Lymphopoiesis and Immune Function. *Endocrine Rev*. 18(2), 157-179.
65. Codarri, L., Gyölvéssi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., & Magnenat, L., Suter, T., Becher, B., 2011. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 12(6), 560-567.
66. Columba-Cabezas, S., Iaffaldano, G., Chiarotti, F., Alleva, E., Cirulli, F., 2009. Early handling increases susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 male mice. *J Neuroimmunol*. 212, 10–16.
67. Confavreux, C., Vukusic, S., Adeleine, P., 2003. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: anamnestic process. *Brain*. 126(Pt 4), 770–782.
68. Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 164, 1079-1106.
69. Corthay, A., 2009. How do Regulatory T Cells Work?. *Scan J Immunol*. 70(4), 326-336.
70. a) Croxford, A., Lanzinger, M., Hartmann, F., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B., Jung, S., Greter, M., Becher, B., 2015. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2<sup>+</sup> Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*. 43(3), 502-514.
71. b) Croxford, A., Spath, S., Becher, B., 2015. GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trends Immunol*. 36(10), 651-662.
72. a) Cua, D.J., Hinton, D.R., Stohlman, S.A., 1995. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice: Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol*. 155, 4052–4059.
73. b) Cua, D.J., Hinton, D.R., Stohlman, S.A., 1995. Self-antigen-induced Th1 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. *J Immunol*. 155, 4052–4059.

74. Cunningham, M., Gilkeson, G., 2010. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 40(1), 66-73.
75. Curotto de Lafaille, M., Lafaille, J., 2009. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 30(5), 626-635.
76. Cutolo, M., Sulli, A., Seriola, B., Accardo, S., Masi, A.T., 1995. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 13(2), 217-226.
77. Czaja, A., Donaldson, P., 2002. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol.* 97(8), 2051-2057.
78. Dai, R., Ahmed, S.A., 2014. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Ther Clin Risk Manag.* 10, 151-163.
79. Dalal, M.S., Kim, S., Voskuhl, R.R., 1997. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol.* 159, 3-6.
80. Damsker, J.M., Hansen, A.M., Caspi, R.R., 2010. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann NY Acad Sci.* 1183, 211-221.
81. Das, B., Bhanushali, A., Khadapkar, R., Jeswani, K., Bhavsar, M., Dasgupta, A., 2008. Reference ranges for lymphocyte subsets in adults from western India: Influence of sex, age and method of enumeration. *Indian J Med Sci.* 62(10), 397.
82. Davies, T., 1990. The complex role of epithelial cell MHC class II antigen expression in autoimmune endocrine disease. *Autoimmunity.* 8(2), 87-89.
83. Davies, W., Wilkinson, L., 2006. It is not all hormones: Alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Res.* 1126(1), 36-45.
84. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A., 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 34, 2480-2488.
85. Dendrou, C., Fugger, L., Friese, M., 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 15(9), 545-558.
86. Denic, A., Johnson, A., Bieber, A., Warrington, A., Rodriguez, M., Pirko, I., 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology.* 18(1), 21-29.
87. de Waal Malefyt, R., Abrams, R., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an

autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174(5), 1209-1220.

88. Diehl, S., Anguita, J., Hoffmeyer, A., Zapton, T., Ihle, J.N., Fikrig, E., Rincón, M., 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity.* 13, 805-815.

89. Di Rosa, F., Serafini, B., Scognamiglio, P., Di Virgilio, A., Finocchi, L., Aloisi, F., Barnaba, V., 2000. Short-lived immunization site inflammation in self-limited active experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol.* 12, 711-719.

90. Ditamo, Y., Degano, A.L., Maccio, D.R., Pistoiresi-Palencia, M.C., Roth, G.A., 2005. Age related changes in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol.* 83(1), 75-82.

91. Djikić, J., Nacka-Aleksić, M., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Bufan, B., Kosec, D., Dimitrijević, M., Leposavić, G., 2014. Age-associated changes in rat immune system: Lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Gerontol.* 58, 179-197.

92. Djikić, J., Nacka-Aleksić, M., Pilipović, I., Kosec, D., Arsenović-Ranin, N., Stojić-Vukanić, Z., Dimitrijević, M., Leposavić, G., 2015. Age-related changes in spleen of Dark Agouti rats immunized for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 278, 123-135.

93. Donnelly, D.J., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., van Rooijen, N., Popovich, P.G., 2009. An efficient and reproducible method for quantifying macrophages in different experimental models of central nervous system pathology. *J Neurosci Methods.* 181, 36-44.

94. Du, L., Bayir, H., Lai, Y., Zhang, X., Kochanek, P.M., Watkins, S.C., Graham, S.H., Clark, R.S., 2004. Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. *J Biol Chem.* 279(37), 38563-38570.

95. Duhon, R., Glatigny, S., Arbelaez, C., Blair, T., Oukka, M., Bettelli, E., 2013. Cutting Edge: The Pathogenicity of IFN- $\gamma$ -Producing Th17 Cells Is Independent of T-bet. *J Immunol.* 190(9), 4478-4482.

96. Dunn, S.E., Ousman, S.S., Sobel, R.A., Zuniga, L., Baranzini, S.E., Youssef, S., Crowell, A., Loh, J., Oksenberg, J., Steinman, L., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med.* 204(2), 321-330.

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

98. El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., Rostami, A., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 12, 568-575.
99. Ellegren, H., Parsch, J., 2007. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet.* 8(9), 689-698.
100. Ellis, J.A., Kemp, A.S., Ponsonby, A.L., 2014. Gene–environment interaction in autoimmune disease. *Expert Rev Mol Med.* 16, e4.
101. Encinas, J.A., Lees, M.B., Sobel, R.A., Symonowicz, C., Greer, J.M., Shovlin, C.L., Weiner, H.L, Seidman, C.E., Seidman, J.G., Kuchroo, V.K., 1996. Genetic analysis of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in a cross between SJL/J and B10.S mice. *J Immunol.* 157, 2186–2192.
102. Encinas, A.J., Lees, B.M., Sobel, A. R., Symonowicz, C., Weiner, L. H., Seidman, E. C., Seidman, J. G., Kuchroo, K. V., 2001. Identification of genetic loci associated with paralysis, inflammation and weight loss in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol.* 13 (3), 257-264.
103. Endoh M, Rapoport SI, Tabira T., 1990. Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice. *J Neuroimmunol.* 29(1-3), 21–31.
104. England, J., Bain, B., 1976. Total and differential leucocyte count. *British J Haematol.* 33(1), 1-7.
105. Ephrem, A., Chamat, S., Miquel, C., Fisson, S., Mouthon, L., Caligiuri, G., Delignat, S., Elluru, S., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Cohen, J.L., Salomon, B.L., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., Misra, N., 2008. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 111, 715-722.
106. Epplen, C., Jäckel, S., Santos, E., D'Souza, M., Poehlau, D., & Dotzauer, B., Sindern, E., Haupts, J., Rüdte, K.P., Weber, F., Stöver, J., Poser, S., Gehler, W., Malin, J.P., Przuntek, H., Epplen, J.T., 1997. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol.* 41(3), 341-352.
107. Ferrari, C.C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A.M., Pitossi, F.J., 2006. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis.* 1(24), 183–193.
108. Fairweather, D.L., Frisancho-Kiss, S., Rose, R. N., 2008. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol.* 173(3), 600–609.

