

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Raisa V. Petrović

**POLNE RAZLIKE U IMUNSKOM
ODGOVORU
NA VAKCINU PROTIV GRIPA
KOD MIŠEVA
RAZLIČITIH SOJEVA I UZRASTA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Raisa V. Petrović

**SEX DIFFERENCES IN THE IMMUNE
RESPONSE
TO INFLUENZA VACCINE
IN MICE OF
DIFFERENT STRAINS AND AGES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

Dr Biljana Bufan, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski Fakultet

Dr Biljana Božić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr Gordana Leposavić, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski Fakultet

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

Dr Irena Živković, naučni savetnik
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Dr Katarina Mitić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Tanja Lunić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu, a u okviru projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050, rukovodilac prof. dr G. Leposavić), a koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki dr Biljani Bufan na beskonačnom strpljenju i podršci tokom svakog koraka izrade ove disertacije, znam da nije bilo lako, ali stigismo do kraja.

Izražavam veliku zahvalnost dr Neveni Arsenović-Ranin na sveobuhvatnom angažovanju, savetima koji su mi bili izuzetno korisni i stručnoj pomoći tokom izrade, pisanja i prepravljnja ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem Ivani Prijčić, Ivani Ćuruviji i Veljku Blagojeviću, zato što smo zajedno uspeli da istrajemo uz međusobnu podršku i prijateljstvo i preživimo ovo teško putovanje. Vujo predajem štafetu.

Želela bih da se zahvalim i ostalim kolegama iz Centra: Ivanu, Stanislavi, Dušku, Ireni, Rajni, Dejani, Ivani L., Emiliji, Ani, Radi, Luki, Valentini, Bojanu, kao i koleginicama sa Farmaceutskog fakulteta, Jasmini i Mirjani, koji su bili uvek raspoloženi da podele znanje i priteknu u pomoć.

Hvala mojoj baki Biserki i dedi Milovanu na bezuslovnoj podršci.

Zahvalnost dugujem i svojim prijateljima Nadi, Hijenama, Ivani, Vuji, Ćuki, Ivanu, Sari, Schnapiju, Darku, Kostu i Mileni što su me trpeli tokom ovog procesa i ohrabрили da se bacim u nove avanture.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima Zoranu i Verici i sestri Martini za ljubav i podršku koju su mi pružali tokom čitavog života.

Ovu disertaciju posvećujem Gavrilu.

LISTA SKRAĆENICA

7-AAD– 7-Aminoaktinomicin D

ANOVA– analiza varijanse, *engl.* Analysis of Variance

BCR– B-ćelijski receptor, *engl.* B cell receptor

CD – klaster diferencijacije, *engl.* Cluster of Differentiation

CIV– celovirusna inaktivisana vakcina

DĆ– dendritska ćelija

ELISA– metoda enzimske imunoadsorpcije, *engl.* enzyme-linked immunosorbent assay

FCS– fetalni serum teleta, *engl.* Fetal Calf Serum

FITC–fluorescein-izotiocijanat

FSC– odbijena svetlost merena u ravni ekscitacijske svetlosti, *engl.* forward scatter

GC–germinativni centar

HA–hemaglutinin

HAI– test inhibicije hemaglutinacije, *engl.* hemagglutination inhibition assay

ICOS– inducibilni T-ćelijski kostimulator, *engl.* inducible T cell co-stimulator

IFN–interferon

Ig–imunoglobulin

IL–interleukin

KSCN– kalijum tiocijanat

mAt– monoklonsko antitelo

MDCK– ćelijska kultura Madin-Darbi, *engl.* Madin-Darby canine kidney

MN– Test mikroneutralizacije

NA–neuramidaza

NF-κB– nuklearni faktor kapa B

NK– urođenoubilačke ćelije *engl.* natural killer

NLR– receptor sličan NOD-u, *engl.* NOD-like receptor

OD– optička gustina, *engl.* optical density

PD– receptor programirane smrti, *engl.* programmed cell death protein

PE–fikoeritrin

PHA– fitohemaglutinin, *engl.* phytohemagglutinin

PMA– forbol miristat acetat, *engl.* phorbol 12-myristate 13-acetate

PRRs– receptori za prepoznavanje molekulskih obrazaca, *engl.* pattern recognition receptors

RAG– gen za aktivaciju rekombinacije, *engl.* recombination activating gene

RPMI– Roswell Park Memorial Institute

SASP– sekretorni fenotip vezan za starenje, *engl.* senescent-associated secretory phenotype

SC– citokin-sekretujuće ćelije, *engl.* secreting cells

SSC– odbijena svetlost merena normalno na upadni laserski zrak, *engl.* side scatter

SV– *Split* inaktivisana vakcina

SZO– Svetska Zdravstvena Organizacija

Tfh– folikulska pomoćnička T- ćelija, *engl.* T follicular helper cell

Tfr– folikulska regulatorna T- ćelija, *engl.* T follicular regulatory cells

TGF– transformišući faktor rasta, *engl.* Transforming Growth Factor

TIV– trovalentna inaktivisana vakcina

TLR– Receptor sličan Tolu, *engl.* Toll-Like Receptor

TNF– faktor nekroze tumora, *engl.* Tumor Necrosis Factor

Sažetak

Biološki pol, genetska varijabilnost i starenje imaju uticaja na imunski odgovor, ali mehanizmi nisu sasvim razjašnjeni. Ciljevi disertacije su bili ispitivanje: 1) polnih razlika u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa (inaktivisanu trovalentnu celovirusnu (CIV) i *split* (SV)) kod različitih sojeva miševa tokom starenja, određivanjem humoralnog odgovora na vakcinalne antigene i protektivnih potklasa IgG antitela; 2) ćelijskih i molekulskih mehanizama odgovornih za ove razlike određivanjem zastupljenosti: slezinskih folikulskih pomoćničkih T (Tfh) ćelija i folikulskih regulatornih T (Tfr) ćelija, B-ćelija germinativnog centra (GC B), citokinskog profila Th ćelija i proliferativne sposobnosti Th i B-ćelija.

Rezultati ukazuju na intenzivniji humoralni imunski odgovor ženki *Swiss* miševa u odnosu na mužjake i intenzivniji odgovor na CIV u odnosu na SV. Sekretija IgG2a je dominantna kod ženki imunizovanih CIV-om, a polne razlike se gube kod imunizovanih SV-om, što je povezano sa zastupljenošću Th1 i Th2 ćelija u slezini. Uticaj genetske varijabilnosti se ogleda u intenzivnijem odgovoru kod BALB/c u odnosu na C57BL/6 soj uz zadržane polne razlike i dominaciju IgG1 kod BALB/c miševa (izraženiji Th2 odgovor). Starenje utiče na smanjenje titra IgG antitela kod oba pola, i na odnos titra IgG2a(c)/IgG1 na sojno- i polno- specifičan način. Snažniji imunski odgovor se povezuje sa intenzivnijom proliferacijom Th i B splenocita u odgovoru na vakcinalne antigene, većim brojem Tfh i GC B splenocita i manjim brojem supresivnih Tfr splenocita (efikasnije je formiranje GC), većom zastupljenošću CD4+IL21+ ćelija.

Rezultati ukazuju da pol, genetske karakteristike, uzrast, kao i tip vakcine mogu imati uticaj na imunski odgovor, što bi trebalo imati u vidu prilikom razvoja vakcine i strategije vakcinacije protiv gripa.

Ključne reči: vakcina protiv gripa, polne razlike, sojne razlike, starenje, miševi, imunski odgovor, IgG i njegove potklase, Th ćelije, GC B-ćelije, IL-21

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

Abstract

Biological sex, genetic variability, and aging influence the immune response, but the underlying mechanisms are not fully elucidated. The aims of this dissertation were to investigate: 1) sex differences in the immune response to influenza vaccine (inactivated trivalent whole virus (WV) and split virus (SV)) in different mouse strains during aging, by determining the antibody response to vaccine antigens and protective IgG antibody subclasses; 2) cellular and molecular mechanisms underlying these differences by assessing the abundance of splenic follicular helper T (Tfh) cells, follicular regulatory T (Tfr) cells, germinal center B (GC B) cells, cytokine profile of Th cells, and proliferative capacity of Th and B cells.

Results show a stronger humoral immune response in female *Swiss* mice compared to males and a stronger response to WV compared to SV. IgG2a secretion is dominant in females immunized with WV, while sex differences are lost in SV immunized mice, which is associated with the abundance of Th1 and Th2 cells in the spleen. Influence of genetic variability is reflected in a stronger response in BALB/c compared to C57BL/6 strain, with retained sex differences and dominance of IgG1 in BALB/c mice (indicating a more pronounced Th2 response). Aging leads to a decrease in IgG antibody titers in both sexes and affects the IgG2a(c)/IgG1 ratio in a strain- and sex-specific manner. A stronger immune response is associated with enhanced proliferation of Th and B splenocytes in response to vaccine antigens, increased numbers of Tfh and GC B splenocytes, and decreased numbers of suppressive Tfr splenocytes (facilitating GC formation), as well as increased abundance of CD4+IL21+ cells.

These results indicate that sex, genetic characteristics, age, and vaccine type can influence the immune response, which should be considered in the development of influenza vaccines and vaccination strategies.

Keywords: influenza vaccine, sex differences, genetic variability (or strain differences), aging, mice, immune response, IgG and its subclasses, Th cells, GC B cells, IL-21

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Immunobiology

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1.Polne razlike u imunskom odgovoru	1
1.1.1.Polne razlike u imunskom odgovoru na vakcine	3
1.2.Grip i vakcina protiv gripa.....	3
1.2.1.Virus gripa.....	3
1.2.2.Vakcina protiv gripa.....	4
1.3. Humoralni imunski odgovor	4
1.4.Polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa	8
1.5.Imunski sistem u starosti.....	9
1.6.Uticaj genetskih faktora na imunski odgovor na vakcinu protiv gripa	12
2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
3.MATERIJAL I METODE	14
3.1.Ogledne životinje.....	14
3.2.Eksperimentalni protokol	14
3.3.Imunizacija.....	15
3.4.Hemikalije i antitela.....	15
3.5.Izolovanje splenocita i seruma	16
3.5.1.Izolovanje splenocita	16
3.5.2.Izdvajanje seruma.....	16
3.6.Ispitivanje humoralne imunosti.....	16
3.6.1.Određivanje ukupnog titra IgG antitela i titra pojedinih potklasa IgG specifičnih za antigene iz vakcine ELISA testom.....	16
3.6.2.Određivanje aviditeta IgG antitela	17
3.6.3.Određivanje titra antitela značajnih za efikasnost protektivnog odgovora protiv virusa gripa u serumu.....	17
3.6.3.1.Test inhibicije hemaglutinacije (HAI)	17
3.6.3.2.Test mikroneutralizacije (MN)	18
3.7.Ispitivanje celularne imunosti	18
3.7.1.ELISPOT	18
3.7.2.Kultivacija splenocita za analizu sinteze citokina i proliferacije ćelija.....	18
3.7.3.Ispitivanje sinteze IL-21 citokina u CD4+ splenocitima	18
3.7.4.Određivanje koncentracije IL-4 i IFN- γ ELISA testom	19
3.7.5.Protočna citofluorometrija.....	19
3.7.5.1.Određivanje fenotipa ćelija	19

3.7.5.2. <i>Određivanje proliferacije ćelija</i>	20
3.8. Statistika	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Uticaj pola kod <i>Swiss</i> miševa na imunski odgovor pokrenut vakcinom protiv gripa	21
4.1.1. Pol <i>Swiss</i> miševa i soj virusa gripa utiču na titar virus-specifičnih IgG antitela.....	21
4.1.2. Pol <i>Swiss</i> miševa i soj virusa gripa utiču na titar funkcionalnih antitela specifičnih za antigene virusa koji ulaze u sastav CIV-e.....	23
4.1.3. Pol <i>Swiss</i> miševa imunizovanih CIV-om utiče na profil IgG potklasa specifičnih za virusne antigene u njihovom serumu.....	24
4.1.4. Ženke <i>Swiss</i> miševa imunizovane CIV-om imaju manji broj splenocita koji sintetizuju citokin IL-4 u odnosu na mužjake.....	26
4.2. Uticaj tipa vakcine na polne razlike u imunskom odgovoru <i>Swiss</i> miševa na vakcinu protiv gripa ...	27
4.2.1. Titar virus-specifičnih IgG antitela u serumu miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa zavisi od pola miševa, soja virusa i tipa vakcine.....	27
4.2.2. Titar antitela značajnih za protektivni odgovor protiv virusa gripa u serumu <i>Swiss</i> miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa zavisi od pola miševa, soja virusa i tipa vakcine	29
4.2.3. Profil potklasa IgG antiteala specifičnih za viruse sadržane u vakcini protiv gripa u serumu <i>Swiss</i> miševa zavisi od njihovog pola i tipa vakcine	32
4.2.4. Tip vakcine protiv gripa utiče na polne razlike u broju splenocita koji sekretuju IL-4	34
4.3. Uticaj genetske osnove miševa na polne razlike u odgovoru na vakcinu protiv gripa kod mladih adultnih životinja	36
4.3.1. Soj i pol mladih adultnih miševa utiču na titar virus-specifičnih IgG antitela u serumima miševa imunizovanih SV-om, ali ne i na njihov aviditet	36
4.3.2. Soj i pol utiču na zastupljenost Tfh, Tfr i GC B-ćelija i njihove odnose u slezini mladih adultnih miševa imunizovanih SV-om.....	38
4.3.3. Soj i pol miševa imunizovanih SV-om uticali su na virus-specifičan proliferativni odgovor splenocita u kulturi.....	43
4.3.4. Soj i pol utiču na sintezu IL-21 u CD4+ ćelijama slezine miševa imunizovanih SV-om	44
4.3.5. Soj miševa utiče na profil IgG potklasa u serumu	45
4.3.6. Sinteza IFN- γ i IL-4 u ćelijama slezine miševa imunizovanih SV-om nakon restimulacije antigenima virusa iz vakcine zavisi od soja, ali ne i od njihovog pola	47
4.4. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa sa različitom genetskom osnovom	49
4.4.1. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod <i>BALB/c</i> miševa	49
4.4.1.1. Pol i starost <i>BALB/c</i> miševa imunizovanih sa SV-om utiču na titar i aviditet IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u vakcine u serumu.....	49
4.4.1.2. Starost i pol utiču na zastupljenost Tfh, Tfr i GC B-ćelija u slezini kod miševa imunizovanih SV-om	50