109. Feldmann, M., Brennan, F., Maini, R., 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 85(3), 307-310.
110. Fillmore, P.D., Blankenhorn, E.P., Zachary, J.F., Teuscher, C., 2004. Adult gonadal hormones selectively regulate sexually dimorphic quantitative traits observed in experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 164, 167-175.
111. Fish, E., 2008. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 8(9), 737-744.
112. Fitzgerald, D.C, Ciric, B., Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Das Sarma, J., Gran, B., Zhang, G.X.; Rostami, A., 2007. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 179(5), 3268-3275.
113. Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H., Wekerle, H., 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 14, 547-560.
114. Flynn, A., 1986. Expression of Ia and the production of interleukin-1 by peritoneal exudate macrophages activated in vivo by steroids. *Life Sci*. 38, 2455-2460.
115. Fontenot, J., Rasmussen, J., Williams, L., Dooley, J., Farr, A., Rudensky, A., 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 22(3), 329-341.
116. Franklin, G., Nelson, L., 2003. Environmental risk factors in multiple sclerosis: Causes, triggers, and patient autonomy. *Neurology*, 61(8), 1032-1034.
117. Friese M. A., Schattling B., Fugger L., 2014. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 10, 225-238.
118. Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A., Marti, A., Caggiula, M., Mirabella, M., Tonali, A.P., Batocchi, A.P., 2008. IL17 and IFN $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine*. 44(1), 22-25.
119. Fritz, R.B, McFarlin, D.E., 1989. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein. *Chem Immunol*. 46, 101-125.
120. Fujii, H., Nawa, Y., Tsuchiya, H., Matsuno, K., Fukumoto, T., Fukuda, S., Kotani, M., 1975. Effect of a single administration of testosterone on the immune response and lymphoid tissues in mice. *Cell Immunol*. 20(2), 315-326.

121. Fülöp, T., Gagné, D., Goulet, A., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., Dupuis, G., 1999. Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp Gerontol.* 34(2), 197-216.
122. Furman, D., 2015. Sexual dimorphism in immunity: improving our understanding of vaccine immune responses in men. *Exp Rev Vaccines.* 14(3), 461-471.
123. Furman, D., Hejblum, B., Simon, N., Jojic, V., Dekker, C., Thiebaut, R., Tibshirani, R.J., Davis, M.M., 2013. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(2), 869-874.
124. Gameiro, C., Romão, F., Castelo-Branco, C., 2010. Menopause and aging: Changes in the immune system—A review. *Maturitas.* 67(4), 316-320.
125. Gao, Z., Tsirka, S., 2011. Animal models of MS reveal multiple roles of microglia in disease pathogenesis. *Neurol Res Int.* 2011, 1-9.
126. Garcia, G.G., Miller, R.A., 2002. Age-dependent defects in TCR triggered cytoskeletal rearrangement in CD4+ T cells. *J Immunol.* 169(9), 5021–5027.
127. Garcia-Duran, M., de Frutos, T., Diaz-Recasens, J., Garcia-Galvez, G., Jimenez, A., Monton, M., Farre, J., de Miguel, L.S., Gonzales-Ferandez, F., Arreiro, M.D.M., Rico, L., Garcia, R., Casado, S., Lopez-Farre, A., 1999. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circul Res.* 85(11), 1020-1026.
128. García Verdecia, B., Saavedra Hernández, D., Lorenzo-Luaces, P., Badía Alvarez, T., Leonard Rupalé, I., Mazorra Herrera, Z., Crombet Ramos, T., Lage Dávila, A., 2013. Immunosenescence and gender: a study in healthy Cubans. *Immun Ageing.* 10(1), 16.
129. Gatson, N., Williams, J., Powell, N., McClain, M., Hennon, T., Robbins, P., Whitacre, C., 2011. Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors. *J Neuroimmunol.* 230(1-2), 105-113.
130. Gavazzi, G., Krause, K., 2002. Ageing and infection. *Lancet Infect Dis.* 2(11), 659-666.
131. Ghezzi, A., 2010. Therapeutic strategies in childhood multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 3(4), 217-228.
132. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y.,

Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W., O'Shea, J.J., 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature*. 467, 967-971.

133. Giatti, S., D'Intino, G., Maschi, O., Pesaresi, M., Garcia-Segura, L., Calza, L., Caruso, D., Melcangi, R., 2010. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. *Neurochem Int*. 56(1), 118-127.

134. Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., Grubeck-Loebenstien, B., 2015. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 14(3), 309-321.

135. Goetzl, E., Huang, M.C., Kon, J., Patel, K., Schwartz, J.B, Fast, K., Ferrucci, L., Madara, K., Taub, D.D., Longo, D.L., 2010. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. *FASEB J*. 24(9), 3580-3589.

136. González, H., Pacheco, R., 2014. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases, *J Neuroinflammation*. 11(1), 201.

137. González, H., Elgueta, D., Montoya, A., Pacheco, R., 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. 274(1-2), 1-13.

138. Goronzy, J., Weyand, C., 2003. Ageing, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity – catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 5(5), 225.

139. Goronzy, J., Weyand, C., 2012. Immune aging and autoimmunity. *Cell Mol Life Sci*. 69(10), 1615-1623.

140. Goronzy, J., Weyand, C., 2013. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol*. 14(5), 428-436.

141. Goverman, J., 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 9(6), 393-407.

142. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., Croft, M., 1998. OX40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol*. 161, 6510-6517.

143. Gregg, R., Smith, C.M., Clark, F.J., Dunnion, D., Khan, N., Chakraverty, R., Nayak, L., Moss, P.A., 2005. The number of human peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol*. 140, 540-546



144. Griffin, A., Whitacre, C., 1991. Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 35(1-3), 53-64.
145. Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., Diamond, B., 2002. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest.* 109(12), 1625-1633.
146. Gu, Y., Yang, J., Ouyang, X., Liu, W., Li, H., Yang, J., Bromberg, J., Chen, S.H., Mayer, L., Unkeless, J.C., Xiong, H., 2008. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol.* 38, 1807-1813.
147. Gültner, S., Kuhlmann, T., Hesse, A., Weber, J., Riemer, C., Baier, M., Hutloff, A., 2010. Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE. *Eur J Immunol.* 40(12), 3403-3412.
148. Hakim, F.T., Flomerfelt, F.A., Boyiadzis, M., Gress, R.E., 2004. Aging, immunity, and cancer. *Curr Opin Immunol.* 16, 151-156.
149. Handunnetthi, L., Ramagopalan, S., Ebers, G., 2010. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1\*15. *Neurology*, 74(23), 1905-1910.
150. Harkioliaki, M., Holmes, S., Svendsen, P., Gregersen, J., Jensen, L., McMahon, R., Friese, M.A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J.S., Kranc, K., Sainsbury, S., Harlos, K., Mellins, E.D., Palace, J., Esiri, M.M., van der Merwe, P.A., Jones, E.Y., Fugger, L., 2009. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity.* 30(4), 610.
151. Harpaz, I., Abutbul, S., Nemirovsky, A., Gal, R., Cohen, H., Monsonego, A., 2012. Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: Glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol.* 43(3), 758-769.
152. Hartmann, F., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., Gran, B., Piehl, F., Olsson, T., Coddarri, L., Becher, B., 2014. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature Comm.* 5, 5056.
153. Hasler, P., Zouali, M., 2003. Subversion of immune receptor signaling by infectious agents. *Genes Immun.* 4(2), 95-103.
154. Hasler, P., Zouali, M., 2005. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol.* 233(2), 102-108.
155. Hawkins, S., McDonnell, G., 1999. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 67(2), 148-152.

156. Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 14, 463–477.
157. Hewagama, A., Patel, D., Yarlagadda, S., Strickland, F.M., Richardson, B.C., 2009. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun.* 10, 509–516.
158. Hill, J., Welch, W., Faris, H., Anderson, D., 1990. Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: A potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 162(2), 534-540.
159. Hill, N., Hultcrantz, M., Sarvetnick, N., Flodström-Tullberg, M., 2007. The target tissue in autoimmunity – an influential niche. *E J Immunol.* 37(3), 589-597.
160. Hirokawa, K., Utsuyama, M., Hayashi, Y., Kitagawa, M., Makinodan, T., Fülop, T., 2013. Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. *Immun Ageing.* 10, 19.
161. Ho, H.N., Wu, M.Y., Chen, H.F., Chao, K.H., Yang, Y.S., Huang, S.C., Lee, T.Y., Gill 3rd, T.J., 1995. In vivo CD3+CD25+ lymphocyte subpopulation is down-regulated without increased serum-soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) by gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a). *Am J Reprod Immunol.* 33, 134–139.
162. Holmqvist, P., Wallberg, M., Hammar, M., Landtblom, A., Brynhildsen, J., 2006. Symptoms of multiple sclerosis in women in relation to sex steroid exposure. *Maturitas.* 54(2), 149-153.
163. Hong, M., Zhu, Q., 2004. Macrophages are activated by 17 $\beta$ -estradiol: possible permission role in endometriosis. *Exp Toxicol Pathol.* 55(5), 385-391.
164. Howell, O., Reeves, C., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S.M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., Reynolds, R., 2011. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 134(9), 2755-2771.
165. Hughes, G., 2012. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimm Rev.* 11(6-7), A502-A514.
166. Ivanova, E., Kyurkchiev, D., Altankova, I., Dimitrov, J., Binakova, E., Kyurkchiev, S., 2005. CD83+ Monocyte-derived dendritic cells are present in human decidua and progesterone induces their differentiation in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 53(4), 199-205.
167. Jackson, M., Spiers, S., McArdle, A., 2001. Adaptation to oxidative stress in ageing. *Biofactors.* 15(2-4), 121-122.

168. Jäger, A., Kuchroo, V., 2010. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. *Scan J Immunol.* 72(3), 173-184.
169. Jones, T.B., Ankeny, P.D., Guan, Y., McGaughy, V., Fisher, L.C., Basso, D.M., Popovich, G.P., 2004. Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci.* 24(15), 3752–3761.
170. Jones, L., Anthony, J., Henriquez, F., Lyons, R., Nickdel, M., Carter, K., Alexander, J., Roberts, C.W., 2008. Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology.* 125(1), 59-69.
171. Josefowicz, S., Rudensky, A., 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 30(5), 616-625.
172. June, C., Ledbetter, J., Linsley, P., Thompson, C., 1990. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today.* 11, 211-216.
173. Jung-Testas, I., Baulieu, E., 1998. Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65(1-6), 243-251.
174. Kakalacheva, K., Münz, C., Lünemann, J., 2011. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1812(2), 132-140.
175. Källén, B., Nilsson, O., 1989. Age as a factor determining susceptibility for experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 90, 16–19.
176. Kallen, B., Logdberg, L., 1982. Low susceptibility to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in a substrain of the otherwise susceptible Lewis rat. *Eur J Immunol.* 12, 596-599.
177. Kamath, A., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., 1998. Characterization of phenotypic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thymocytes in vivo and its effect on apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 150(1), 117-124.
178. Karin, N., 2010. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol.* 88(3), 463-473.
179. Karpuzoglu-Sahin, E., Hissong, B., Ansar Ahmed, S., 2001. Interferon- $\gamma$  levels are upregulated by 17- $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol. *J Reprod Immunol.* 52(1-2), 113-127.

180. Katsnelson, A., 2012. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Multiple sclerosis discovery forum. <http://www.msdiscovery.org> doi/10.7493/msdf.10.3674.1
181. Kang, I., Hong, M.S., Nolasco, H., Park, S.H., Dan, J.M., Choi, J.Y., Craft, J., 2004. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol.* 173, 673-681.
182. Kaufmann, U., Diedrichs-Möhring, M., Wildner, G., 2012. Dynamics of intraocular IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis. *PLoS One.* 7, e49008.
183. Kawakami, N., Lassmann, S., Li, Z., Odoardi, F., Ritter, T., Ziemssen, T., Klinkert, W.E., Ellwart, J.W., Bradl, M., Krivacic, K., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., Volk, H.D., Wekerle, H., Linington, C., Flügel, A., 2004. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 199, 185-197.
184. Kim, S., Moon, C., Wie, M.B., Kim, H., Tanuma, N., Matsumoto, Y., Shin, T., 2000. Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis. *J Vet Sci.* 1, 11-17.
185. Kis, B., Rumberg, B., Berlit, P., 2008. Clinical characteristics of patients with late-onset multiple sclerosis. *J Neurol.* 255(5), 697-702.
186. Kissick, H., Sanda, M., Dunn, L., Pellegrini, K., On, S., Noel, J., Arredouani, M., 2014. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Nat Acad Sci.* 111(27), 9887-9892.
187. Ko, H., Brady, J., Ryg-Cornejo, V., Hansen, D., Vremec, D., Shortman, K., Zhan, Y., Lew, A.M., 2014. GM-CSF-Responsive Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Pivotal in Th17 Pathogenesis. *J Immunol.* 192(5), 2202-2209.
188. Kohut, M.L., Senchina, D.S., 2004. Reversing age-associated immunosenescence via exercise. *Exerc Immunol Rev.* 10, 6-41.
189. Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G., Kontoyiannis, D., 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev.* 169(1), 175-194.
190. Komi J. i Lassila, O., 2000. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 95(9), 2875-2882.
191. Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Bäckström, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfenning, K.W., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007.

Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 13(4), 423–431.

192. Kovats, S., Carreras, E., Agrawal, H., 2010. Sex Steroid Receptors in Immune Cells. In: Klein, S.L., Roberts, C.W. (Eds), *Sex Hormones And Immunity To Infection* (p. 53-92). Berlin: Springer-Verlag.

193. Kramer, J.M., Gaffen, S.L., 2007. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol.* 78(6), 1083-1093.

194. Kremmentsov, D., Teuscher, C., 2013. Environmental factors acting during development to influence MS risk: insights from animal studies. *Mult Scler J.* 19(13), 1684-1689.

195. Kremmentsov, D., Wall, E., Martin, R., Subramanian, M., Noubade, R., Rio, R., Mawe, G., Bond, P., Poynter, M., Blankenhorn, E., Teuscher, C., 2013. Histamine H3 receptor integrates peripheral inflammatory signals in the neurogenic control of immune responses and autoimmune disease susceptibility. *Plos ONE.* 8(7), e62743.

196. Kremmentsov, D., Noubade, R., Dragon, J., Otsu, K., Rincon, M., Teuscher, C., 2014. Sex-specific control of central nervous system autoimmunity by p38 mitogen-activated protein kinase signaling in myeloid cells. *Ann Neurol.* 75(1), 50-66.

197. Krishnamoorthy, G., Wekerle, H., 2009. EAE: An immunologist's magic eye. *Eur J Immunol.* 39(8), 2031-2035.

198. Ku, L.T., Gercel-Taylor, C., Nakajima, S.T., Taylor, D.D., 2009. Alterations of T cell activation signalling and cytokine production by postmenopausal estrogen levels. *Immun. Ageing.* 6, 1.

199. Kumru, S., Godekmerdan, A., Yilmaz, B., 2004. Immune effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy in peri-menopausal women. *J Reprod Immunol.* 63(1), 31–38.