4.4.1.3. Pol i starost utiču na proliferativni odgovor B220+ i CD4+ splenocita izolovanih iz BALB/c miševa imunizovanih SV-om na restimulaciju antigenima sojeva virusa iz vakcine u kulturi	53
4.4.1.4. Pol i starost utiču na zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 kod BALB/c miševa imunizovanih SV-om	55
4.4.1.5. Pol i uzrast utiču na profil IgG1 i IgG2a potklasa antitela specifičnih za virus gripa u serumu BALB/c miševa imunizovanih SV-om	56
4.4.1.6. Starenje dovodi do nastanka polnih razlika u sintezi IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita izolovanih iz BALB/c miševa imunizovanih SV-om	57
4.4.2. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod C57BL/6 miševa.....	59
4.4.2.1. Pol i starost miševa imunizovanih SV-om utiču na titar i aviditet IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u vakcini u serumu	59
4.4.2.2. Pol i uzrast utiču na zastupljenost Tfr, Tfh i GC B-ćelija u slezini C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om.....	62
4.4.2.3. Pol i starost utiču na proliferativni odgovor B220+ i CD4+ splenocita izolovanih iz C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om na restimulaciju antigenima sojeva virusa iz vakcine u kulturi	65
4.4.2.4. Pol i starost utiču na zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 kod C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om	67
4.4.2.5. Pol i uzrast utiču na profil IgG1 i IgG2c potklasa antitela specifičnih za virus gripa u serumu C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om	68
4.4.2.6. Starenje dovodi do polnih razlika u sintezi IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita izolovanih iz C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om.....	69
4.4.3. Upporedni prikaz uticaja starenja na polne i sojne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa BALB/c i C57BL/6 soja	71
4.4.3.1. Titar IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u SV smanjuje se starenjem u serumu miševa imunizovanih ovom vakcinom na sojno-specifičan način, dok se aviditet povećava na polno-specifičan način	71
4.4.3.2. Starenje utiče na smanjenje proliferativnog odgovora B220+ i CD4+ splenocita na restimulaciju u kulturi antigenima virusa sadržanim u SV-i	72
4.4.3.3. Starenje utiče na zastupljenost Tfr, Tfh i GC B-ćelija u slezini miševa imunizovanih SV-om na sojno-specifičan način.....	74
4.4.3.4. Starenje utiče na smanjenje zastupljenosti CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 na sojno-specifičan način	75
4.4.3.5. Starost i pol utiču na profil IgG potklasa antitela specifičnih za antigene iz SV vakcine u serumu miševa imunizovanih ovom vakcinom	76
4.4.3.6. Starenje utiče na odnos Th1/Th2 citokina u kulturi splenocita restimuliranih antigenima sadržanim u SV-i kojom su miševi imunizovani na sojno- i polno-specifičan način	79
5. DISKUSIJA.....	81
5.1. Polne razlike u IgG odgovoru Swiss miševa na CIV-u	81
5.2. Uticaj tipa vakcine na polne razlike u IgG odgovor Swiss miševa na CIV	82

5.3.Uticaj genetskih karakteristika miševa na polne razlike u IgG odgovoru na vakcinu protiv gripa	84
5.4.Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa sa različitom genetskom osnovom	86
6.ZAKLJUČCI	90
7.LITERATURA	92
8.BIOGRAFIJA	111
9.IZJAVE	112

1. UVOD

1.1. Polne razlike u imunskom odgovoru

Pol jedinke je definisan diferencijalnom organizacijom hromozoma, reproduktivnih organa i nivoom polnih hormona. Pol je biološka varijabla koja utiče na imunski odgovor kako na sopstvene tako i na strane antigene [1]. Uopšteno gledano, jedinke ženskog pola imaju intenzivniji urođeni i adaptivni imunski odgovor u poređenju sa jedinkama muškog pola. Ovo dovodi do bržeg uklanjanja patogena i boljeg imunskog odgovora na vakcine kod žena u poređenju sa muškarcima, ali takođe doprinosi njihovoj povećanoj osetljivosti na inflamatorne i autoimunske bolesti [2,3].

Urođeni i adaptivni imunski odgovor muškaraca i žena se razlikuje. Određene polne razlike u imunskom sistemu su prisutne tokom čitavog života, dok su druge prisutne samo tokom reproduktivnog perioda, što ukazuje na to da postoji efekat i gena i hormona. Važno je istaći da polne razlike doprinose razlici u učestalosti autoimunskih i malignih bolesti, podložnosti zaraznim bolestima i odgovoru na vakcine kod muškaraca i žena [4].

Estrogeni i androgeni su opšte poznati kao polni steroidni hormoni, pre svega zbog svog uticaja na tkiva reproduktivnih organa. Međutim, pored ove uloge jasno je pokazano da imaju i fiziološke efekte na kardiovaskularni, centralni nervni, skeletni, kao i na imunski sistem [5]. Može se reći da polni hormoni imaju suprotne efekte na urođeni i adaptivni imunski sistem: estradiol uglavnom pojačava, dok testosteron suprimira imunski odgovor [2]. Veliki broj istraživanja pokazuje kako polni hormoni utiču na imunski odgovor, naročito testosteron, estradiol i progesteron koji mogu uticati direktno na funkcije imunskih ćelija. Polni hormoni utiču na funkcije imunskih ćelija vezivanjem za specifične receptore koji su eksprimirani na mnogim ćelijama uključujući i limfocite, makrofage i dendritske ćelije (DĆ). Vezivanje polnih hormona za specifične receptore direktno utiče na signalne puteve u ćeliji koji dovode do sinteze citokina i hemokina [5]. Polni steroidi takođe mogu uticati na proliferaciju, migraciju i aktivaciju CD4+ i CD8+ T-ćelija, kao i na produkciju antitela [6]. Pokazano je da fiziološke koncentracije estradiola mogu da stimulišu sintezu antitela od strane B-ćelija [7], što može biti jedan od mehanizama odgovornih za veću sintezu antitela kod jedinki ženskog pola u poređenju sa mužjacima. Receptori za steroidne hormone nalaze se na raznim tipovima imunskih ćelija i mogu učestvovati u regulaciji imunskog odgovora delovanjem na transkripcione faktore poput (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) [8], što predstavlja jedan od mehanizama koji doprinosi polnim razlikama u imunskom odgovoru. Kod ljudi je pokazana i korelacija između smanjene sinteze neutrališućih antitela i povećane koncentracije testosterona, u odgovoru na vakcinaciju vakcinom protiv gripa [9]. Uticaj hormona je dozna zavisian, ali takođe zavisi i od gustine ekspresije receptora na samim ćelijama [10], kao i celokupnog mikrookruženja ćelije [11].

Urođeni imunitet predstavlja prvu liniju odbrane od patogena, ali i igra važnu ulogu u aktivaciji, regulaciji i usmeravanju adaptivnog imunskog odgovora [12]. Utvrđene su razlike u sintezi citokina nakon *in vitro* stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi ligandima za receptore za prepoznavanje molekularnih obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs) između osoba muškog i ženskog pola [13,14], kao i u funkcionalnim odgovorima fagocita i antigen prezentujućih ćelija [15–20]. Pored toga, pokazano je da estrogen i testosteron modulišu diferencijaciju/sazrevanje, životni vek i efektorske funkcije ćelija urođenog imuniteta, uključujući neutrofile, makrofage, urođenoubilačke ćelije (engl. *natural killer*, NK) i DĆ [4].

Pol takođe utiče i na razne aspekte adaptivnog imunskog sistema. Polni hormoni direktno utiču na timus i na promene koje se dešavaju u ovom organu tokom starenja [21]. Timus je organ koji ima glavnu ulogu u sazrevanju T limfocita, samim tim i ključnu ulogu u razvoju adaptivnog imunskog sistema. Pokazano je da tokom ranog perioda života mužjaci pacova imaju veće timuse od ženki

pacova, veći broj timocita kao i različitu distribuciju subpopulacija T-ćelija [22]. Uočeno je i da žene (tokom detinjstva, kao i kasnije tokom života) imaju veći broj CD4+ T-ćelija i da je odnos (količnik broja) CD4+/CD8+ T-ćelija pomeren ka CD4+ T-ćelijama u poređenju sa muškarcima, dok muškarci imaju veću učestalost CD8+ T-ćelija [23–26]. Studija Abdullaha i njegovih saradnika [23] je pokazala veći ukupan broj limfocita u perifernoj krvi muškaraca veću zastupljenost B-ćelija u okviru limfocitne populacije kod žena. Takođe, nakon *in vitro* stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi fitohemaglutininom (engl. *phytohemagglutinin*, PHA), kod žena je pronađen veći broj aktiviranih T-ćelija u poređenju sa muškarcima [23]. Poznato je i da kod žena dolazi do veće produkcije specifičnih CD4+ T limfocita u odgovoru na imunizaciju u poređenju sa muškarcima, što je potvrđeno i kod nekih eksperimentalnih životinja [27]. Kod žena je uočena veća citotoksična aktivnost T-ćelija u poređenju sa ćelijama muškaraca. T-ćelije žena stimulisane forbol miristat acetatom (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) i jonomicinom pokazale su povećanu transkripciju antivirusnih i pro-inflamatornih gena u odnosu na iste ćelije muškaraca. Uočeno je i da polovina aktiviranih gena poseduje estrogen-zavisni element (engl. *estrogen response element*) u promotorskom regionu [28].

Aktivnost, kao i distribucija subpopulacija CD4+ T -ćelija razlikuje se između polova [57]. Poliklonska aktivacija u kulturi humanih limfocita periferne krvi sa PHA dovodi do veće produkcije citokina Th2 tipa, uključujući interleukin (IL)-4 i IL-10 od strane limfocita iz periferne krvi žena u poređenju sa limfocitima iz periferne krvi muškaraca [29]. Naivne CD4+ T- ćelije žena preferencijalno proizvode IFN- γ , dok naivne T ćelije muškaraca proizvode više IL-17 [30]. Kod žena dominira Th2 citokinski profil, što može uticati na to da je imunski odgovor žena prevashodno orijentisan na sekreciju IgG1 antitela [29].

Kod žena je pokazan intenzivniji humoralni odgovor u odnosu na humoralni odgovor muškaraca. Bazalni titar imunoglobulina, kao i odgovor antitela na vakcine su veći kod žena nego kod muškaraca. Kod jedinki ženskog pola pronađen je i veći broj B-ćelija, kao i razlika u ekspresiji gena u ovim ćelijama u poređenju sa muškim jedinkama [15,31–33]. Polne razlike u humoralnom odgovoru su značajne zbog toga što odgovor na mnoge vakcine zavise upravo od njega [34].

Genetički diverzitet kao i razlike u ekspresiji gena takođe su faktori koji utiču na polne razlike u imunskom odgovoru. Žene imaju dve kopije X hromozoma, od kojih je jedan nasumično transkripciono inaktivisan, dok muškarci imaju samo jednu kopiju X hromozoma. Mnogi geni na X hromozomu su povezani sa regulacijom funkcija imunskog sistema, kao što su geni koji kodiraju IL-2R γ lanac, IL-3R α lanac, IL-13 α lanac, IL-1R vezanu kinazu 1 (IRAK1), receptor sličan *Toll*-u (engl. *Toll-like receptor*, TLR) 7, GATA1, Foxp (engl. *forkhead box p3*) i CD40 ligand (CD40L). Takođe je pokazano i da mikro RNK koje su kodirane na X hromozomu doprinose razlikama u imunskom odgovoru u smeru jačeg odgovora kod ženki [3]. Polno-specifična ekspresija određenih gena može biti jedan od razloga zbog kog žene razvijaju intenzivniji imunski odgovor u poređenju sa muškarcima.

Metaboliti mikrobiote creva su uključeni u razne signalne puteve imunskog sistema uključujući i diferencijaciju T-ćelija putem vezivanja za receptore na imunskim ćelijama u epitelu creva i drugim tkivima [3]. Stoga polne razlike u mikrobioti mogu doprineti polnom dimorfizmu u imunskom odgovoru.

Smatra se da brojni faktori, kao što su genetski, epigenetski, razlike u nivou hormona, kao i razlike u mikrobioti creva koje postoje između polova, utiču na ishod infekcije i vakcinacije [27]. Verovatno je da razlog postojanja polnih razlika u imunitetu leži u evoluciji i borbi za očuvanjem vrste.

1.1.1. Polne razlike u imunskom odgovoru na vakcine

Polne razlike u imunskom odgovoru, koje su zapažene kako u urođenom tako i u adaptivnom imunskom odgovoru, utiču na razlike u osetljivosti na zarazne bolesti, kao i na polne razlike u odgovoru na vakcine. Žene uglavnom imaju intenzivniji humoralni odgovor na vakcine, ali takođe imaju više neželjenih reakcija na vakcine nego muškarci [27,35]. Neželjene reakcije na vakcine, kao što su groznica, bol i upala na mestu aplikacije se češće javljaju kod žena [36,37]. Ispitivanja na modelima eksperimentalnih životinja su takođe pokazala da odrasle ženke uglavnom razvijaju intenzivniji humoralni odgovor nakon vakcinacije od mužjaka [6]. Nakon vakcinacije u detinjstvu ili odraslom dobu protiv gripa, žute groznice, rubeola, malih boginja, zaušaka, hepatitisa A i B, herpes simpleksa 2, besnila, i denga virusa, žene mogu sintetisati čak duplo više zaštitnih antitela u poređenju sa muškarcima [36]. Takođe je za neke vakcine pokazano da izazivaju jači ćelijski posredovan odgovor kod žena u poređenju sa muškarcima [38]. Ipak treba napomenuti da postoje i vakcine koje izazivaju jednak ili jači imunski odgovor kod muškaraca u poređenju sa ženama [36].

Iako mnoga istraživanja pokazuju da se imunski odgovor na vakcinu razlikuje između polova, mehanizmi koji dovode do ovih razlika nisu još uvek dovoljno rasvetljeni. Biološke razlike, kao i razlike u ponašanju između polova doprinose polnim razlikama u odgovoru na vakcinaciju. Imunološke, hormonske, genetske kao i razlike u sastavu mikrobiote između mužjaka i ženki takođe mogu uticati na odgovor na vakcinu. Pronalaženje načina da se smanje neželjeni efekti kod žena i poveća efikasnost imunskog odgovora kod muškaraca je neophodno kako bi se jedinke oba pola adekvatno zaštitile od zaraznih bolesti [9,27,39].

1.2. Grip i vakcina protiv gripa

1.2.1. Virus gripa

Grip je veoma zarazno akutno oboljenje respiratornog trakta koje pogađa sve starosne kategorije i čiji je izazivač virus gripa. Oboljenje ima sezonski karakter, ali su se, sporadično javljale i pandemije. U proteklih 100 godina, zabeležene su četiri pandemije koje su odnele milione života. Procena je Svetske zdravstvene organizacije (SZO) da svake godine, 5-15 % populacije bude inficirano virusom gripa u epidemijama. Pretpostavka je da gotovo 1 bilion osoba godišnje oboli od ove bolesti, a od tog broja 3 do 5 miliona razvije tešku formu bolesti, dok 250 000 do 500 000 infekcija ima smrtni ishod [40]

Virus gripa pripada porodici *Orthomyxoviridae*. Razlikuju se 4 tipa ovog virusa (A, B, C i D), od kojih su za humanu patologiju značajni tipovi A i B [41,42]. Virusne čestice (virion) gripa tipa A i B su sfernog (100 nm) ili filamentoznog (300 nm) oblika i sastoji se od nukleokapsida oko koga se nalazi omotač koji je poreklom od citoplazmatske membrane ćelije. Genom gripa je segmentirani negativni RNK lanac za čiju replikaciju je neophodna RNK zavisna RNK polimeraza virusnog porekla. Matriksi protein (M protein) 1 obuhvata jezgro viriona i nalazi se sa unutrašnje strane omotača [43]. Od ovog proteina polaze spoljašnji glikoproteinski izdanci – hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA), kao i jonski kanali M2. HA omogućava vezivanje virusa za receptor na ćeliji domaćina i infekciju i on je glavni antigen virusa, dok NA ima ulogu pri oslobađanju virusa iz ćelije. Kontinuirana evolucija virusa i nastanak epidemija i pandemija su upravo omogućeni varijabilnošću HA antigena [41,44]. Neutrališćum antitelima, tj. antitelima koja neutrališu aktivnost virusa i sprečavaju infekciju smatraju se antitela specifična za HA [42], dok antitela specifična za NA ne sprečavaju infekciju, ali ograničavaju širenje virusa [44]. Ovaj virus karakterišu veoma česte promene antigenskih karakteristika što mu omogućava da izbegne adaptivni imunski odgovor domaćina. Mehanizmi antigenskih promena su označeni kao antigensko skretanje (engl. *drift*) i antigenske izmene (engl. *shift*) [24,43] Antigensko skretanje su manje antigenske promene koje se često javljaju i nastaju usled tačkastih mutacija u genomu virusa tokom njegove replikacije. Odgovorne su za pojavu novih sojeva i epidemijsko širenje virusa [45–47]. Antigenske izmene su značajnije promene u genomu virusa i tada virus stiče antigenski potpuno nov HA. One nisu tako

česte i nastaju rekombinacijama genetskog materijala između dva ili više virusa u inficiranim ćelijama ptica ili svinja [44]. Ovakve promene mogu rezultovati pojavom novog, izuzetno virulentnog soja virusa i nastanka pandemije [42] i karakteristika su, pre svega, virusa tip A [42,44]. Tip A virusa gripa se može podeliti na subtipove na osnovu varijacija u HA i NA antigenima [44]. Poznato je 18 različitih subtipova HA i 11 subtipova NA. Trenutno su u cirkulaciji subtipovi virusa influence A/H1N1 i A/H3N2. Virusi tipa B se dele na linije i trenutno cirkulišu linije Yamagata i Victoria (www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.html) [42]

1.2.2. Vakcina protiv gripa

Vakcina protiv gripa je sigurno, efikasno i glavno sredstvo za zaštitu od gripa i sprečavanje širenja epidemija. Nakon izolacije virusa gripa 1933. godine ubrzo je usledio razvoj prve generacije živih atenuisanih vakcina protiv gripa. Prva inaktivisana vakcina protiv gripa bila je monovalentna vakcina protiv A soja virusa influence. Godine 1942. otkriven je B soj virusa i tada je napravljena prva dvovalentna vakcina. Kasnije je otkriveno da virus gripa ima sposobnost da mutira, tako da od 1973. godine SZO izdaje preporuke za sastav vakcine na godišnjem nivou na osnovu rezultata sistema nadzora koji identifikuju aktuelne sojeve. Prva trovalentna vakcina nastala je 1978. godine i sadržala je dva tipa virusa A soja i jedan virus B soja virusa gripa. Godine 2012. u Americi je proizvedena četvorovalentna vakcina protiv gripa koja uključuje po dva tipa virusa gripa A i B soja. Vakcina se razvijala kroz istoriju, da bi odgovorila evoluciji samog virusa gripa [48].