200. Kurschus, F., 2015. T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomed J.* 38(3), 183.

201. Kuusisto, H., Kaprio, J., Kinnunen, E., Luukkaala, T., Koskenvuo, M., Elovaara, I., 2008. Concordance and heritability of multiple sclerosis in Finland: study on a nationwide series of twins. *Eur J Neurol.: Off J Eur Fed Neurol Soc.* 15, 1106–1110.

202. Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., Inoue, M., 1999. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 59, 5917-5921.

203. Lages, C.S., Suffia, I., Velilla, P.A., Huang, B., Warshaw, G., Hildeman, D.A., Belkaid, Y., Chougnet, C., 2008. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol.* 181, 1835-1848.
204. Lamason, R., Zhao, P., Rawat, R., Davis, A., Hall, J., Chae, J., Agarwal, R., Cohen, P., Rosen, A., Hoffman, E, Nagaraju, K., 2006. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol.* 7(1), 2.
205. Lambert, J.J., Belelli, D., Peden, D.R., Vardy, A.W., Peters, J.A., 2003. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol.* 71, 67-80.
206. Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T, Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 201, 233-240.
207. Lauer, K., 2010. Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 10, 421-440.
208. Ledeboer, A., Breve, J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A., Leysen, J., Tilders F.J., Van Dam, A.M., 2002. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci.* 16(7), 1175-1185.
209. Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., Weaver, C.T., 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity.* 30, 92-107.
210. Lélou, K., Delpy, L., Robert, V., Foulon, E., Laffont, S., Pelletier, L., Engelhardt, B., Guéry J-C., 2010. Endogenous estrogens, through estrogen receptor  $\alpha$ , constrain autoimmune inflammation in female mice by limiting CD4<sup>+</sup> T-cell homing into the CNS. *Eur J Immunol.* 40(12), 3489-3498.
211. Lerner, A., Yamada, T., Miller, R., 1989. Pgp-1hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. *Eur J Immunol.* 19(6), 977-982.
212. Lerner, A., Jeremias, P., Matthias, T., 2015. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Disease.* 3(4), 151-155.
213. Levine, S., Sowinski, R., 1976. Experimental allergic encephalomyelitis in aged F344 rats. *J Gerontol.* 31, 271-274.

214. Li, Z.G., Danis, V.A., Brooks, P.M., 1993. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol.* 11(2), 157-162.
215. Li, W., Penderis, J., Zhao, C., Schumacher, M., Franklin, R., 2006. Females remyelinate more efficiently than males following demyelination in the aged but not young adult CNS. *Exp Neurol.* 202(1), 250-254.
216. Liang, J., Sun, L., Wang, Q., Hou, Y., 2006. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. *Int Immunopharmacol.* 6(5), 830-838.
217. Lin, T., Lustig, R.H., Chang, C.F., 1996. The role of androgens-androgen receptor in immune system activity. In: Marsh, J.A., Kendall, M.D. (Eds), *The physiology of immunity* (pp 263-276). New York: CRC Press.
218. Lindstrom, T., Robinson, W., 2010. Rheumatoid arthritis: A role for immunosenescence? *J Am Geriatr Soc.* 58(8), 1565-1575.
219. Liva, S., Voskuhl, R., 2001. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol.* 167(4), 2060-2067.
220. Liu, J., Zhao, M., Brosnan, C., Lee, S., 2001. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Multiple Sclerosis Lesions. *Am J Pathol.* 158(6), 2057-2066.
221. Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, J.T., Eccles, D.J., Rouhani, J.S., Peske J.D., Derecki, C.N., Castle, D., Mandell, W.J., Lee, S.K., Harris, H.T., Kipnis, J., 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 523(7560), 337-341.
222. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., de Sauvage, F., 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(25), 15047-15052.
223. Luchetti, S., van Eden, C., Schuurman, K., van Strien, M., Swaab, D., Huitinga, I., 2014. Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in male and progesterone signaling in female lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 73(2), 123-135.
224. Lund, T., 2006. The Androgen 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone and Its Metabolite 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -Diol Inhibit the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Response to Stress by Acting through Estrogen Receptor  $\beta$ -Expressing Neurons in the Hypothalamus. *J Neurosci.* 26(5), 1448-1456.

225. Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol.* 167, 5004-5010.
226. Majdinasab, N., Hosseini Behbahani, M., Galehdari, H., Mohaghegh, M., 2014. Association of interleukin 7 receptor gene polymorphism rs6897932 with multiple sclerosis patients in Khuzestan Iran. *J Neurol.* 13(3), 168–171.
227. Man, S., Tucky, B., Coteleur, A., Drazba, J., Takeshita, Y., Ransohoff, R., 2012. CXCL12-Induced Monocyte-Endothelial Interactions Promote Lymphocyte Transmigration Across an in Vitro Blood-Brain Barrier. *Sci Transl Med.* 4(119), 119ra14-119ra14.
228. Mannie, M., Swanborg, R., Stepaniak, J.A, 2009. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Rat. *Curr Protoc Immunol.* Ch. 15, Unit 15.2.
229. Manwani, B., McCullough, L., 2011. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens Health (Lond Engl).* 7(3), 319-339.
230. Mars, L.T., Gautron, A.S., Novak, J., Beaudoin, L., Diana, J., Liblau, R.S., Lehuen, A., 2008. Invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis and infiltrate the central nervous system in a CD1d-independent manner. *J Immunol.* 181, 2321-2329.
231. Martin, R., McFarland, H., Boggs, J., 1995. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 32(2), 121-182.
232. Massella, A., D'Intino, G., Fernández, M., Sivilia, S., Lorenzini, L., Giatti, S., Melcangi, R.C., Calzà, L., Giardino, L., 2012. Gender effect on neurodegeneration and myelin markers in an animal model for multiple sclerosis. *BMC Neurosci.* 13, 12.
233. Matejuk, A., Hopke, C., Vandenbark, A.A., Hurn, P.D., Offner, H., 2005. Middle-aged male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J Immunol.* 174, 2387–2395.
234. McCandless, E.E., Wang, Q., Woerner, B.M., Harper, J.M., Klein, R.S., 2006. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 177, 8053-8064.
235. McCombe, P.A., Greer, J.M., Mackay, I.R., 2009. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 9(9), 1058-1079.
236. McCombe, P.A., Greer, J.M., 2013. Female reproductive issues in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 19(4), 392–402.



237. McEwen, B., 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci.* 12, 141-147.
238. McFarland, H.F., Martin, R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 8, 913-919.
239. McGeachy, M., Stephens, L., Anderton, S., 2005. Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ Regulatory Cells within the Central Nervous System. *J Immunol.* 175(5), 3025-3032.
240. McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., Cua, D.J., 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 8, 1390-1397.
241. McGeachy, M.J., Cua, D.J., 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 28, 445-453.
242. McKean, K.A., Nunney, L., 2005. Bateman's principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 59, 1510-1517.
243. McWilliams, I., Rajbhandari, R., Nozell, S., Benveniste, E., Harrington, L., 2015. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. *J Neuroinflammation.* 12(1), 128.
244. Melcangi, R.C., Panzica, G.C., 2006. Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience* 138, 733-739.
245. Mendelsohn, M.E., Karas, R.H., 2005. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science.* 308, 1583-1587.
246. Merrill, J., 2008. In vitro and in vivo pharmacological models to assess demyelination and remyelination. *Neuropsychopharmacology*, 34(1), 55-73.
247. Mestas, J., Hughes, C.C., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172, 2731-2738.
248. Meyer, J.M., Han, J., Singh, R., Moxley, G., 1996. Sex influences on the penetrance of HLA shared-epitope genotypes for rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.*, 58, 371-383
249. Miller, R.A., 1996. Aging and the immune response. In: Schneider, E.L., Rowe, J.W. (Eds), *Handbook of the Biology of Aging* (pp. 355- 392). San Diego: Academic Press.