Kvantitet i kvalitet imunskog odgovora na vakcinaciju zavisi od količine antigena koji ulazi u sastav vakcine, tipa vakcine, kao i od broja doza vakcine i načina imunizacije [49]. Prema tome, moglo bi se očekivati da polni dimorfizam u imunskom odgovoru može zavistiti i od ovih varijabli. Budući da su antigenske varijacije virusa gripa česte i da je zaštita sojno-specifična, optimalna zaštita od gripa se postiže godišnjom vakcinacijom [50]. Sastav sezonske vakcine se formira na godišnjem nivou prema predviđanjima SZO, a na osnovu podataka prikupljenih od Globalnog sistema za nadzor i odgovor na grip, partnerstva 141 nacionalnog centra za influencu u 111 zemalja, šest SZO centara i 4 SZO regulatorne laboratorije [51].

Sezonske vakcine protiv gripa mogu biti trovalentne, ukoliko sadrže dva tipa virusa influence A soja i jedan tip virusa influence B soja, ili četvorovalentne, ukoliko sadrže po dva tipa virusa influence A i B soja [51]. Razvijeno je ili je u fazama razvoja nekoliko tipova vakcina protiv gripa [52]. U najširoj upotrebi su inaktivisane (mrtve) vakcine, koje postoje u tri formulacije: celovirusna, *split* i subjedinična vakcina. Formulacije se razlikuju po komponentama virusa koje sadrže [51]. Celovirusne inaktivisane vakcine (CIV) su prve razvijene i korišćene za sezonsku imunizaciju protiv gripa. Dobijaju se inaktivacijom virusa β -propiolaktinom ili formaldehidom, pri čemu sastav i struktura virusne čestice ostaju očuvani. *Split* inaktivisane vakcine (SV), koje se danas najčešće koriste, proizvode se na isti način kao i CIV uz dodatni tretman deterdžentima čime se odstranjuje lipidni omotač i gubi struktura virusne čestice i većina virusnih jednolančanih RNK i umanjuje njena imunogenost [53]. Subjedinične vakcine sadrže samo HA i NA proteine. Tradicionalno se dobijaju dodatnim ekstrahovanjem, prečišćavanjem i koncentrovanjem *split* vakcina, a moguće ih je dobiti i primenom tehnologije rekombinantne DNK [52]. Iako postoje podaci koji ukazuju na polne razlike u odgovoru na vakcinu protiv gripa [54,55], nema podataka o polnim razlikama u imunskom odgovoru na različite tipove vakcine protiv gripa.

1.3. Humoralni imunski odgovor

Za mnoge vakcine, uključujući i vakcinu protiv gripa, se zna da obezbeđuju zaštitu pokretanjem, pre svega, humoralnog imunskog odgovora, stimulacijom produkcije neutrališućih antitela i stvaranjem memorijskih ćelija [56]. Humoralni imunski odgovor posredovan je antitelima i igra ključnu ulogu u odbrani organizma od različitih patogena. U zavisnosti od toga da li je za produkciju antitela potrebna ili nije potrebna pomoć T-ćelija, deli se na T-nezavisni i T-zavisni imunski odgovor. T-nezavisan odgovor obezbeđuje brzu reakciju na infekciju i uključuje subpopulacije B-ćelija kao što

su B1 ćelije i B-ćelije marginalne zone koje proizvode antitela niskog afiniteta. U T-zavisnom imunskom odgovoru T-ćelije pomažu u produkciji visoko-afinitetnih antitela i formiranju memorijskog imunskog odgovora [57]. Ključnu ulogu u formiranju T-zavisnog imunskog odgovora u sekundarnim limfnim organima imaju germinativni centri (GC) limfnih folikula [58]. Germinativni centar je specijalizovana struktura u sekundarnim limfnim organima i sastoji se od tamne zone u kojoj aktivirani B limfociti proliferišu i podležu promeni izotipa teškog lanca i somatskim hipermutacijama, i svetle zone gde T-ćelije selektivno pružaju podršku B-ćelijama koje imaju receptore visokog afiniteta da se diferenciraju u plazma ćelije i memorijske ćelije, ili ih vraćaju nazad u tamnu zonu gde podležu ponovnim somatskim hipermutacijama [59].

1.3.1.B-ćelije

U GC imunoglobulinski geni antigenom stimulisanih B-ćelija podležu mnogobrojnim tačkastim mutacijama (somatske hipermutacije) što dovodi do porasta afiniteta antitela za antigen. Većina GC B-ćelija prolazi i kroz proces promene izotipa teškog lanca (promena klase), što omogućava da se proizvode antitela sa specijalizovanim efektorskim funkcijama. Transkripcioni faktor Bcl-6 (engl. *B cell lymphoma 6*) je glavni regulator diferencijacije GC B-ćelija, jer posreduje u represiji ekspresije gena koji suprimiraju ćelijski ciklus i koji inhibiraju gene odgovorne za aktivaciju B-ćelija i diferencijaciju u plazma ćelije i memorijske B-ćelije. B-ćelije GC koje podležu somatskim hipermutacijama imaju sposobnost da izuzetno brzo proliferišu i na taj način stvaraju veliki broj mutacija u genima koji kodiraju za imunoglobuline, stvarajući na taj način mogućnost za selekciju antitela visokog afiniteta. Ove ćelije podležu pro-apoptotskom programu koji obezbeđuje brzu eliminaciju B-ćelija koje ekspresiraju antitela sa suboptimalnom jačinom vezivanja. GC B-ćelije koje sintetizuju antitela visokog afiniteta su selektovane da se dalje diferenciraju u plazma ćelije i memorijske B-ćelije kroz specifične promene ekspresije gena koji koordinisano regulišu proliferaciju, apoptozu i diferencijaciju [59]. Dakle, aktivirane B-ćelije mogu da se diferenciraju u kratkoživeće antitelo-sekretujuće plazma ćelije ili odlaze u GC gde prolaze kroz sazrevanje afiniteta B-ćelijskog receptora (engl. *B cell receptor*, BCR), klonalnu diverzifikaciju i promenu izotipa. GC B-ćelije nakon interakcije sa folikularnim pomoćničkim T (engl. *T follicular helper cells*, Tfh) ćelijama, podležu klonskoj ekspanziji. Pozitivnu selekciju GC B-ćelija podstiču signali koje ćelija dobija posredstvom BCR, ali i CD40 molekula, a koje obezbeđuje CD40L na Tfh ćelijama [60].

Kod ljudi postoji pet izotipova (klasa) imunoglobulina, tj. antitela: IgG, IgM, IgA, IgE i IgD, koji se razlikuju po tipu teškog lanca koji ulazi u njihov sastav. Varijacije teškog lanca omogućavaju da svaki izotip imunoglobulina ima ulogu u različitom tipu imunskog odgovora ili tokom različitim fazama odbrane domaćina [61]. Antitela klase IgA mogu aktivno da se sekretuju kroz epitele mukoza, otporna su na digestiju, mogu da aktiviraju komplement i da se vežu za Fc α receptore. Antitela klase IgD ekspimirana su na površini zrelih naivnih B limfocita [12]. Antitela klase IgE su ekspimirana na površini zrelih B-ćelija i u saradnji sa eozinofilima koji poseduju Fc receptore za IgE učestvuju u eliminaciji helminata; takođe posreduju i u alergijskim reakcijama [12]. Antitela klase IgM su prva antitela koja se stvaraju u primarnom imunskom odgovoru i ona aktiviraju komplement [12]. Antitela klase IgG su ekspimirana na površini zrelih B-ćelija i najzastupljenija su klasa antitela u serumu [12]. Vezuju se za Fc γ receptore na fagocitima i mogu da aktiviraju komplement. Antitela ove klase prenose se sa majke na fetus prolaskom kroz placentu [12,61].

Inaktivisane vakcine protiv gripa prevashodno indukuju stvaranje specifičnih antitela G klase [62]. Antitela IgG klase se kod ljudi mogu podeliti u četiri potklase IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 koje se razlikuju prema strukturi i funkciji [63]. Kod miševa, takođe, postoje četiri potklase IgG antitela: IgG1, IgG2a/IgG2c, IgG2b i IgG3 koje se razlikuju na osnovu svojih bioloških, imunoloških i fizičko-hemijskih svojstava [64]. Za IgG1 potklasom antitela pokazano je da imaju ulogu u neutralizaciji virusa [65]. Produkcija IgG2a antitela je posebno važna za odbranu od virusnih infekcija [65,66]. Ova uloga IgG2a antitela povezana je sa njihovom sposobnošću da aktiviraju

sistem komplemента [67], da se vežu za Fc γ receptore ekspimirane na fagocitima [68] i indukuju antitelima-posredovanu ćelijsku citotoksičnost [69].

1.3.2. Folikulske pomoćničke T-ćelije

Formiranje GC je ključno za nastanak visoko-afinitetnih memorijskih B-ćelija i dugoživećih plazma ćelija koje sekretuju antitela kao odgovor na infekcije patogenima ili na vakcinaciju [70]. Folikulske pomoćničke T-ćelije su specijalizovana subpopulacija Th-ćelija koje imaju ključnu ulogu u formiranju GC i pružanju pomoći B-ćelijama. Ove ćelije pomažu B-ćelijama GC putem ekspresije CD40L molekula, kao i sekrecijom IL-21 citokina koji stimulišu rast i preživljavanje B-ćelija [71], ali takođe i sekrecijom interferona (IFN)- γ ili IL-4, koji mogu učestvovati u promeni klase antitela [72]. Dobro je poznato da su CD28/B7 i CD40L/CD40 interakcije potrebne za aktivaciju CD4+ T-ćelija i B-ćelija da bi podržale stvaranje GC. Inducibilni T-ćelijski kostimulator (engl. *inducible T cell co-stimulator*, ICOS) je član familije CD28 proteina, ekspimiran je na T-ćelijama i neophodan je za podsticanje ekspresije CXCR5 molekula na CD4+ T-ćelijama. Njegov ligand, B7RP-1 ekspimiran je na B-ćelijama [73]. Interakcija između CD40L (na Tfh ćelijama) i CD40 (na DĆ i B-ćelijama) dovodi do produkcije citokina, ekspresije kostimulatornih molekula na površini DĆ i omogućava unakrsnu prezentaciju antigena. Dakle, CD40L/CD40 interakcija pospešuje sazrevanje DĆ i razvoj njihovih karakteristika koje su od značaja za efikasno stimulisanje aktivacije i diferencijacije T-ćelija [74]. Signalizacija putem CD40 kod B-ćelija pospešuje stvaranje GC, promenu izotipa imunoglobulina, somatske hipermutacije imunoglobulina u cilju povećanja afiniteta za antigen i formiranje dugoživećih plazma ćelija i memorijskih B-ćelija [74].

Proces nastanka Tfh ćelija ima više stadijuma, a započinje kontaktom između DĆ i pre-Tfh (naivnih CD4+T-ćelija) [75]. Nakon kontakta sa kostimulatorima i antigenom prezentovanim od strane DĆ, pre-Tfh ćelije povećavaju ekspresiju hemokinskog receptora CXCR5 i Bcl-6 [76]. Bcl-6 je glavni transkripcioni faktor za diferencijaciju Tfh i folikulskih regulatornih T (engl. *T follicular regulatory cells*, Tfr) ćelija [76]. Poznato je da Bcl-6 ima ulogu u represiji Blimp (engl. *B lymphocyte-induced maturation protein*) - 1, ali i u regulaciji ekspresije mnogih drugih gena neophodnih za diferencijaciju Tfh ćelija usled imunizacije ili virusne infekcije, iako sam mehanizam nije do kraja razjašnjen [70].

Molekul CXCR5 omogućava migraciju Tfh ćelija ka folikulu u kome se nalaze B-ćelije i rezidentne folikulske DĆ koje proizvode CXCL13, ligand za CXCR5 [77]. Tako da ove, rane folikulske T-ćelije ekspimiraju hemokinski receptor CXCR5, odlaze na granicu limfnog folikula gde podležu daljoj diferencijaciji. Ova faza je rezultat interakcija između T-ćelija i DĆ i nezavisna je od B-ćelija [78]. Tfh ćelije dalje sazrevaju ako ostvare produženi kontakt sa B-ćelijama, koje im prezentuju antigen [77]. Ove ćelije sintetišu IL-4 i IL-21 citokine koji utiču na aktivaciju B-ćelija [79]. Aktivirane T-ćelije potom se diferenciraju u zrele Tfh ćelije koje karakteriše ekspresija brojnih markera kao što su receptor programirane smrti (engl. *programmed cell death protein*, PD)-1, kostimulatorni molekuli ICOS, CD40L, OX40 itd. [80]. Ovi molekuli posreduju u interakcijama između T- i B-ćelija koje su ključne za formiranje GC. Ove interakcije sa B-ćelijama indukuju dalju diferencijaciju Tfh ćelija u GC Tfh ćelije koje ekspimiraju GL7 [81]. Visoko aktivirane Tfh ćelije GC ekspimiraju visoke nivoe CXCR5 i PD-1 molekula i razlikuju se od folikulskih ćelija koje ekspimiraju srednje visoki nivo oba markera [82]. Zbog svoje ključne uloge u stvaranju visoko-afinitetnih antitela, Tfh ćelije su neophodne za stvaranje efikasnog humoralnog imunskog odgovora [57].

Za razvoj humoralnog imunskog odgovora na infekciju virusom gripa, kao i na vakcinu, Tfh ćelije igraju ključnu ulogu [83]. Kao što je već pomenuto, poznato je da starenje ima veliki uticaj na funkciju CD4+ T-ćelija kao i na humoralni imunitet, međutim uticaj starenja na antigen specifični odgovor Tfh ćelija nije razjašnjen. Kod mladih i starih miševa se usled infekcije virusom gripa stvara sličan broj Tfh ćelija, ali se te ćelije značajno razlikuju kod starih i mladih miševa [84]. Promene

kod starih uključuju smanjenu ekspresiju ICOS-a kao i povećanu produkciju citokina IL-10 i IFN- γ , što potencijalno narušava interakciju sa B-ćelijama [76]. Slična ekspresija Bcl-6 primećena je i kod mladih i kod starih miševa i na Tfh i Tfr ćelijama [76]. Veća ekspresija Bcl-6 primećena je kod starih na CD4+CXCR5-FoxP3 \pm prekursora folikulskih ćelija [76]. Takođe je pokazano da kod starih osoba veći broj ćelija specifičnih za virus gripa ispoljava regulatorni fenotip, što može doprineti oslabljenoj funkciji Tfh ćelija kod starih [76]. Starenje ćelija kao i samog miljea koji ih okružuje utiče na funkciju i formiranje antigen-specifičnih Tfh ćelija, što značajno utiče na smanjenje efikasnosti humoralnog imunskog odgovora [84].

Starenjem se smanjuje efikasnost imuniteta uključujući i smanjenu proizvodnju visokoafinitetnih antitela, što vodi ka većoj osetljivosti na patogene poput gripa. Antitela visokog afiniteta stvaraju B-ćelije selektovane u GC, a formiranje samih GC zavisi od pravilne funkcije Tfh ćelija [85]. Uticaj starenja na stupnjeve u sazrevanju Tfh ćelija nije ispitan.

1.3.3. Folikulske regulatorne T-ćelije

Regulatorne T-ćelije održavaju toleranciju na sopstvene antigene i imunsku homeostazu, suprimirajući aktivaciju, proliferaciju i modulišući efektorske funkcije drugih ćelija imunskog sistema. Regulatorne T-ćelije nastaju u timusu (prirodne regulatorne T-ćelije) ili u perifernim tkivima (indukovane regulatorne T-ćelije) [86]. Prirodne regulatorne ćelije ekspimiraju CD25 površinski marker (CD25 je α subjedinica IL-2 receptora i omogućava proliferaciju tih ćelija) kao i transkripcioni faktor Foxp3 [88]. Ove ćelije sazrevaju i migriraju iz timusa čineći oko 5-10% periferne populacije T-ćelija kod miševa. Indukovane T regulatorne ćelije nastaju tokom imunskog odgovora od naivnih CD4+CD25- ili CD8+CD25- T-ćelija na periferiji i imaju drugačije karakteristike od prirodnih T regulatornih ćelija [86]. Na periferiji u zavisnosti od stimulusa mogu nastati različite T regulatorne ćelije: u prisustvu samo antigena nastaju klasične CD4+CD25+ T regulatorne ćelije; u prisustvu IL-10 nastaju T regulatorne ćelije 1 koje proizvode velike količine IL-10; u prisustvu faktora transformacije rasta- β (engl. *transforming growth factor*- β , TGF- β), nastaju Th3 T regulatorne ćelije, koje proizvode velike količine TGF- β . Pored CD4+ T regulatornih limfocita, postoje CD8+ regulatorne T-ćelije, koje sintetišu širok spektar citokina, između ostalih i IL-10 [87].

Tfr ćelije su podtip Foxp3+ regulatornih ćelija koje imaju ključnu ulogu u diferencijaciji plazma ćelija u GC. Ove ćelije sprečavaju prekomernu proliferaciju Tfh i GC B-ćelija, ali i pospešuju selekciju visoko-afinitetnih B-ćelija [88]. Inicijalno se smatralo da su Tfr ćelije poreklom iz timusa. Pokazano je da 97% ovih ćelija ekspimiraju Helios, transkripcioni faktor koji ekspimiraju Treg ćelije poreklom iz timusa. Međutim, Tfr ćelije nisu pronađene u timusu već vode poreklo od prirodnih regulatornih T-ćelija poreklom iz timusa, koje su indukovane na periferiji. Diferencijacija i sazrevanje Tfr ćelija zahteva višestruku stimulaciju koja se odvija u perifernim limfnim organima [89]. Za razliku od regulatornih T-ćelija koje ekspimiraju CD25 i čiji nastanak kao i funkcija zavise od citokina IL-2, Tfr ćelije takođe ekspimiraju i Bcl-6 transkripcioni faktor koji je ekspimiran i u Tfh ćelijama i koji biva inhibiran od strane IL-2 citokina. Za razliku od ostalih subtipova T regulatornih ćelija, zrele Tfr ćelije snižavaju ekspresiju CD25 molekula što dovodi do toga da je njihov fenotip između Tfh i regulatornih T-ćelija, dok zadržavaju svoju regulatornu funkciju. Ove ćelije predstavljaju IL-2 nezavisnu grupu efektorskih T-ćelija koje gube ekspresiju CD25 molekula dok im se povećava ekspresija Bcl-6 i CXCR5 molekula koji su karakteristični za Tfh ćelije. Ovaj tip ćelija je detektovan i kod ljudi i kod miševa [90]. Snižena ekspresija CD25 molekula može biti marker razvoja Tfr ćelija, gde prvo nastaju CD25+ Tfr ćelije, da bi se kasnije formirale visoko diferencirane CD25- Tfr ćelije [57]. Analiza hemokinskih receptora i adhezivnih molekula je pokazala da ove ćelije ekspimiraju povećan nivo CXCR5 i PD-1, dok snižavaju ekspresiju CCR7, što je u vezi sa njihovom lokalizacijom u GC [90].

Pretpostavka je, dakle, da Tfr ćelije koje eksprimiraju CD25 i umerene nivoe CXCR5, PD-1 i Bcl-6 i nalaze se u B-ćelijskom folikulu, mogu predstavljati ranu fazu u njihovoj diferencijaciji. Gubitak ekspresije CD25 molekula kao i visoka ekspresija CXCR5, Bcl-6 i PD-1 molekula koja je primećena kod podgrupe folikulskih regulatornih ćelija miševa, korelira sa njihovom lokalizacijom u GC [57].

Interleukin-21 je citokin koga proizvode T-ćelije. U sinergiji sa IL-7 i IL-15 deluje na proliferaciju i aktivaciju CD8⁺ T-ćelija. Takođe pojačava aktivnost uređenoubilačkih ćelija. Citokin IL-21 pokreće diferencijaciju Tfh ćelija, koje su takođe i izvor IL-21 citokina [91]. Citokin IL-21 je glavni citokin koji karakteriše Tfh ćelije i ima ulogu u njihovoj diferencijaciji i održavanju. Pokazano je da visok nivo IL-21 pozitivno reguliše diferencijaciju Tfh ćelija, dok inhibira nastanak i supresivnu funkciju Tfr ćelija. Ovo može biti posledica direktnog delovanja citokina na STAT3 signalni put kod Tfh ćelija, kao i indirektnog delovanja putem Akt signalnog puta kod Tfr ćelija. IL-21 sprečava ekspresiju Foxp3 i diferencijaciju u Tfr ćelije inhibicijom fosforilacije Akt dok aktivira STAT3 signalni put [92]. Ovaj citokin indukuje ekspresiju Bcl-6 koji ograničava ekspresiju CD25 gena, što dovodi do smanjene proliferacije Tfr, dok vodi ka aktivaciji B-ćelija [93]. Dakle IL-21 selektivno pospešuje diferencijaciju Tfh ćelija dok istovremeno inhibira nastajanje Tfr ćelija i ključan je citokin koji učestvuje u nastajanju virus-specifičnih dugoživećih plazma ćelija koje se nalaze u kosnoj srži i proizvode antitela [94].

1.4. Polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa

Poznato je da osetljivost na infekcije, uključujući virusne infekcije, i njihov klinički ishod, zavise od pola. Generalno, muškarci češće oboljevaju i razvijaju teže oblike infektivnih bolesti, dok žene razvijaju intenzivniji proinflamatorni i adaptivni imunski odgovor koji dovodi do bržeg i efikasnijeg uklanjanja patogena. Sa druge strane, ovakav intenzivniji imunski odgovor doprinosi češćem oboljevanju žena od inflamatornih i autoimunskih bolesti [4]. Polne razlike su takođe zapažene i u imunskom odgovoru na vakcinaciju protiv različitih virusnih infekcija, uključujući infekciju virusom gripa. Žene uglavnom stvaraju jači humoralni odgovor na virusne vakcine nego muškarci, dok podaci o polnim razlikama u ćelijskom imunskom odgovoru nisu konzistentni [27]. Međutim, neželjene reakcije na vakcine su takođe značajno češće kod žena nego kod muškaraca [7]. Ovo može biti rezultat činjenice da žene češće prijavljuju neželjene lokalne (bol, otok, crvenilo na mestu uboda) i sistemske reakcije (simptomi nalik gripu: glavobolja, groznica, bol u mišićima i zglobovima; alergijska reakcija na neku od komponenti vakcine) na vakcine u poređenju sa muškarcima [95,96]. S druge strane, moguće je da su izraženije neželjene reakcije na vakcine kod žena posledica bioloških razlika, odnosno snažnijeg inflamatornog odgovora [54].

Efikasnost većine današnjih vakcina, uključujući vakcinu protiv gripa, zavisi od indukcije produkcije serumskih antitela [97]. Stoga, merenje titra virus-specifičnih antitela u serumu predstavlja jednostavan i objektivnan način za procenu ne samo humoralnog imunskog odgovora na vakcinaciju, već i efikasnosti vakcine [97]. Produkcija antitela kao odgovor na vakcinu protiv gripa veća je kod žena u poređenju sa muškarcima [32,98]. Imunizacija sezonskom trovalentnom inaktivisanom vakcinom (TIV) protiv gripa odraslih ljudi (18-49 godina starosti) izazvala je kod žena duplo veću produkciju funkcionalnih serumskih antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B antigene koji su ulazili u sastav vakcine, u poređenju sa titrima antitela kod muškaraca, određenih testom inhibicije hemaglutinacije [98]. Takođe je pokazano da se produkcija antitela nije razlikovala kod žena koje su primile polovinu doze TIV vakcine i muškaraca koji su primili punu dozu [98]. Tokom pandemije virusa gripa 2009. godine među starijim osobama se pokazalo da su žene imale jače unakrsno delovanje antitela protiv H1N1 virusa u poređenju sa muškarcima [99], što sugerišu na to da žene imaju bolju zaštitu pri susretu sa novim sojevima virusa gripa.

Eksperimenti na animalnim modelima takođe pokazuju postojanje polnih razlika u efikasnosti vakcina. Kod odraslih miševa imunizovanih H1N1 i H3N2 virusom gripa, pokazano je da ženke razvijaju jači humoralni odgovor u poređenju sa mužjacima. Nakon vakcinacije ženke miševa su

takođe bile bolje zaštićene pri izlaganju novim sojevima virusa gripa, tj. sojevima koji nisu bili uključeni u vakcinu u odnosu na mužjake, dok su oba pola bila podjednako zaštićena od smrtonosnog izlaganja homologim virusima (sojevi virusa koji su bili uključeni u sastav vakcine) [100].

Produkcija potklasa Ig se povezuje i sa polarizacijom odgovora Th ćelija ka Th1 ili Th2 tipu imunskog odgovora. Th1 ćelije prevashodno proizvode citokin IFN- γ koji stimulira produkciju IgG2a antitela, dok Th2 ćelije sekretuju IL-4 i IL-5, koji stimuliraju produkciju IgG1 antitela kod miševa [65]. Produkcija visoko-afinitetnih antitela posle vakcinacije zavisi i od balansa između Tfr i Tfh ili GC B-ćelija [101]. Podaci u literaturi o polnim razlikama u broju ili funkciji ovih ćelija nakon vakcinacije protiv gripa su vrlo oskudni [102].

1.5. Imunski sistem u starosti

Proces starenja dovodi do promena u morfologiji i funkciji svih organskih sistema, uključujući i imunski sistem. Starenje imunskog sistema se karakteriše brojnim kvantitativnim i kvalitativnim promenama u imunskom sistemu. Istraživanja i na životinjskim modelima i kod ljudi pokazuju da je starenje povezano sa slabljenjem funkcija i urođene i adaptivne imunosti, jer dovodi do promena svih tipova imunskih ćelija i sinteze/oslobađanja cirkulišućih molekula (citokina i drugih medijatora) [2]. Pretpostavlja se da sve ove promene tokom starenja imunskog sistema mogu doprineti povećanoj osetljivosti na infekcije i smanjenom odgovoru na vakcinaciju koji se zapažaju kod starijih osoba, pošto je za uspešnu indukciju protektivnog imunskog odgovora i imunske memorije neophodan potpuno funkcionalan imunski sistem [2].

Grip i komplikacije povezane sa ovom infekcijom vodeći su uzrok smrti u starijoj populaciji [103]. Procenjuje se da 70%-90% smrtnih slučajeva vezanih za oboljevanje od gripa pogađa starije osobe. Takođe, 50%-70% hospitalizacija je vezano za starije ljude [104]. Inaktivisane vakcine protiv gripa koje su danas u širokoj upotrebi, koje su inače vrlo efikasne kod mlađih osoba, manje su efikasne kod starijih osoba [105].

Starenje stanovništva je globalni fenomen. Prema podacima Ujedinjenih nacija broj osoba starijih od 60 godina će se udvostručiti do 2050. godine, a čak utrostručiti do 2100. godine. U 2017. godini broj osoba starijih od 60 godina iznosio je 960 miliona, što bi značilo da bi do 2050. godine njihov broj mogao da se poveća na 2 milijarde i čak 3 milijarde do 2100. godine. U Evropi osobe starije od 60 godina čine 25% populacije, i prema projekciji Ujedinjenih nacija, 2050. godine taj procenat će iznositi 35%. Ovakva demografska preraspodela doneće nove izazove posebno za zdravstveni sistem. Prevencija bolesti putem vakcinacije imala bi ogroman uticaj na poboljšanje kvaliteta života starijih osoba kao i na smanjenje troškova za njihovu brigu i hospitalizaciju [106].

1.5.1. Uticaj starenja na urođeni imunski odgovor

Starenje je praćeno narušavanjem epitelnih barijera kože, pluća i gastrointestinalnog trakta što omogućava patogenima da prodru u mukozu, stoga se urođeni imunitet starih susreće sa dodatnim izazovima. Pokazano je da je starenje praćeno disfunkcijama u urođenom imunitetu [107]. Proces starenja dovodi i do smanjene sposobnosti fagocitoze i smanjene produkcije superoksidnog anjona od strane neutrofila i makrofaga čime se smanjuje njihova sposobnost da odbrane organizam od infekcija [108]. Uočene promene na fagocitima tokom starenja uključuju i slabljenje sposobnosti aktivacije neutrofila kod starih u poređenju sa mladima [109], kao i smanjenu ekspresiju TLR na makrofagama [110]. Procenat urođenoubilačkih ćelija se povećava starenjem, dok neka istraživanja pokazuju da je njihova funkcija smanjena kod starih što se ogleda u smanjenoj citotoksičnosti ovih ćelija i smanjenoj produkciji citokina i hemokina, kao i u smanjenju sposobnosti da uklone tumorske ćelije [108,111]. Starenje utiče na ekspresiju i funkciju PRR koji prepoznaju patogene, kao što su TLR i receptori slični NOD-u (engl. *NOD-like receptors*, NLR), koji su eksprimirani na ćelijama urođene imunosti kao što su makrofage i DC. Ovi receptori imaju važnu ulogu i u započinjanju

adaptivnog imunskog odgovora, kao i u sintezi proinflammatoryh citokina. Uopšteno gledano, funkcije TLR su umanjene na monocitima i DĆ kod starih u poređenju sa mladima, ali ovo zavisi od stadijuma diferencijacije ćelija i tkiva koje se posmatra. Ove promene funkcije TLR tokom starenja remete regulaciju inflamacije i umanjuju sposobnost urođenog imuniteta da pravilno usmerava adaptivni imunski odgovor, što za rezultat ima smanjenu efikasnost odgovora na patogene ili vakcine kod starijih [112]. Dendritske ćelije starih imaju smanjenu sposobnost aktivacije T- i B-ćelija u poređenju sa DĆ mladih. Izmenjena sposobnost stimulacije T-ćelija rezultat je promene ekspresije humanih leukocitnih antigena i izmenjene produkcije citokina, dok je smanjena aktivacija B-ćelija rezultat promena u sposobnosti DĆ da vezuju imunske komplekse. Koncentracija različitih komponenti komplementa takođe se menjaju sa godinama [108].