250. Miller, L., Alley, E.W., Murphy, W.J., Russell, S.W., Hunt, J.S., 1996. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J Leukoc Biol.* 59, 442–450.
251. Miller, R., Gorcia, G., Kirk, C., Witkowski, J., 1997. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev.* 160(1), 79-90.
252. Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., McEwen, B.S., 1998. Glucocorticoid Receptors Are Differentially Expressed in the Cells and Tissues of the Immune System. *Cell Immunol.* 186(1), 45-54.
253. Miller, S., Karpus, W., 2007. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr Protoc Immunol.* Ch. 15, Unit 15.1.
254. Miljković, D., Stanojević, Z., Momcilović, M., Odoardi, F., Flügel A., Mostarica-Stojković, M., 2011. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology.* 216, 979-987.
255. Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.P., Zettl, U.K., 2010. Animal models of multiple sclerosis – potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* 92, 386–404.
256. Montoya-Ortiz, G., 2013. Immunosenescence, aging, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013, 1-15.
257. Morale, M., Gallo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Marletta, N., Spina-Purrello, V., Avola, R., Caucci, F., Tomasi, P., Delitala, G., Barden, N., Marchetti, B., 2001. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunol Cell Biol.* 79(4), 400-417.
258. Morell, V., 1995. Zeroing in on how hormones affect the immune system. *Science.* 269(5225), 773-775.
259. Ngo, S.T., Steyn, F.J., McCombe, P.A., 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol.* 35, 347-369.
260. Nicot, A., 2009. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Front Biosci.* 14, 4477.
261. Nishioka, T., Shimizu, J., Iida, R., Yamazaki, S., Sakaguchi, S., 2006. CD4+CD25+Foxp3+ T cells J. and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J. Immunol.* 176, 6586–6593.

262. Northern, A., Rutter, S., Peterson, C., 1994. Cyclic changes in the concentrations of peripheral blood immune cells during the normal menstrual cycle. *Exp Biol Med.* 207(1), 81-88.
263. Noster, R., Riedel, R., Mashreghi, M., Radbruch, H., Harms, L., Haftmann, C., Chang, H.D., Radbruch, A., Zielinski, C.E., 2014. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med.* 6(241), 241ra80.
264. Oksenberg, J.R., Barcellos, L.F., 2005. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun.* 6, 375–387.
265. Olsen, N., Kovacs, W., 1996. Gonadal Steroids and Immunity. *Endocr Res.* 17(4), 369-384.
266. Olsen, N., Olson, G., Viselli, S.M., Gu, X., Kovacs, W.J., 2001. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development. *Endocrinology.* 142(3), 1278-1283.
267. Olson, J.K., Croxford, J.L., Calenoff, M.A., Dal Canto, M.C., Miller, S.D., 2001. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 108, 311–318.
268. Olsson, T., Dahlman, I., Wallström, E., Weissert, R., Piehl, F., 2000. Genetics of rat neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 107(2), 191-200.
269. Østensen, M., Villiger, P., 2007. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol.* 29(2), 185-191.
270. Osterberg, A., Boivie, J., Thuomas, K.A., 2005. Central pain in multiple sclerosis—prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain.* 9(5), 531–542.
271. Oukka, M., 2007. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 66(Supplement 3), iii87-iii90.
272. Ozakbas, S., Kaya, D., Idiman, E., 2012. Early Onset Multiple Sclerosis Has Worse Prognosis Than Adult Onset Multiple Sclerosis Based on Cognition and Magnetic Resonance Imaging. *Autoimm Dis.* 2012, 1-5.
273. Paavonen, T., 1994. Hormonal Regulation of Immune Responses. *Ann Med.* 26(4), 255-258.
274. Pachner, A., 2011. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 24(3), 291-299.
275. Pachówka, M., Makula, J., Korczak-Kowalska, G., 2011. Diminished cytokines gene expression in lymphoid organs of healthy aged rats. *Cytokine.* 54(1), 24-28.

276. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 8(12), 1353-1362.
277. Pankevich, D., Wizemann, T., Altevogt, B., 2011. Sex differences and implications for translational neuroscience research. Washington, DC: National Academies Press (US).
278. Papenfuss, T.L., Rogers, C.J., Gienapp, I., Yurrita, M., McClain, M., Damico, N., Valo, J., Song, F., Whitacre, C.C., 2004. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol.* 150, 59-69.
279. Parajuli, B., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Doi, Y., Noda, M., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2012. GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J Neuroinflammation.* 9, 268.
280. Park, H., Li, Z., Yang, X., Chang, S., Nurieva, R., Wang, Y., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, A., Dong, C., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6(11), 1133-1141.
281. Patchev, V.K., Hayashi, S., Orikasa, C., Almeida, O.F., 1995. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J.* 9, 419-423.
282. Paterson, P.Y., 1976. Experimental allergic encephalomyelitis: role of fibrin deposition in immunopathogenesis of inflammation in rats. *Fed Proc.* 35, 2428-2434.
283. Paty, D.W., Noseworthy, J.H., Ebers, G.C., 1997. Diagnosis of multiple sclerosis. In: Paty, D.W., Ebers, G.C. (Eds), *Multiple sclerosis* (pp. 48-51). Philadelphia: FA Davis Company.
284. Pawelec, G., Hirokawa, K., Fülöp, T., 2001. Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev.* 122(14), 1613-1637.
285. Pawelec, G., Larbi, A., Derhovanessian, E., 2010. Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol.* 142, S39-S44.
286. Pender, M., Greer, J., 2007. Immunology of multiple sclerosis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 7(4), 285-292.
287. Perricone, C., de Carolis, C., Perricone, R., 2012. Pregnancy and autoimmunity: A common problem. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 26(1), 47-60.

288. Perry, V., Teeling, J., 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 35(5), 601-612.
289. Petermann, F., Korn T., 2011. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* 585, 3747-3757.
290. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., De Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., 2004. WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27. *J Immunol.* 172(4), 2225-2231.
291. Piccinni, M., Giudizi, M., Biagiotti, R., Beloni, L., Giannarini, L., Sampognaro, S., Parronchi, P., Manetti, R., Annunziato, F., Livi, C., 1995. Progesterone favors the development of human T helper cells producing th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established th1 cell clones. *J Immunol.* 1(155), 128-133.
292. Pido-Lopez, J., Imami, N., Aspinall, R., 2001. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin Exp Immunol.* 125, 409-413.
293. Polanczyk, M., Carson, B., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A., Ziegler, S., Offner, H., 2004. Cutting Edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol.* 173(4), 2227-2230.
294. Polliack, M.L., Barak, Y., Achiron, A., 2001. Late-Onset Multiple Sclerosis. *J Am Geriatr Soc.* 49(2), 168-171.
295. Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., Dittel, B.N., 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 178(1), 39-48.
296. Poveshchenko, A., Orlov, N., Kazakov, O., Poveshchenko, O., Kim, I., Bondarenko, N., Miller, T., Strunkin, D., Kabakov, A., Reiter, T., Konenkov, V., 2014. Age and Gender Differences in Cytokine Profile of Lymph and Blood Serum. *AAR.* 03(03), 216-221.
297. Pozzilli, C., Falaschi, P., Mainero, C., Martocchia, A., D'Urso, R., Proietti, A., Frontoni, M., Bastianello, S., Filippi, M., 1999. MRI in multiple sclerosis during the menstrual cycle: Relationship with sex hormone patterns. *Neurology.* 53(3), 622-624.
298. Prelog, M., 2006. Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity? *Autoimm Rev.* 5(2), 136-139.

299. Prochazkova, J., Pokorna, K., Holan, V., 2012. IL-12 inhibits the TGF- $\beta$ -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- $\beta$ -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*. 217, 74-82.
300. Qian, X., Ning, H., Zhang, J., Hoft, D., Stumpo, D., Blackshear, P., Liu, J., 2011. Posttranscriptional regulation of IL-23 expression by IFN-gamma through tristetraproline. *J Immunol*. 186(11), 6454-6464.
301. Quintero-Ronderos, P., Montoya-Ortiz, G., 2012. Epigenetics and Autoimmune Diseases. *Autoimm Dis*. 2012, 1-16.
302. Rabinovitch, P.S., Torres, R.M., Engel, D., 1986. Simultaneous cell cycle analysis and two color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol*. 136, 2769-2775.
303. Ransohoff, R.M., Engelhardt, B., 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 12, 623-635.
304. Rasband, W.S., 1997-2014. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>
305. Rawji, K., Yong, V., 2013. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol*. 2013, 1-13.
306. Reddy, J., Waldner, H., Zhang, X., Illes, Z., Wucherpfennig, K.W., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2005. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 175, 5591-5595.
307. Rijhsinghani, A., Thompson, K., Bhatia, S., Waldschmidt, T., 1996. Estrogen blocks early Tcell development in the thymus. *Am Journal Reprod Immunol*. 36(5), 269-277.
308. Rintisch, C., Holmdahl, R., 2008. DA rats from two colonies differ genetically and in their arthritis susceptibility. *Mamm Genome*. 19, 420-428.
309. Robinson, A.P., White, T.M., Mason, D.W., 1986. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology*. 57, 239-247.
310. Robinson, D., Lorenzo, M., Jian, W., Klein, S., 2011. Elevated 17 $\beta$ -estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *Plos Pathog*. 7(7), e1002149.

311. Roca, C.A., Schmidt, P.J., Deuster, P.A., Danaceau, M.A., Altemus, M., Putnam, K., Chrousos, G.P., Nieman, L.K., Rubinow, D.R., 2005. Sex-related differences in stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis during induced gonadal suppression. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 4224–4231.
312. Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., Croft, M., 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity.* 15, 445–455.
313. Sainz, T., Serrano-Villar, S., Díaz, L., Tomé, M.I.G., Gurbindo, M.D., de José, M.I., Mellado, M.J., Ramos, J.T., Zamora, J., Moreno, S., Muñoz-Fernández, M.Á., 2013. The CD4/CD8 ratio as a marker of T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS.* 27(9), 1513-1516.
314. Sakiani, S., Olsen, N.J., Kovacs, W.J., 2013. Gonadal steroids and humoral immunity. *Nat Rev Endocrinol.* 9, 56–62.
315. Sammaritano, L., 2012. Menopause in patients with autoimmune diseases. *Autoimm Rev.* 11(6-7), A430-A436.
316. Santoli, D., Trinchieri, G., Zmijewski, C.M., Koprowski, H., 1976. HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *J Immunol.* 117, 765-770.
317. Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 10(3), 170-181.
318. Savarin, C., Stohlman, S., Hinton, D., Ransohoff, R., Cua, D., Bergmann, C., 2012. IFN- $\gamma$  protects from lethal IL-17 mediated viral encephalomyelitis independent of neutrophils. *J Neuroinflammation.* 9(1), 104.
319. Scally, W.S., Petersen, J., Law, C.S., Dudek, L.N., Nel, J.H., Loh, L.K., Wijeyewickrema, C.L., Eckle, B.G.S., van Heemst, J., Pike, N.R., McCluskey, M.J., Toes, E.R., La Gruta, L.N., Purcell, W.A.; Reid, H.H, Thomas, R., Rossjohn, J., 2013. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 210(12), 2569-2582.
320. Schadenberg, A., Vastert, S., Evens, F., Kuis, W., van Vught, A., Jansen, N., Prakken, B., 2011. FOXP3+CD4+ Tregs lose suppressive potential but remain anergic during transient inflammation in human. *Eur J Immunol.* 41(4), 1132-1142.
321. Schirmer, M., Vallejo, A.N., Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 1998. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28<sup>-</sup> T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol.* 161, 1018 –1025.

322. Schmidt, D., Goronzy, J., Weyand, C., 1996. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest.* 97(9), 2027-2037.
323. Schluns, K., Kieper, W., Jameson, S., Lefrançois, L., 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* (5), 426-432.
324. Schwartz, R., Datta, S., 1989. Autoimmunity and autoimmune diseases. In: Paul, W.E. (Ed), *Fundamental Immunology* (pp. 819-866). New York: Raven Press, Ltd.
325. Scotland, R., Stables, M., Madalli, S., Watson, P., Gilroy, D., 2011. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood.* 118(22), 5918-5927.
326. Sedgwick, J.D., Riminton, D.S., Cyster, J.G., Korner, H., 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today.* 21, 110–113.
327. Selmaj, K., 2000. Tumour necrosis factor and anti-tumour necrosis factor approach to inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Ann Rheum Dis.* 59(90001), 94i-102.
328. Seo, J.-E., Hasan, M., Sarma, S., Kang, M.-J., Jung, B.-H., Cho, M.-L., N. S.W., Park, W.S., Kim, H.-Y., Kwon, O.-S., 2013. Gene analysis of brain in aged-experimental autoimmune encephalomyelitis mice reveals over-expression of stress response pathway-related genes (P4104). *J Immunol.* 190(Meeting Abstracts 1), 51.18.
329. Setlow, V.P., Lawson, C.E., Woods, N.F., 1998. *Gender Differences in Susceptibility to Environmental Factors* Washington (DC): National Academies Press (US).
330. Sharma, S., Dominguez, A. L., Lustgarten. J., 2006. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J. Immunol.* 177, 8348–8355.
331. Shin, T., Ahn, M., Matsumoto, Y., 2012. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Cell Biol.* 45, 141-148.
332. Siegmund, K., Zeis, T., Kunz, G., Rolink, T., Schaeren-Wiemers, N., Pieters, J., 2011. Coronin 1-mediated naive T cell survival is essential for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 186(6), 3452-3461.



333. Siffrin, V., Vogt, J., Radbruch, H., Nitsch, R., Zipp, F., 2010. Multiple sclerosis—candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci.* 33, 202–210.
334. Simmonds, M., Gough, S., 2007. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics.* 8(7), 453-465.
335. Simmons, R.D., Bernard, C.C.A., Singer, G., Carnegie, P.R., 1982. Experimental autoimmune encephalomyelitis: an anatomically-based explanation of clinical progression in rodents. *J Neuroimmunol.* 3, 307-318.
336. Simmons, R.D., Bernard, C.C.A., Carnegie, P.R., 1983. Factors underlying ascending paralysis in rodents during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In: Kidman, A.D., Tomkins, J.K., Morris, C.A., Cooper, N.A. (Eds), *Molecular Pathology of Nerve and Muscle: Noxious Agents and Genetic Lesions* (pp. 99-111.). Clifton, NJ: Humana Press.
337. Simone, I.L., Carrara, D., Tortorella, C., Liguori, M., Lepore, V., Pellegrini, F., Bellacosa, A., Ceccarelli, A., Pavone, I., Livrea, P., 2002. Course and prognosis in early-onset MS: Comparison with adult-onset forms. *Neurology.* 59(12), 1922-1928.
338. Sinha, S., Kaler, L., Proctor, T., Teuscher, C., Vandembark, A., Offner, H., 2008. IL-13-Mediated Gender Difference in Susceptibility to Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 180(4), 2679-2685.
339. Sinha, S., Itani, F.R., Karandikar, N.J., 2014. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol Res.* 59, 254-265.
340. Smith, R., Studd, J., 1993. 92309269 A pilot study of the effect upon multiple sclerosis of the menopause, hormone replacement therapy and the menstrual cycle. *Maturitas.* 16(3), 211-212.
341. Smith, M., Eller, N., McFarland, H., Racke, M., Raine, C., 1999. Age Dependence of Clinical and Pathological Manifestations of Autoimmune Demyelination. *Am J Pathol.* 155(4), 1147-1161.
342. Smits, B., 2004. Genetic Variation in Coding Regions Between and Within Commonly Used Inbred Rat Strains. *Genome Res.* 14(7), 1285-1290.
343. Sonderegger, I., Iezzi, G., Maier, R., Schmitz, N., Kurrer, M., Kopf, M., 2008. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med.* 205, 2281-94.
344. Sojka, D.K., Huang, Y-H., Fowell, D.J., 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 124, 13-22.