Starenje je povezano sa hroničnom i sistemskom sterilnom inflamacijom (engl. *inflammaging*), koja se karakteriše povećanjem serumske koncentracije proinflammatoryh citokina (TNF, IL-6 i drugih), i zabeležena je kod ljudi, ali i kod glodara [113–115]. Inflamaciji povezanoj sa starenjem mogu doprineti razni faktori kao što su oštećenja raznih tkiva i organa usled povećane ćelijske smrti i starenja, disfunkcija mitohondrija, aktivacija inflamazoma i NFkB signalnog puta, miRNK, hronične infekcije, hormonske promene, akumulacija reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (engl. *reactive oxygen speaces*, ROS) [116], promene u ishrani, metabolizmu i mikrobioti creva starih [117]. Smatra se da su promene u urođenom imunskom sistemu, naročito u monocitno-makrofagnim ćelijama, ključne za inflamatorno starenje [118], ali je sve više dokaza koji ukazuju na to da stare ćelije uopšte, uključujući stare T- i B-ćelije, imaju važan doprinos zahvaljujući svom sekretornom fenotipu vezanom za starenje (engl. *senescent-associated secretory phenotype*, SASP) [119]. Bez obzira na poreklo, ova sistemska inflamacija je prepoznata kao faktor rizika za mnoge bolesti povezane starenjem, uključujući bolesti srca, starosnu makularnu degeneraciju, dijabetes tipa II, osteoporozu i rak [120]. Takođe, pokazano je da povećan bazalni nivo pro-inflamatornih citokina u krvi umanjuje odgovor na vakcinaciju, pa bi smanjenje koncentracije ovih citokina moglo da bude jedna od strategija za povećanje odgovora na vakcine kod starijih osoba [121].

1.5.2. Uticaj starenja na adaptivni imunski odgovor

B-ćelije i T-ćelije podležu značajnim promenama tokom starenja. Promene se dešavaju na nivou primarnih limfnih organa u kojima sazrevaju ove ćelije, ali i na nivou samih B- i T-ćelija kao rezultat intrinzičnih defekata ovih ćelija tokom starenja i/ili poremećene međusobne interakcije ovih ćelija, što je naročito važno kada je u pitanju odgovor na proteinske antigene [122]. B-ćelije nastaju u kosnoj srži, iz zajedničkih limfoidnih progenitora u kojima se uspešno rearanziraju geni za teški lanac imunoglobulina (pro-B-ćelije). Pro-B-ćelije dalje sazrevaju u pre-B-ćelije (ispoljavaju laki Ig lanac), a zatim u nezrele B-ćelije, koje dalje sazrevaju u kostnoj srži ili migriraju iz koštane srži na periferiju. Diferencijacija pro-B i pre-B-ćelija diktirana je aktivnošću gena za aktivaciju rekombinacije 1 (engl. *recombination activating gene 1*, RAG1) i RAG2 gena. Broj pre-B-ćelija kao i aktivnost VDJ rekombinaze u pre-B-ćelijama smanjuje se tokom starenja [123].

Uticaj starenja na periferne B-ćelije je veoma složen. Smanjenju limfopoeze B-ćelija tokom starenja doprinose kako unutarćelijski defekti u progenitorskim ćelijama, tako i promene u mikrosredini u kostnoj srži koje smanjuju njenu sposobnost da pruži podršku rastu i diferencijaciji B-ćelija [124]. Uprkos smanjenoj produkciji B-ćelija u kostnoj srži kod starih, njihov broj na periferiji ostaje skoro konstantan, ali se njihove karakteristike razlikuju od mladih. Jedan od razloga jeste taj što starenjem pored smanjene produkcije naivnih B-limfocita dolazi do produženja dugovečnosti perifernih B-limfocita [125]. Takođe je kod starih primećeno da se javlja oligoklonska ekspanzija B-ćelija povezana sa ekspresijom CD5, produkcija imunoglobulina nezavisna od T-ćelija i produkcija niskoafinitetnih autoantitela [126]. Istraživanja na miševima i ljudima su pokazala da starenje dovodi do promena unutar B-ćelija koje uključuju smanjenu ekspresiju kostimulatornih molekula, oštećenja u signalnim putevima BCR [127,128], kao i smanjenju titra i afiniteta antitela u poređenju

sa mladima [129]. Pokazano je da su interakcije između T- i B-ćelija poremećene kod starih miševa [130] i ljudi [131]. Nedostaci u funkciji Th ćelija koji se javljaju starenjem [132] značajno utiču na humoralni imunitet budući da su ove ćelije neophodne za formiranje GC i produkciju citokina [133]. Sinteza antitela kod starijih osoba je smanjena kao posledica najmanje dva mehanizma: 1) nesposobnosti stvaranja dovoljnog broja ćelija koje proizvode visoko-afinitetna antitela usled poremećenog formiranja GC kod starih i 2) promene u mikrosredini u kostnoj srži gde se više ne favorizuje opstanak dugoživećih B-ćelija koje proizvode antitela [134].

Humoralni imunski odgovor uspostavljen u mladosti, pre početka imunološkog starenja može trajati i biti efikasan i duboko u starost. Interesantan primer jeste serološko ispitivanje ljudi koji su preživeli pandemiju velikog kašlja 1918. godine, kod kojih je, i 90 godina nakon epidemije, pokazano prisustvo zaštitnih antitela u krvi [135]. Slično tome, T-ćelijska memorija (CD4+ i CD8+ memorijske T-ćelije) nastala u mladosti uglavnom pruža dobru zaštitu i u starosti, dok memorijske T-ćelije nastale od naivnih T-limfocita starih nisu toliko efikasne [136]. Ovi nalazi sugerisu da je stvaranje imunskog odgovora na nove antigene patogeni, vakcina ili tumora, kod starih značajno slabije u poređenju sa mladima [135,136]. Iako su neki mehanizmi koji doprinose smanjenom humoralnom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod starih jedinki opisani [137,138], svi mehanizmi još uvek nisu razjašnjeni. Još manje je poznato koji su mehanizmi odgovorni za polni dimorfizam u odgovoru na vakcinu protiv gripa kod starih jedinki, a posebno u čemu se oni razlikuju u odnosu na mehanizme odgovorne za imunski odgovor na vakcinaciju kod mladih.

Ćelijska imunost (imunost posredovana T-ćelijama) takođe podleže značajnim promenama tokom starenja. Atrofija timusa, primarnog limfnog organa u kome T-ćelije sazrevaju i postaju kompetentne da odgovore na stimulaciju antigenom, je jedna od najizraženijih promena koje pogađaju imunski sistem tokom starenja. Starenjem dolazi do smanjenja samog organa, kao i do smanjenja broja timocita, što se naziva involucija timusa. Kod timusa starih ljudi masa organa se smanjuje, a funkcionalno tkivo biva zamenjeno masnim tkivom [139]. Funkcija samog timusa u vidu produkcije novih T-ćelija se smanjuje starenjem [133]. Međutim, uprkos smanjenoj timopoezi, zahvaljujući aktivaciji homeostatskih mehanizama, ukupan broj T-limfocita kod starih ostaje skoro identičan kao kod mladih. Ovi mehanizmi održavanja broja T-ćelija, uključuju proliferaciju memorijskih ćelija što uz smanjenu produkciju naivnih T-limfocita za posledicu ima smanjenje T-ćelijskog repertoara, odnosno smanjenje efikasnosti imunskog odgovora na nove antigene [140]. Odnos između broja naivnih i memorijskih ćelija se starenjem pomera ka memorijskim ćelijama.

Pored toga što starenjem dolazi do smanjene produkcije naivnih T-ćelija, ove ćelije kod starih takođe ispoljavaju brojne funkcionalne nedostatke u vidu skraćivanja telomera, smanjene produkcije IL-2 citokina, slabije ekspanzije i diferencije u efektorske ćelije, u poređenju sa ćelijama mladih [136,141,142]. Sposobnost uspostavljanja efikasnog imunskog odgovora na nove antigene se smanjuje starenjem i kao posledica ovih promena. Smanjenje broja naivnih T-ćelija praćeno je porastom broja memorijskih i efektorskih ćelija. Smanjenje produkcije zaštitnih antitela kao odgovor na vakcinaciju kod starih je u korelaciji sa nakupljanjem CD8+ efektorskih T-ćelija [140]. Ove efektorske ćelije pokazuju promene u fenotipu u vidu gubitka ekspresije kostimulatornih molekula kao što je CD28 [143]. Kod CD4+ T-ćelija gubitak CD28 kostimulatornog molekula je praćen istovremenim opadanjem ekspresije CD40L, što za posledicu ima smanjenje kapaciteta CD4+ T-ćelija da pomognu B-ćelijama da proliferišu i proizvode antitela [143]. Takođe je uočeno i povećano prisustvo prirodnih regulatornih T-ćelija kod starih u poređenju sa mladima, što može doprineti slabijem imunskom odgovoru u ovoj starosnoj grupi [144].

Podaci sugerisu da ključni uzroci štetnih promena u imunskom odgovoru kod starih mogu biti izazvani promenama u ćelijskom miljeu (mikrosredini) koje uključuju promene u koncentraciji hormona i citokina, a koji utiču na aktivnost imunskih ćelija [133].

1.6. Uticaj genetskih faktora na imunski odgovor na vakcinu protiv gripa

Pokazano je da genetska osnova pojedinca utiče na imunski odgovor na vakcinu protiv gripa [145–147]. Ovaj fenomen se povezuje sa polimorfizmima gena koji kodiraju proteine uključene u imunski odgovor [148]. Takođe, različit nivo ekspresije gena kod različitih individua utiče na odgovor na vakcine. Na primer, pokazano je da ljudi koji imaju povećanu ekspresiju gena koji učestvuju u ranoj ekspresiji signalizacije putem interferona i gena uključenih u obradu i prezentaciju antigena imaju intenzivniji humoralni odgovor na trovalentnu vakcinu protiv gripa [149].

Poznato je da brojni geni na X hromozomu učestvuju u regulaciji funkcije imunskog sistema, te stoga imaju uticaja i na nastanak polno-specifičnih razlika u imunskom odgovoru [150]. Neki autori preporučuju da se istraživanja polnog dimorfizma u imunskom odgovoru sprovode na razrođenim (engl. *outbred*) sojevima miševa i pacova, jer se kod njih ne gubi uticaj inaktivacije X hromozoma, što se inače dešava kod visokosrodnih (engl. *inbred*) životinja. Heterogenost genetički nesrodnih sojeva glodara u genetskom smislu (iako ograničena) mnogo više odgovara heterogenosti humane populacije [150]. Hromozom Y takođe sadrži brojne regulatorne gene i polimorfizmi gena na Y hromozomu takođe mogu uticati na polne razlike u imunskom odgovoru i otpornosti na virusne infekcije [151].

Različiti inbredni laboratorijski sojevi miša takođe pokazuju varijabilnost u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa [152,153]. Miševi BALB/c soja uglavnom razvijaju Th2 tip odgovora, koji je povezan sa produkcijom IgG1 antitela [65], dok se kod C57BL/6 soja miševa predominantno razvija Th1 tip imunskog odgovora koji se karakteriše većom produkcijom IgG2 antitela [154]. U mnogim istraživanjima vezanim za ispitivanje imunskog odgovora na infekciju virusom gripa ili vakcinu protiv gripa koriste se visokosrodni miševi C57BL/6 i BALB/c soja. Retka su istraživanja u kojima je imunski odgovor na vakcinu protiv gripa direktno poređen između ova dva soja, dok polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa ni u jednom od ova dva soja do sada nisu ispitivane.

2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu ono što je prethodno navedeno, definisani su sledeći ciljevi doktorske disertacije:

I Da se ispita postojanje polnih razlika u humoralnom imunskom odgovoru (kroz analizu titra IgG antitela specifičnih za antigene virusnih sojeva koji su sadržani u CIV u serumu, njihovog aviditeta i zastupljenosti potklasa koje ulaze u njihov sastav) na vakcinu protiv gripa kod mladih odraslih genetički nesrodnih *Swiss* miševa.

II Ukoliko se pokaže da postoje polne razlike u humoralnom imunskom odgovoru na vakcinu/e protiv gripa, da se ispita da li one zavise od a) tipa vaccine (korišćenjem pored CIV i SV), b) genetičkih karakteristika miševa uključivanjem u ispitivanje genetički visokosrodnih BALB/c i C57BL/6 miševa) i c) uzrasta životinja (uključivanjem u ispitivanje starih miševa odgovarajućih sojeva).

III Ukoliko se pokaže da postoje polne razlike u humoralnom imunskom odgovoru (polni diergizam) na vakcinu protiv gripa da se ispitaju celularni i molekularni mehanizmi koji se nalaze u njihovoj osnovi analizom: a) proliferativnog odgovora B-splenocita i CD4+ splenocita izolovanih iz miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa na restimulaciju antigenima sadržanim u ispitivanoj vakcini u kulturi; b) zastupljenosti Tfh, Tfr i GC B-ćelija u populaciji sveže izolovanih splenocita miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa; c) zastupljenosti CD4+ ćelija koje su specifične za antigene u vakcini protiv gripa i koje sintetišu IL-21, citokin koji ima ključnu ulogu u diferencijaciji B -ćelija u plazma ćelije koje sintetišu antitela, u slezini miševa imunizovanih ispitivanom vakcinom i d) citokinskog profila Th splenocita koji sintetišu citokine koji oblikuju zastupljenost potklasa IgG specifičnih za antigene sojeva virusa gripa koji su sadržani u vakcini kojom su miševi imunizovani, a nakon restimulacije istim antigenima u kulturi.

3.MATERIJAL I METODE

3.1.Ogledne životinje

U eksperimentalnom radu korišćene su ženke i mužjaci genetički nesrodnog (engl. *outbred*) soja miševa *Swiss* starosti 3 meseca (mladi adulti), i ženke i mužjaci visokosrodnih (engl. *inbred*) sojeva miševa C57BL/6 i BALB/c starosti 3-4 (mladi adulti) i 18 meseci (stari). Životinje su uzgojene u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ u okviru Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Miševi su gajeni u standardnim uslovima koji podrazumevaju cikluse od 12 h svetla i 12 h mraka, kontrolisanu temperaturu ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) i *ad libitum* pristup hrani i vodi. Životinje su bile raspoređene u kavezima od pleksiglasa sa podlogom od piljevine, u grupama po 6 jedinki prema polu, uzrastu i soju.

3.2.Eksperimentalni protokol

Životinje su imunizovane intramuskularnim ubrizgavanjem sezonske trovalentne CIV ili SV protiv gripa. Nakon 14 dana od imunizacije, izolovane su slezine od reprezentativnog broja životinja oba pola i uzrasta, radi ispitivanja ćelija koje su uključene u GC reakciju (Tfh, Tfr i GC B-ćelije). Humoralni odgovor u serumu ispitivan je u različitim vremenskim tačkama nakon vakcinacije. Krv je uzorkovana iz retroorbitalnog sinusa miševa. Neposredno pre uzorkovanja materijala, životinje su anestetizirane.

U cilju ispitivanja humoralnog odgovora na vakcinu protiv gripa određena je magnituda i dinamika produkcije influenza virus-specifičnih IgG antitela, i IgG potklasa (IgG1, IgG2a/2c, IgG2b i IgG3) korišćenjem metode enzimske imunoadsorpcije (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Aviditet influenza virus-specifičnih IgG antitela ispitana je modifikovanim ELISA testom u kome je kao haotropni agens dodat kalijum tiocijanat (KSCN). Funkcionalnost influenza virus-specifičnih antitela određena je metodom inhibicije hemaglutinacije (HAI), a sposobnost neutralizacije - testom mikroneutralizacije (MN).

Influenca virus specifični odgovor Th - i B - splenocita ispitivan je merenjem njihovog proliferativnog i sekretornog kapaciteta. Proliferacija Th i B splenocita ispitana je nakon restimulacije u *in vitro* uslovima antigenima pojedinačnih virusa koji su ulazili u sastav vakcine i merena je na osnovu vezivanja fluorescentne DNK-vezujuće boje 7-amino aktinomicina D (7-AAD) na protočnom citofluorometru (FACSVerser i FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA). Za određivanje koncentracija citokina IL-4 i IFN- γ životinje su žrtvovane četrnaest dana nakon imunizacije. Koncentracija IL-4 i IFN- γ u supernatantima kultivisanih ćelija izmerena je korišćenjem ELISA testa. Ćelije koje produkuju IL-4 i IFN- γ u slezini identifikovane su ELISPOT (engl. *enzyme-linked immunospot assay*) testom.

Reakcija GC u slezinama imunizovanih miševa ispitana je određivanjem broja i procentualnog učešća Tfh, Tfr i GC B-ćelija analizom ekspresije karakterističnih molekulskih markera na površini i unutar ovih ćelija, korišćenjem odgovarajućih fluorohromima obeleženih monoklonskih antitela (mAt) na protočnom citofluorometru. Pomoćničke folikulske T-ćelije definisane su kao CD4⁺Foxp3⁻CXCR5⁺Bcl6⁺ ćelije, Tfr kao CD4⁺Foxp3⁺CXCR5⁺Bcl6⁺ ćelije, a GC B-ćelije kao CD95⁺B220⁺ ćelije.

Dozvola etičkog komiteta

Miševi su tretirani u skladu sa Direktivom 2010/63/EU Evropskog parlamenta i Saveta o zaštiti životinja korišćenih u naučne svrhe, kao i sa zakonskim propisima (Zakon o dobrobiti životinja, "Službeni glasnik Republike Srbije", br. 41/2009). Protokol istraživanja koji je ocenio Odbor za zaštitu i upotrebu životinja Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" odobren je od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprave za veterinu (dozvola br. 323-07-01577/2016-05/1).

Etička komisija Instituta za viruse, vakcine i serume „Torlak“ je izdala dozvolu broj 232-06-03742/2012-05 za rad sa eksperimentalnim životinjama, za istraživanja u sklopu kojih su dobijeni rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.3. Imunizacija

Životinje su imunizovane jednom dozom sezonske trovalentne CIV (sastav za sezonu 2011/2012: A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) i B/Brisbane/60/2008 (B), Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd, Srbija) ili SV (sastav za sezonu 2011/2012, Sanofi Pasteur, Lion, Francuska; ili sastav za sezonu 2013/2014: A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus (H1N1), A(H3N2)-like virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) i B/Massachusetts/2/2012-like virus (B), Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd, Srbija). Jedna doza vakcine sadržala je 10 µg hemaglutinina (HA) (po 3,33 µg svakog od tri soja virusa koji su ulazili u sastav vakcine) površinskog proteina virusa. Vakcina je injektovana miševim intramuskularno u zapremini od 100 µl (po 50 µl obostrano u butni mišić). Imunizovani miševi nisu pokazivali znakove lokalne reakcije na imunizaciju (crvenilo, oticanje i formiranje granuloma na mestu ubrizgavanja). Takođe nijedan od znakova sistemske reakcije na imunizaciju kao što su groznica, smanjena telesna težina, promene u fizičkom izgledu, ponašanju i potrošnji hrane nije uočen.

3.4. Hemikalije i antitela

Za anesteziju su korišćeni ketamin (Ketamidol, RichterPharma AG, Wels, Austrija) i ksilazin (Xylased, Bioveta, Ivanovice na Hané, Republika Češka).

Tripan plava boja korišćena za brojanje ćelija pod svetlosnim mikroskopom kupljena je od od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Nemačka).

Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (pH 7,4) je nabavljen od Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, dok je natrijum azid (NaN₃) kupljen od Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA) je kupljen od Fluka AG Chemie GmbH (Buchs SG, Švajcarska).

Za održavanje splenocita u kulturi korišćen je RPMI-1640 medijum (Sigma-Aldrich, Oslo, Norveška) kompletiran sa 2 mM L-glutaminom (Serva, Heidelberg, Nemačka), 1 mM natrijum piruvatom (Serva), 100 i.j./ml penicilinom (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), 100 µg/ml streptomycinom (ICN) i fetalnim telećim serumom (engl. *fetal calf serum*, FCS) (Gibco, Grand Island, NY, SAD) u koncentraciji od 10%. Korišćenju FCS-a je prethodila njegoa inaktivacija zagrevanjem na 56 °C u vodenom kupatilu 30 minuta.

Za uklanjanje nespecifičnih inhibitora hemaglutinacije iz uzoraka korišćen je enzim za uništavanje receptora (engl. *receptor destroying enzyme*, RDE) (DENKA SEIKEN, Japan).

Za detekciju ćelija koje sekretuju IL-4 i IFN- γ citokine korišćeni su IL-4 i IFN- γ ELISPOT testovi kupljeni od R&D Systems (Minneapolis, SAD).

Za obeležavanje membranskih i unutarćelijskih antigena, korišćena su sledeća monoklonska antitela: fluorescein-izotiocijanatom (FITC) konjugovano anti-mišje B220 (CD45R, klon RA3-6B2), FITC-om konjugovano anti-mišje/pacovsko Foxp3 (klon FJK-16s) antitelo i anti-mišje CD95 (klon 15A7) antitelo konjugovano fikoeritrinom (PE) kupljeno od eBiolegend (Carlsbad, CA, SAD); PE- konjugovano anti-mišje CD4 antitelo (klon RM4-5) kupljeno od Biolegend (San Diego, CA, SAD). Anti-mišje CXCR5 (klon 2G8) konjugovano sa peridin hlorofil protein cijaninom (PerCP-Cy™5.5) i aleksa fluor 647 anti-humano/mišje Bcl-6 (klon K112-91) antitelo kao i 7-AAD (7-Aminoaktinomycin D) DNK vezujuća boja su nabavljeni od BD Biosciences Pharmingen (Mountain View, CA, SAD). Zečje poliklonsko anti-IL-21 antitelo (Merck, Darmstadt, Nemačka), kao i

sekundarno kozije anti-zečje FITC-om konjugovani antitelo je nabavljeno od BD Biosciences Pharmingen-a (Mountain View, CA, SAD).

Da bi se utvrdili titrovi serumskih antitela korišćena su antitela konjugovana peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP): kozje anti-mišje IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3 antitelo, kao i anti-mišje IgG2c antitelo konjugovano biotinom kupljeni od Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (WestGrove, PA, SAD). Streptavidin peroksidaza je kupljena od Abcam (Cambridge, UK) i o-fenilendiamine (engl. *ortho-phenylenediamine*, OPD) od Sigme.

Koncentracije citokina, IL-4 i IFN- γ , u supernatantima kultura splenocita određene su korišćenjem komercijalnih ELISA kitova kupljenih od Biolegend (San Diego, CA, SAD).

3.5. Izolovanje splenocita i seruma

Neposredno pre uzorkovanja materijala, životinje su anestezirane intraperitonealnim davanjem rastvora koji sadrži ketamin (80 mg/kg) i ksilazin (8 mg/kg).

3.5.1. Izolovanje splenocita

Grudni koš i trbuh miša prebrisani su alkoholom, nakon čega je urađena splenektomija. U sterilnim uslovima slezine su usitnjene makazama i potom pasirane kroz sterilnu čeličnu mrežicu promera pora 60 μ m. Čelije su ispirane kompletiranim RPMI-1640 obogaćenim sa 10% FCS-om i istaložene centrifugiranjem na 350 g, 10 min na 4°C. Uzorci su potom oslobođeni od eritrocita lizom crvenih krvnih zrnaca dodavanjem pufera za lizu (0,15 M rastvor NH₄Cl), koji sadrži 1mM KHCO₃ i 0,1 mM Na₂EDTA u destilovanoj vodi (pH 7,2), potom isprani i resuspendovani u 10% FCS/RPMI-1640. Dobijene čelije su brojane u tripan plavoj boji u odnosu 1:10 na unapređenom Neubauerovom hemacitometru uz pomoć svetlosnog mikroskopa (Olympus VMZ Stereo Microscope, Olympus OpticalCo., Tokio, Japan).

3.5.2. Izdvajanje seruma

Životinje su neposredno pre uzorkovanja krvi uvođenje u anesteziju na način koji je ranije opisan. Za uzorkovanje krvi su korišćene Pasterove pipete sa širim vrhom. Sakupljena krv je ostavljena da koaguliše 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim preko noći na 4 °C (u frižideru). Serumi su odvojeni od koaguluma centrifugiranjem 15 minuta na 2000 g, nakon čega su preneseni u čiste obeležene epruvete. Serumi su još jednom centrifugirani kako bi se odvojili od zaostalih eritrocita i prebačeni u mikrotube. Nakon odvajanja, serumi su dekomplementirani 30 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 56 °C i do analize su čuvani na -20 °C.

3.6. Ispitivanje humoralne imunosti

3.6.1. Određivanje ukupnog titra IgG antitela i titra pojedinih potklasa IgG specifičnih za antigene iz vakcine ELISA testom

Da bi se utvrdila dinamika produkcije virus-specifičnih IgG antitela, serumi su uzorkovani tri i šest nedelja nakon imunizacije *Swiss* miševa. U cilju indirektno kvantifikacije sinteze virus-specifičnih IgG antitela kao i pojedinačnih IgG potklasa serumi su uzorkovani četiri nedelje nakon imunizacije *Swiss*, C57BL/6 i BALB/c miševa. Titar IgG i IgG potklasa virus-specifičnih antitela određen je ELISA testom. MaxiSorp ploče sa 96 bazena (Nunc, Thermo Fisher Scientific) obložene su i inkubirane preko noći u vlažnoj komori na 4°C sa 2,5 μ g HA/ml (50 μ l po bazenu) H1N1 ili H3N2 ili B inaktiviranog antigena u PBS-u. Nakon inkubacije, ploče su oprane tri puta sa T-PBS-om (0,05% Tween 20 u PBS-u), jednom sa PBS-om i „blokiranje“ 1 sat na 37°C sa 1% BSA pripremljenog u PBS-u. Nakon toga ploče su isprane tri puta u T-PBS-u i jednom u PBS-u. U bazene su potom naliveni uzorci (50 μ l po bazenu) dekomplementiranog seruma u dvostrukim serijskim razblaženjima pripremljenim u PBS-u sa 1% BSA. Uzorci su inkubirani jedan sat na sobnoj temperaturi. Ploče su isprane i dodato je sekundarno antitelo usmereno protiv mišjeg IgG (1:50000), ili protiv pojedinačnih potklasa IgG1 (1:10000), IgG2a (1:2000); IgG2b (1:2000), IgG3 (1:1000),

sva konjugovana HRP-om. Ploče su inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Budući da je pokazano da C57BL/6 soj miševa ne proizvodi IgG2a potklasu antitela već IgG2c [155] u eksperimentima koji su uključivali ovaj soj miševa korišćeno je sekundarno biotinizovano anti-mišje IgG2c antitelo (1:1000), i nakon sat vremena inkubacije na sobnoj temperaturi i ispiranja dodat je streptavidin konjugovan HRP-om (1:100). Nakon ispiranja dodat je supstrat OPD, aktiviran sa 1,2 $\mu\text{l/ml}$ 12% H_2O_2 , u citratnom puferu (0,1 M, pH 5,0). Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μl /bazen 2M rastvora H_2SO_4 . Optička gusina (engl. *optical density*, OD) je očitana na 490 nm i 620 nm na Multiscan Ascent-u (Labsystems). Titri su izračunati kao recipročna vrednost najvećeg razblaženja test seruma koji daje optičku gustinu 3 standardne devijacije iznad kontrolnih seruma (serum životinja koje nisu imunizovane) u istom razblaženju.

3.6.2. Određivanje aviditeta IgG antitela

Relativan aviditet influenza virus specifičnih IgG antitela određena je modifikovanim ELISA testom, dodavanjem kalijum tiocijanata (KSCN) kao haotropnog agensa. Serumi u odgovarajućem razblaženju u PBS-u sa 1 % BSA (razblaženja koja daju istu optičku gustinu utvrđena prethodno, ELISA testom) su inkubirani preko noći u pločama obloženim sa H1N1 ili H3N2 ili B antigenima virusa gripa. Posle ispiranja sa T- PBS-om, jedan set uzoraka je inkubiran sa PBS-om dok je drugi set istih uzoraka inkubiran sa 1 M KSCN (50 μl) tokom sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja dodato je HRP- konjugovano anti-mišje IgG antitelo (1:10000). Nakon 1 sata inkubacije, ploče su isprane i dodat je supstrat OPD, aktiviran sa 1,2 $\mu\text{l/ml}$ 12% H_2O_2 u citratnom puferu (0,1 M, pH 5,0). Posle 15 minuta, reakcija je zaustavljena sa 2M H_2SO_4 (stop rastvor). Multiscan Ascent (Labsystems) je korišćen za merenje OD na 490 i 620 nm. Aviditet antitela je izražen kao procenat antitela koji ostaju nakon tretmana seruma sa 1 M KSCN je izračunat kao: (tretirani serum OD₄₉₂/OD₄₉₂ netretirani serum) x 100%.

3.6.3. Određivanje titra antitela značajnih za efikasnost protektivnog odgovora protiv virusa gripa u serumu.

3.6.3.1. Test inhibicije hemaglutinacije (HAI)

Testom inhibicije hemaglutinacije (engl. *hemagglutination inhibition assay*, HAI) određivan je titar ukupnih serumskih antitela koji prepoznaju cele umrtnjene viruse H1N1, H3N2 ili B soja koji su ulazili u sastav vakcine. Ovaj metod se zasniva na tendenciji hemaglutinina virusa gripa da se vezuje za eritrocite i izaziva njihovu aglutinaciju. Kada se antitela specifična za HA protein vežu za odgovarajuća antigenska mesta, ova mesta postaju blokirana i na taj način HA ne može da se veže za eritrocite. Kao rezultat ove interakcije javlja se inhibicija hemaglutinacije, što predstavlja osnovu HAI testa. HAI test se izvodi u mikrotitarskim pločama sa 96 bazena. Standardizovana količina HA antigena se meša sa serijskim razblaženjima seruma imunizovanih životinja, nakon čega se dodaju eritrociti i procenjuje vezivanje antitela za molekul HA.

Pre samog testa iz seruma su uklonjeni nespecifični inhibitori hemaglutinacije tretmanom sa RDE. Dodate su 3 zapremine RDE na 1 zapreminu seruma i inkubacija je trajala preko noći na 37 °C u vodenom kupatilu. Nakon toga, kako bi se inaktivisao višak RDE, usledila je inkubacija 30 minuta na 56°C u vodenom kupatilu. Serumi su ohlađeni na sobnoj temperaturi. Dodato je 6 zapremina fiziološkog rastvora. Na ovaj način je postignuto finalno razblaženje seruma od 1:10. Osim uklanjanja nespecifičnih inhibitora hemaglutinacije, izvođenju testa je prethodilo i uklanjanje nespecifičnih hemaglutinina iz seruma i određivanje titra hemaglutinacije za svaki pojedinačni (vakcinalni) virus.