345. Spach, K., Blake, M., Bunn, J., McElvany, B., Noubade, R., Blankenhorn, E., Teuscher, C., 2009. Cutting edge: The Y chromosome controls the age-dependent experimental allergic encephalomyelitis sexual dimorphism in SJL/J mice. *J Immunol.* 182(4), 1789-1793.
346. Spence, R., Voskuhl, R., 2012. Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front Neuroendocrinol.* 33(1), 105-115.
347. Staykova, M.A., Cowden, W., Willenborg, D.O., 2002. Macrophages and nitric oxide as the possible cellular and molecular basis for strain and gender differences in susceptibility to autoimmune central nervous system inflammation. *Immunol Cell Biol.* 80, 188-197.
348. Steinman, L., 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the Central Nervous System. *Cell.* 85(3), 299-302.
349. Stern, M., Sorkin, L., Milton, K., Sperber, K., 2010. Aging with multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clinics N Am.* 2(21), 403-417.
350. Sthoeger, Z.M., Chiorazzi, N., Lahita, R.G., 1988. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J Immunol.* 141, 91-98.
351. Stockinger, B., Veldhoen, M., 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol.* 19(3), 281-286.
352. Stojić-Vukanić, Z., Nacka-Aleksić, M., Pilipović, I., Vujnović, I., Blagojević, V., Kosec, D., Dimitrijević, M., Lepasavić, G., 2015. Aging diminishes the resistance of AO rats to EAE: putative role of enhanced generation of GM-CSF Expressing CD4+ T cells in aged rats. *Immun Ageing.* 12(16).
353. Stošić-Grujičić, S., Ramić, Z., Bumbaširević, V., Harhaji L., Mostarica-Stojković M., 2004. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol.* 136, 49-55.
354. Straub, R., 2000. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol.* 109(1), 10-15.
355. Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C.J., O'Shea, J.J., Hennighausen, L., Ernst, M., Hunter, C.A., 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 7, 937-945.
356. Stumhofer, J., Silver, J., Laurence, A., Porrett, P., Harris, T., & Turka, L.A., Ernst, M., Saris, C.J.M., O'Shea, J.J., Hunter, C.A., 2007. Interleukins 27 and 6 induce

- STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 8(12), 1363-1371.
357. Styrts, B., Sugarman, B., 1991. Estrogens and infection. *Clin Inf Dis.* 13(6), 1139-1150.
358. Su, L., Kidd, B., Han, A., Kotzin, J., Davis, M., 2013. Virus-specific CD4+ memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity.* 38(2), 373-383.
359. Summers deLuca, L.E., Pikor, N., O'Leary, J., Galicia-Rosas, G., Ward, L., Defreitas, D., Finlay, T.M., Ousman, S.S., Osborne, L.R., Gommerman, L.J., 2010. Substrain differences reveal novel disease-modifying gene candidates that alter the clinical course of a rodent model of multiple sclerosis. *J Immunol.* 184(6), 3174-3185.
360. Surh, C.D., Sprent, J., 2008 Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 29, 848-862.
361. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S., 2000. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med.* 192(2), 303-310.
362. Tamir, A., Eisenbraun, M., Garcia, G., Miller, R., 2000. Age-Dependent Alterations in the Assembly of Signal Transduction Complexes at the Site of T Cell/APC Interaction. *J Immunol.* 165(3), 1243-1251.
363. Tanuma, N., Shin, T., Matsumoto, Y., 2000. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol.* 108, 171-180.
364. Tatari-Calderone, Z., Stojaković, M., Dewan, R., Le Boudier, G., Janković, D., Vukmanović, S., 2012. Age-related accumulation of T cells with markers of relatively stronger autoreactivity leads to functional erosion of T cells. *BMC Immunology.* 13, 8.
365. Taylor, L., Gilmore, W., Matsushima, G., 2009. SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol.* 19(3), 467-479.
366. Teixeira, S.A., Varriano, A.A., Bolonheisz, S.M., Muscará, M.N., 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis: A heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. *Drug Discov Today Dis Models.* 2, 127-134.

367. Teuscher, C., Bunn, J.Y., Fillmore, P.D., Butterfield, R.J., Zachary, J.F., Blankenhorn, E.P., 2004. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 165, 1593–1602.
368. Thornton, A., Shevach, E., 1998. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med.* 188(2), 287-296.
369. Tomassini, V., Pozzilli, C., 2009. Sex hormones, brain damage and clinical course of Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci.* 286(1-2), 35-39.
370. Tower, J., Arbeitman, M., 2009. The genetics of gender and life span. *J Biol.* 8, 38.
371. Tremlett, H., Devonshire, V., 2006. Is late-onset multiple sclerosis associated with a worse outcome? *Neurology.* 67, 954–959.
372. Trojano, M., Lucchese, G., Graziano, G., Taylor, B.V., Simpson, S. Jr, Lepore, V., Grand'maison, F., Duguet, P., Izquierdo, G., Grammond, P., Amato, M.P., Bergamashi, R., Gillani, G., Boz, C., Hupperts, R., Van Pesch, V., Lechner-Scott, J., Cristiano, E., Fiol, M., Oreja-Guevara, C., Saladino, M.L., Verhuel, F., Slee, M., Paolicelli, D., Tortorella, C., D'Onghia, M., Iaffaldano, P., Direnzo, V., Butzkueven, H., MS base study group and the New Zealand MS prevalence study group, 2012. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PLoS One.* 7(10), e48078.
373. Tzartos, J., Friese, M., Craner, M., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M., Fugger, L., 2008. Interleukin-17 Production in Central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in Multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 172(1), 146-155.
374. Vadasz, Z., Haj, T., Kessel, A., Toubi, E., 2013. Age-related autoimmunity. *BMC Medicine.* 11, 94.
375. Vallejo, A., Schirmer, M., Weyand, C., Goronzy, J., 2000. Clonality and Longevity of CD4+CD28null T Cells Are Associated with Defects in Apoptotic Pathways. *J Immunol.* 165(11), 6301-6307.
376. van den Broek, H., Damoiseaux, J., De Baets, M., Hupperts, R., 2005. The influence of sex hormones on cytokines in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: a review. *Mult Scler.* 11(3), 349-359.
377. Van Oyen, H., Nusselder, W., Jagger, C., Kolip, P., Cambois, E., Robine, J., 2012. Gender differences in healthy life years within the EU: an exploration of the “health–survival” paradox. *Int J Pub Health.* 58(1), 143-155.