Test HAI je izvođen tako što su u mikrotitarske ploče sa 96 bazena sa V-dnom naliveni ispitivani serumi (pripremljeni kako je prethodno opisano) u dvostrukim serijskim razblaženjima i 25 μl H1N1 ili H3N2 ili B soja virusa gripa koji su ulazili u sastav vakcine (podešene koncentracije na 4 jedinice

HA na 25 μ l). Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, dodato je 50 μ l 0,5% rastvora ćurećih eritrocita u PBS-u i smeša je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi pre procene aglutinacije. Kompletne hemaglutinacije se desila kada se eritrociti još uvek nalaze u suspenziji nakon što su kontrolni eritrociti potpuno staloženi. Krajnja tačka titracije hemaglutinacije je definisana kao najveće razblaženje seruma koje inhibira hemaglutinaciju. Titar inhibicije hemaglutinacije predstavlja recipročnu vrednost ovog razblaženja.

3.6.3.2. Test mikroneutralizacije (MN)

Test mikroneutralizacije predstavlja visoko specifičan i osetljiv test za detekciju neutrališućih antitela specifičnih za virus gripa u humanim i životinjskim serumima. Neutralizacija virusa daje najprecizniji odgovor na pitanje da li ili ne subjekat ima antitela koja mogu da neutrališu infektivnost određenog virusnog soja [156]. Test mikroneutralizacije u mikrotitarskim pločama urađen je prema protokolu SZO. Test MN virusa gripa zasnovan je na činjenici da antitela iz seruma koja mogu da neutrališu HA virusa influence inhibiraju infekciju kontinuirane ćelijske kulture Madin-Darbi (engl. *Madin-Darby canine kidney*, MDCK) virusom gripa. Prvo je određena infektivna doza virusa za kulturu tkiva (engl. *tissue culture infectious dose*, TCID). Serijska razblaženja seruma su inkubirana sa standardizovanom količinom (100 x 50% infektivna doza kulture tkiva, TCID₅₀) živog H1N1 ili H3N2 ili B virusa pre dodavanja na MDCK ćelije (*one rastu zalepljene za plastiku*). Nakon inkubacije preko noći, ćelije su fiksirane nakon čega su obojene kristalno ljubičastom bojom koja boji sve ćelijske komponente. Mrtve ćelije (inficirane) se tokom postupka bojenja spiraju jer više ne adheriraju za plastiku. Dodavanjem rastvarača (metanola) i merenjem apsorbance na 570 nm određuje se neutralizacija prisustva virusa u ćelijama. MN titar je izražen kao recipročna vrednost najvećeg razblaženja seruma koji je dao 50% neutralizacije od 100 x TCID₅₀ virusa u MDCK ćelijama.

3.7. Ispitivanje celularne imunosti

3.7.1. ELISPOT

ELISPOT predstavlja veoma osetljiv test koji omogućava detekciju sekretovanih molekula na nivou pojedinačne ćelije. Komercijalni ELISPOT test korišćen je prema uputstvu proizvođača (R&D Systems) za detekciju sekrecije IFN- γ i IL-4 od strane ćelija slezine imunizovanih i kontrolnih neimunizovanih miševa, stimulisanih ili nestimuliranih umrtvljenim virusima gripa koji su ulazili u sastav vakcine. Antitela specifična za citokine IFN- γ , odnosno IL-4 su imobilisana na membrani ELISPOT ploče sa 96 bazena. U bazene su dodati splenociti miševa (1×10^6 ćelija/bazenu), sa 1 μ g/ml stimulatora H1N1 ili H3N2 ili B inaktivisanim virusom i inkubirani 48 sati na 37°C sa 5% CO₂. Tokom inkubacije, ćelije aktivirane u prisustvu stimulusa, sekretovale su citokine koji su se vezali za antitela na ploči. Nakon inkubacije, prema uputstvu proizvođača, detektovane se obojene tačke na mestima na kojima su se nalazile ćelije koje sekretuju citokine. Po završetku testa, određen je broj ćelija koje su sekretovale citokine IFN- γ ili IL-4 u stimulisanim kulturama. Tačke su brojane na mikroskopu (Olympus VMZ Stereo Microscope, Olympus Optical Co., Tokio, Japan).

3.7.2. Kultivacija splenocita za analizu sinteze citokina i proliferacije ćelija

Splenociti (3×10^5 ćelija/bazenu) su kultivisani u medijumu (RPMI-1640 sa 10% FCS-a) u pločama sa U-dnom sa 96 bazena na 37°C i 5% CO₂ zasićenim vazduhom. Ćelije su kultivisane samo u medijumu ili stimulisane sa 5 μ g/ml HA H1N1 ili H3N2 ili B antigena virusa koji su ulazili u sastav vakcine. Nakon 72 sata skupljeni su supernatanti za procenu produkcije citokina (IFN- γ i IL-4) i ćelije za analizu proliferacije protočnom citofluorimetrijom.

3.7.3. Ispitivanje sinteze IL-21 citokina u CD4+ splenocitima

Za određivanje sinteze IL-21 citokina *ex vivo* splenociti imunizovanih i kontrolnih neimunizovanih miševa su izolovani i stimulisani 4 sata na temperaturi od 37 °C u medijumu (RPMI-1640 sa 10% FCS) sa 200 ng/ml PMA, 400 ng/ml jonomicina i 3 μ g/ml brefeldina A. Nakon inkubacije ćelije su

sakupljene i bojene intracelularno anti-IL-21 antitelom za protočnu citofluorometriju. Za određivanje zastupljenosti ćelija koje su specifične za antigene iz vakcine i koje sintetišu IL-21 splenociti imunizovanih miševa su stavljeni u kulturu 72 sata u kompletiranom RPMI-1640 medijumu sa 10% FCS ili su restimulirani antigenima iz vakcine. Nakon toga ćelije su permeabilizovane sa rastvorom 0.2% Tween-20/PBS i bojene intracelularno za analizu na protočnom citofluorimetru.

3.7.4. Određivanje koncentracije IL-4 i IFN- γ ELISA testom

Komercijalni ELISA kitovi sa pločama unapred obloženim anti-mišjim IL-4 i IFN- γ antitelima korišćeni su za detekciju ovih citokina u supernatantima kultura ćelija kultivisanih 72 sata u kompletiranom RPMI-1640 medijumu sa 10% FCS ili stimulirani pojedinačnim vakcinalnim antigenima. Testovi su izvođeni prema uputstvu proizvođača (Biolegend). Ploče su isprane četiri puta puferom za ispiranje, zatim je naliveno po 50 μ l/bazenu odgovarajućeg razblaženja standarda i uzoraka. Nakon 2 sata inkubacije na sobnoj temperaturi ploče su isprane četiri puta puferom za ispiranje i dodato je antitelo za detekciju konjugovano biotinom i ostavljeno da se inkubira sat vremena na sobnoj temperaturi uz mešanje na orbitalnom šejkeru. Nakon ispiranja viška antitela dodat je rastvor avidin-HRP i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi uz mešanje na orbitalnom šejkeru. Posle ispiranja, dodat je rastvor supstrata i nakon 15 minuta inkubacije u mraku, reakcija je zaustavljena stop rastvorom. Apsorbanca je očitana na 450 nm i 570 nm. Standardna kriva je izračunata za svaki test sa granicom detekcije od 0,5 pg/mL za IL-4 i 8 pg/mL za IFN- γ .

3.7.5. Protočna citofluorometrija

Za učitavanje uzoraka korišćeni su FACSVerse i FACSCalibur protočni citofluorometri. Princip rada protočnog citometra podrazumeva da se ćelijska suspenzija propušta kap po kap ispred argonskog jonskog lasera, pri čemu se u svakoj kapljici nalazi po jedna ćelija. Laserski zrak čija je talasna dužina podešena na ekscitacijsku talasnu dužinu za fluorohrom kojim su ćelije obeležene (488 nm za FITC, PE, PerCPCy5.5) ili diodni laser talasne dužine 635 nm (Alexa Fluor 647) usmerava se na protočni mlaz ćelija. Ukoliko kapljica sadrži ćeliju obeleženu fluorohromom, on ekscitira i fluorescira, fotoreceptori detektuju odbijenu lasersku svetlost i emitovanu fluorescenciju. Odbijena svetlost meri se u ravni ekscitacijske svetlosti (engl. *forward scatter*, FSC) i normalno na upadni laserski zrak (engl. *side scatter*, SSC). FSC pruža informacije o veličini ćelije, dok je SSC srazmeran granularnosti ćelije. Izmerena fluorescencija ukazuje na vezivanje obeleženog antitela tačnije na ekspresiju samog ćelijskog antigena [157].

3.7.5.1. Određivanje fenotipa ćelija

U suspenziju sveže izolovanih splenocita (5×10^5 ćelija u PBS-u obogaćenim sa 2% FCS), dodata su antitela za bojenje membranskih antigena direktno obeležena fluorohromima (CD4 konjugovano sa PE i/ili PCPCy5.5 konjugovano CXCR5 antitelo ili FITC konjugovano B220 i PCPefl710 konjugovano CD95 antitelo) i inkubirana 30 minuta na 4°C. Nakon inkubacije ćelije su isprane u PBS-u sa 0,1% NaN₃ i 2% FCS i fiksirane i permeabilizovane preko noći na 4°C u prisustvu rastvora za fiksaciju i permeabilizaciju iz komercijalnog Foxp3 kita prema uputstvu proizvođača (eBioscience). Nakon toga ćelije su isprane u puferu za ispiranje iz istog kita i inkubirane sa FITC-om obeleženim anti-Foxp3 antitelom i/ili sa anti-Bcl6 antitelom obeleženim sa alexa fluor 647 ili sa anti-IL-21 antitelom 30 minuta na 4°C. Ćelije obeležene sa anti IL-21 antitelom su isprane dva puta u puferu za ispiranje i potom 30 minuta inkubirane sa sekundarnim FITC konjugovanim antitelom na 4°C. Nakon inkubacije ćelije su isprane dva puta u puferu za ispiranje, resuspendovane u 350 μ l PBS sa 0,1% NaN₃ i analizirane na FACSVerse protočnom citometru uz pomoć BD FACSuite™ softvera (Becton Dickinson, CA, SAD).

3.7.5.2. Određivanje proliferacije ćelija

Za analizu ćelija koje su proliferisale (ćelije u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa), korišćena je interkalarna fluorescentna boja 7-AAD koja se vezuje za dvolančanu DNK. Nakon 72 h stimulacije, ćelije su sakupljene u epruvete, centrifugirane (5 min na 350 g) isprane dva puta u PBS sa 0,1% NaN₃ i 2% FCS. Dodata su antitela za bojenje membranskih antigena: FITC-om konjugovano B220 i PE-om konjugovano CD4 antitelo. Nakon bojenja navedenih antigena, ćelije su isprane i resuspendovane u 150 µl PBS sa 50% FCS. Ćelije su zatim fiksirane i permeabilizovane dodavanjem 450 µl hladnog 70% etanola u dvostruko destilovanoj vodi uz blago mešanje. Posle inkubacije preko noći, ćelije su isprane dva puta u PBS-u sa 0,1% NaN₃ i 2% FCS i inkubirane 30 min sa 10 µl DNK-vezujuće boje 7-AAD na 4°C pre analize na protočnom citofluorimetru. Dubleti su isključeni analizom površine u odnosu na signale širine 7-AAD fluorescence (engl. *7-AAD area / 7-AAD width*) na modulu diskriminacije dubleta (DDM). Uzorci su bili učitanii na FACSCalibur protočnom citometru uz pomoć softvera CellQuest™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD). Podaci su analizirani korišćenjem softvera FlowJo verzija 7.8 (TreeStar Inc, Ashland, OR, SAD).

3.8. Statistika

Rezultati su, prilikom prikazivanja titrova predstavljeni kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI), a prilikom prikazivanja drugih parametara kao aritmetička sredina ± SEM. Korišćena je metoda dvofaktorske analize varijanse (2 way ANOVA) uz primenu Bonferroni testa za *post hoc* poređenje, osim za određivanje značajnosti polnih razlika u titrima potklasa IgG gde je korišćen Mann Whitney test. Statistička obrada podataka je vršena statističkim programom GraphPad Prism 5 (GraphPadSoftware, Inc., CA, SAD). Statistički značajnom je smatrana vrednost $p < 0,05$. Korelacija između titra virus-specifičnih neutrališućih antitela (određenih MN metodom) i titra ukupnih virus- specifičnih IgG antitela (određenih ELISA metodom), kao i korelacija između odnosa Tfr i Tfh ćelija i titra ukupnih virus- specifičnih IgG antitela (određenih ELISA metodom) određena je Pirsonovim testom korelacije.

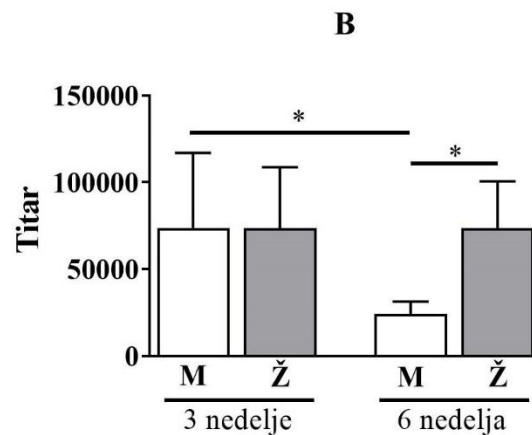
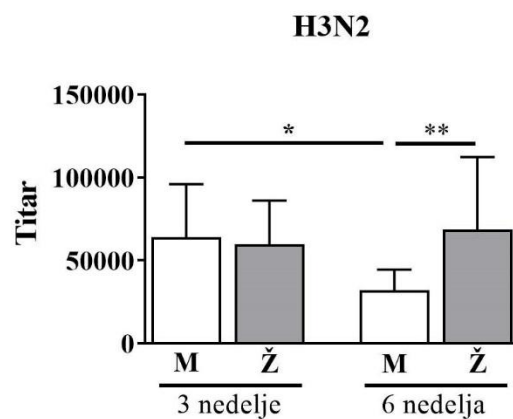
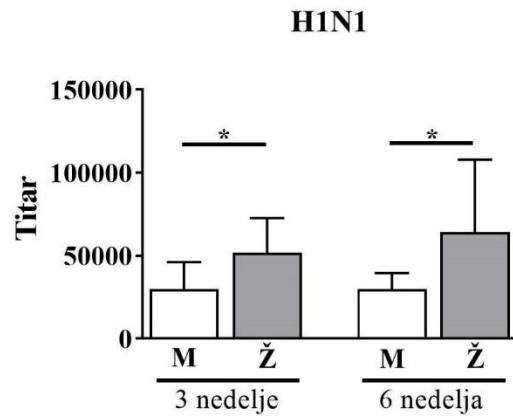
4.REZULTATI

4.1.Uticaj pola kod *Swiss* miševa na imunski odgovor pokrenut vakcinom protiv gripa

Podaci iz literature nedvosmisleno pokazuju postojanje polnih razlika u imunskom odgovoru na vakcine (uključujući vakcine protiv virusnih infekcija), neželjenim efektima vakcinacije i zaštiti koju ona obezbeđuje [4,158]. Međutim, pretklinička ispitivanja vakcina retko uključuju laboratorijske životinje oba pola [150]. Osim toga, istraživanja se uglavnom sprovode na genetički visokosrodnim sojevima laboratorijskih životinja, što ima svoje prednosti, ali i mane. Loša strana ove široko rasprostranjene prakse ogleda se između ostalog i u tome što ove životinje ne ispoljavaju genetički diverzitet koji postoji kod ljudi [159]. Shodno tome, preporučljivo je korišćenje genetički nesrodnih laboratorijskih životinja [159]. Ova preporuka se smatra posebno važnom kada se ispituje polni dimorfizam u imunskom odgovoru [150]. Zbog svega prethodno navedenog, prvi segment ispitivanja je sproveden na miševima oba pola genetički nesrodnog *Swiss* soja.