378. van Walderveen, M., Tas, M., Barkhof, F., Polman, C., Frequin, S., Hommes, O., Valk, J., 1994. Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. *Neurology*. 44(2), 327-327.
379. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24, 179-189.
380. Verthelyi, D., 2001. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol*. 6(1), 983-993.
381. Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballos, A., Martínez-A, C., Varona, R., 2009. CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol*. 39, 1671-1681.
382. Voskuhl, R.R., Pitchekian-Halabi, H., MacKenzie-Graham, A., McFarland, H.F., Raine, C.S., 1996. Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 39, 724-733.
383. Voskuhl, R., Gold, S., 2012. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol*. 8(5), 255-263.
384. Voskuhl, R.R., Palaszynski, K., 2001. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 7(3), 258-270.
385. Vollmer, T.L., Waxman, S.G., 1991. MS and other demyelinating disorders. In: Rosenberg, R.N. (Ed), *Comprehensive Neurology* (pp. 489-493). New York: Raven Press.
386. Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, C., Macallan, D.C., Akbar, A.N., 2006. Human CD4+CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest*. 116, 2423-2433.
387. Waite, J.C., Skokos, D., 2012. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflamm*. 2012, 819467.
388. Watanabe, T., Yamamoto, T., Abe, Y., Saito, N., Kumagai, T., Kayama, H., 1999. Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 16, 255-265.
389. Weinshenker, B.G., Rice, G.P., Noseworthy, J.H., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C., 1991. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain*. 114(Pt 2), 1045-1056.

390. Wekerle, H., Sun, D.M., 2010. Fragile privileges: autoimmunity in brain and eye. *Acta Pharmacol Sin.* 31, 1141-1148.
391. Wesołowska, A., Norbury, L.J., Januszkiewicz, K., Jedlina, L., Jaros, S., Zawistowska-Deniziak, A., Zygnier, W., Wędrychowicz, H., 2013. Evaluation of the immune response of male and female rats vaccinated with cDNA encoding a cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* (FhPcW1). *Acta Parasitol.* 58, 198-206.
392. Weyand, C.M., Brandes, J.C., Schmidt, D., Fulbright, J.W., Goronzy, J.J., 1998. Functional properties of CD4+CD28- T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev.* 102, 131- 147.
393. Wheeler, R.D., Zehntner, S.P., Kelly, L.M., Bourbonnière, L., Owens, T., 2006. Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology.* 118, 527-538.
394. Wherry, E.J., 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 12, 492-499.
395. Whitacre, C.C., Reingold, S.C., O'Looney, P.A., Blankenhorn, E., Brinley, F., Collier, E., Duquette, P., Fox, H., Giesser, B., Gilmore, W., Lahita, R., Nelson, J.L., Reiss, C., Riskind, P., Voskuhl, R., 1999. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 283(5406), 1277-1278.
396. Whitacre, C.C., 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2, 777-780.
397. White, S.R., 1984. Experimental allergic encephalomyelitis: effects on monoaminergic neurotransmission. In: Barnes, C.D. (Ed.), *Brainstem Control of Spinal Cord Function* (pp. 257-281). Orlando, FL: Academic Press.
398. Wilder, R., 1995. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Ann Rev Immunol.* 13(1), 307-338.
399. Willenborg, D., Sjollem, P., Danta, G., 1986. Immunoregulation of passively induced allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 136(5), 1676-1679.
400. Williams, R.M., Moore, M.J., 1973. Linkage of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis to the major histocompatibility locus in the rat. *J Exp Med.* 138, 775-782.
401. Willis, C., Morris, J.M., Danis, V., Gallery, E.D.M., 2003. Cytokine production by peripheral blood monocytes during the normal human ovulatory menstrual cycle. *Hum Reprod.* 18(6), 1173-1178.
402. Wundes, A., Amtmann, D., Brow, T., Christian, S., 2011. Menopause in women with multiple sclerosis. *Int J MS Care.* S3(13), 47.

403. Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., Dombrowicz, D., Capron, A., Capron, M., 1999. Expression of Cd28 and Cd86 by Human Eosinophils and Role in the Secretion of Type 1 Cytokines (Interleukin 2 and Interferon  $\gamma$ ): Inhibition by Immunoglobulin a Complexes. *J Exp Med.* 190(4), 487–495.
404. Xia, H., Zhang, G., Wang, R., Zheng, Y. 2009. The influence of age and sex on the cell counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in chinese rhesus macaques. *Cell Mol Immunol.* 6(6), 433-440.
405. Xie, H., Hua, C., Sun, L., Zhao, X., Fan, H., Dou, H., Sun, L., Hou, Y., 2011. 17 $\beta$ -estradiol induces CD40 expression in dendritic cells via MAPK signaling pathways in a minichromosome maintenance protein 6-dependent manner. *Arthritis Rheum.* 63(8), 2425-2435.
406. Zandman-Goddard, G., Peeva, E., Shoenfeld, Y., 2007. Gender and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 6(6), 366-372.
407. Zhang, G.X., Li, J., Ventura, E., Rostami, A., 2002. Parenchymal microglia of naïve adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp Mol Pathol.* 73, 35-45.
408. Zhang, L., Zhao, Y., 2007. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4+CD25+T cells: Multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 211(3), 590-597.
409. Zhang, M.A., Rego, D., Moshkova, M., Kebir, H., Chruscinski, A., Nguyen, H., Akkermann, R., Stanczyk, F.Z., Prat, A., Steinman, L., Dunn, S.E., 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  and  $\gamma$  regulate IFN $\gamma$  and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109, 9505-9510.
410. Zhao, L., Sun, L., Wang, H., Ma, H., Liu, G., Zhao, Y., 2007. Changes of CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells in aged BALB/c mice. *J. Leukocyte Biol.* 81, 1386–1394.
411. Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature.* 484, 514-518.

## Biografija

Mirjana Nacka-Aleksić je rođena 19.01.1978. godine u Skoplju, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2007. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 9,26. Doktorske studije u okviru studijskog programa Farmakologija, podmodul Imunofarmakologija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala je 2008. godine.

Zaposlena je na katedri za Fiziologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 2008. godine, gde kao stručni saradnik, a od 2010. godine kao asistent, učestvuje u izođenju nastave na predmetu Patofiziologija. Učestvuje i u istraživanjima u okviru projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: Imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Mirjana Nacka-Aleksić je do sada bila autor i koautor u 14 naučnih publikacija međunarodnog značaja (5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima, 5 radova u istaknutim međunarodnim časopisima i 4 rada u međunarodnim časopisima), kao i u 3 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 3 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja iz uže naučne oblasti.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана: Мирјана Нацка-Алексић

број уписа: 37/08

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### **Полне разлике у патогенези аутоимунског експерименталног енцефаломијелитиса код пацова**

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

Потпис докторанда



У Београду, 10. 06. 2016.

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора: Мирјана Нацка-Алексић

Број уписа: 37/08

Студијски програм: Фармакологија - Имунофармакологија

Наслов рада: **Полне разлике у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код пацова**

Ментор: Др сц. Гордана Лепосавић, редовни професор

**Потписана: Мирјана Нацка-Алексић**

**Изјављујем** да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду. Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда



У Београду, 10. 06. 2016.

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Полне разлике у патогенези експерименталног аутоимунског  
енцефаломијелитиса код пацова**

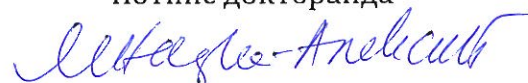
која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда



У Београду, 10.06.2016.