4.1.1.Pol *Swiss* miševa i soj virusa gripa utiču na titar virus-specifičnih IgG antitela

Post-vakcinalni titar virus-specifičnih serumskih antitela koristi se kao indirektan pokazatelj efikasnosti imunskog odgovora na vakcinu protiv gripa [160–162]. Zaštitna antitela indukovana vakcinom protiv gripa uglavnom su IgG klase [62]. U serumu mladih *Swiss* miševa, oba pola, određivan je titar IgG antitela specifičnih za svaki od tri soja virusa koji ulaze u sastav vakcine (H1N1 (A/California/7/200), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008)) tri i šest nedelja nakon imunizacije (Slika 1). Titar H1N1- specifičnih IgG antitela bio je veći ($p < 0,05$) kod ženki u odnosu na mužjake miševa u obe vremenske tačke određivanja (Slika 1). Kada je u pitanju titar H3N2- i B-specifičnih IgG antitela, on se nije razlikovao između polova tri nedelje nakon imunizacije, ali jeste nakon šest nedelja kada je detektovan značajno veći titar IgG antitela specifičnih za H3N2 ($p < 0,01$) i B ($p < 0,05$) virus gripa kod ženki. Ova razlika je posledica značajnog sniženja ($p < 0,05$) titra ovih antitela kod mužjaka u periodu između dve vremenske tačke određivanja, dok se kod ženki u tom periodu titar ovih antitela nije značajno menjao, što implicira polni dimorfizam u kinetici pada titra ovih antitela (Slika 1).

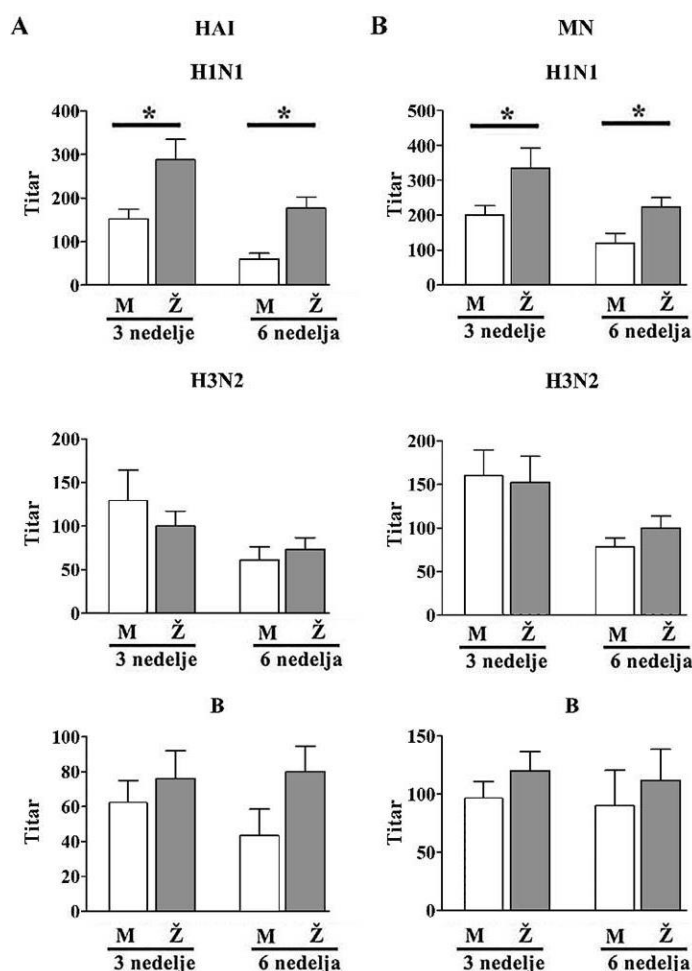


Slika 1. Titar IgG antitela specifičnih za sojeve virusa koji su ulazili u sastav sezonske trovalentne celovirusne inaktivisane vakcine (CIV) protiv gripa bio je veći šest nedelja posle imunizacije u serumima ženki *Swiss* miševa u poređenju sa serumima mužjaka miševa istog soja. Ženke (Ž) i mužjaci (M) *Swiss* miševa imunizovani su CIV-om koja je sadržavala H1N1 (A/California/7/200), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008) viruse. Tri i šest nedelja nakon imunizacije uzorkovana je krv za određivanje titra IgG antitela specifičnih za ove viruse ELISA testom. Podaci

su prikazani kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N=10 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.2. Pol Swiss miševa i soj virusa gripa utiču na titar funkcionalnih antitela specifičnih za antigene virusa koji ulaze u sastav CIV-e

Funkcionalna antitela mogu se direktno meriti koristeći MN test, ili indirektno koristeći HAI test koji otkriva antitela koja ciljaju mesta vezivanja za sijalinsku kiselinu na površinskom HA proteinu. Istraživanja pokazuju da titar antitela u serumu meren testovima HAI (meri sposobnost antitela da spreče aglutinaciju eritrocita antitelima specifičnim za hemaglutinin) i MN (meri sposobnost antitela da spreče virusnu infekciju ćelija sisara *in vitro*) generalno dobro korelira sa stepenom zaštite protiv dokazane infekcije virusom gripa, s tim što se MN test smatra osetljivijim [163]. Rezultati dobijeni korišćenjem ovih testova u sklopu ove disertacije su pokazali da je tri i šest nedelja nakon imunizacije titar antitela specifičnih za H1N1 virus bio veći ($p < 0,05$) kod ženki nego kod mužjaka, dok su titri funkcionalnih antitela za H3N2 i B virus bili približno jednaki kod oba pola u obe vremenske tačke (Slika 2).



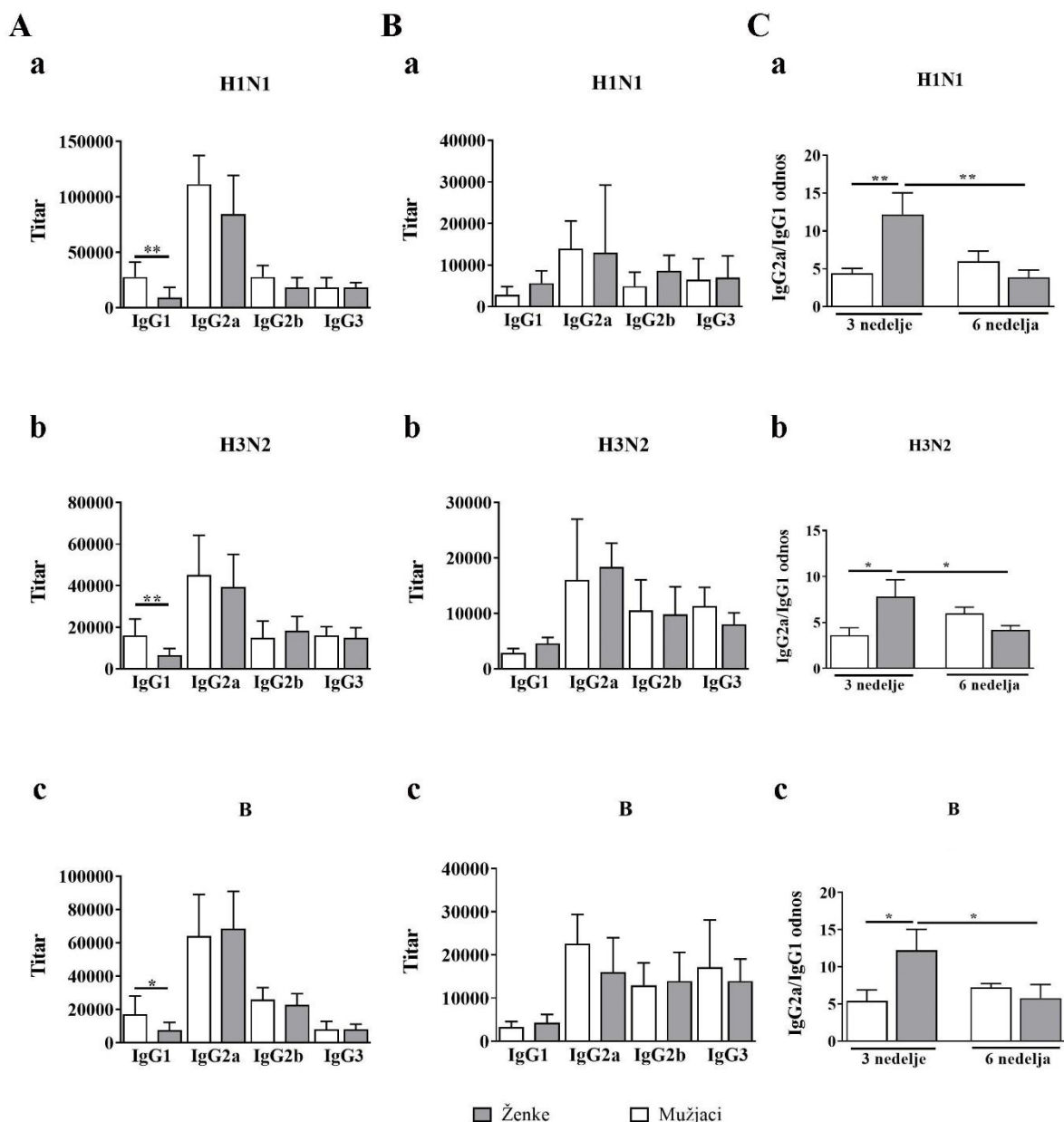
Slika 2. Titar antitela specifičnih za H1N1 virus gripa u serumima ženki veći je u poređenju sa titrom seruma mužjaka imunizovanih sezonskom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) protiv gripa. Ženke (Ž) i mužjaci (M) miševa imunizovani su CIV-om koja je sadržala H1N1 (A/California/7/200), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008) viruse. Tri i šest nedelja nakon imunizacije uzeti su uzorci krvi za određivanje titra **A** antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B viruse testom inhibicije hemaglutinacije (HAI) i **B** mikroneutralizacije (MN). Podaci su prikazani

kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N=10 miševa po grupi. * $p < 0,05$.

4.1.3. Pol *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om utiče na profil IgG potklasa specifičnih za virusne antigene u njihovom serumu

Različite potklase IgG imaju različiti doprinos u odbrani domaćina od virusne infekcije [65]. Poznato je da u serumu miševa imunizovanih protiv virusnih oboljenja dominiraju IgG1 i IgG2a potklase antitela specifičnih za infektivni agens od interesa [65,164]. Sinteza IgG2a antitela je posebno važna za odbranu od virusnih infekcija [65,66]. Važnost ovih antitela se povezuje sa njihovom sposobnošću da aktiviraju sistem komplementa [67], da se vežu za Fc γ receptore eksprimirane na fagocitima [68] i da indukuju antitelima-posredovanu ćelijsku citotoksičnost [69]. Za antitela IgG1 potklase pokazano je da imaju ulogu u neutralizacija virusa [65]. Takođe je pokazano i da različiti tipovi vakcina različito utiču na sintezu pojedinih potklasa IgG antitela [66,165]. Iz tog razloga u serumima mladih *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om određen je titar IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3 potklasa antitela, specifičnih za sojeve virusa koji su sadržani u vakcini.

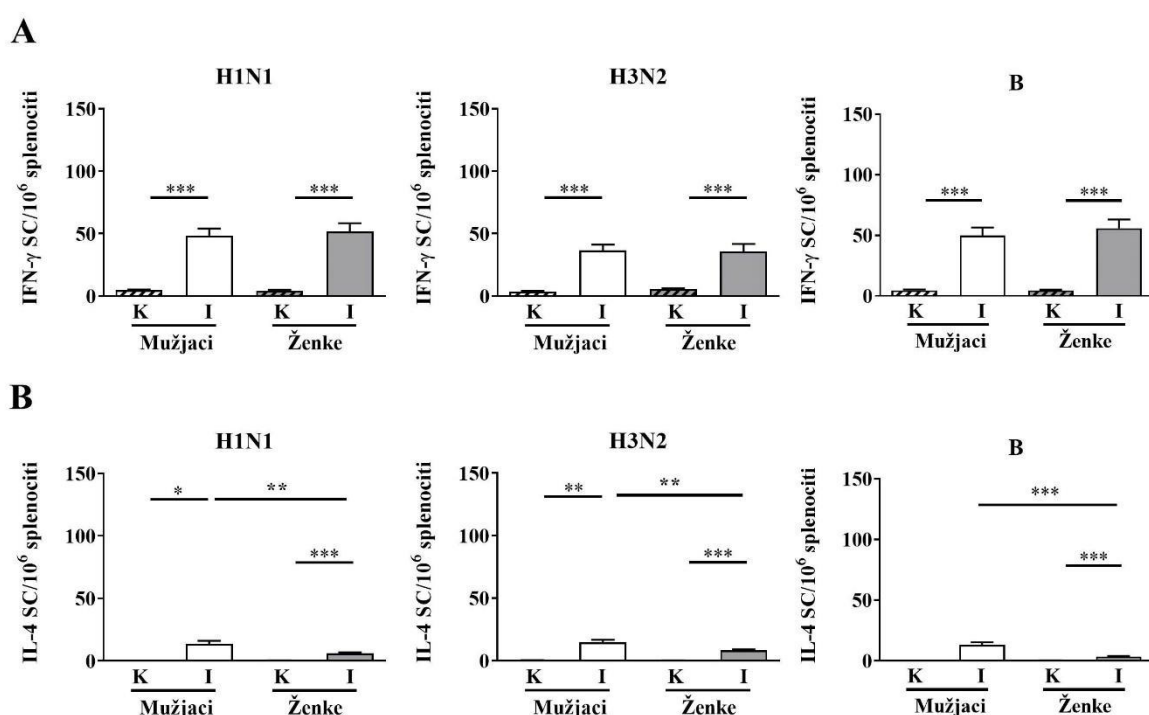
Tri nedelje nakon imunizacije, antitela IgG2a potklase specifična za svaki od tri soja virusa gripa koji su ulazili u sastav CIV-a su bila dominantna IgG potklasa u serumima mladih *Swiss* miševa oba pola (Slika 3A). Titar antitela IgG1 potklase bio je manji u serumima ženki u poređenju sa mužjacima miševa ($p < 0,01$ za A sojeve virusa; $p < 0,05$ za B soj virusa gripa) (Slika 3A). Kada su u pitanju titri drugih ispitivanih potklasa IgG antitela, odnosno antitela IgG2b i IgG3 potklasa, nisu pronađene značajne polne razlike (Slika 3A). Količnik titra IgG2a/IgG1 antitela, koji ukazuje na balans između Th1 i Th2 tipa imunskog odgovora [166,167] bio je veći kod ženki u poređenju sa mužjacima ($p < 0,01$ za H1N1, $p < 0,05$ za H3N2 i $p < 0,05$ za B soj virusa) (Slika 3C). Šest nedelja nakon imunizacije *Swiss* miševa IgG2a potklasa je ostala dominantna potklasa (Slika 3B). Takođe, nisu uočene polne razlike u titrima pojedinačnih potklasa, te stoga nije bilo ni polne razlike u odnosu titra IgG2a/IgG1 antitela šest nedelja nakon imunizacije (Slika 3C).



Slika 3. Titar IgG potklasa i odnos titra IgG2a/IgG1 potklasa u serumu ženki i mužjaka mladih *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) protiv gripa. Titar IgG potklasa (IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3) antitela specifičnih za (a) H1N1, (b) H3N2 i (c) B sojeve virusa određivan je kod ženki i mužjaka (A) tri i (B) šest nedelja nakon imunizacije CIV-om. Miševi oba pola imunizovani su CIV-om koja je sadržala H1N1 (A/California/7/200), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008) viruse. (C) Tri nedelje i šest nedelja nakon imunizacije određivan je i količnik titra (a) H1N1, (b) H3N2 i (c) B virus-specifičnih antitela IgG2a/IgG1 potklasa u serumu ženki i mužjaka miševa. Rezultati dobijeni određivanjem titra potklasa IgG antitela su prikazani kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI), a oni koji se odnose na odnos potklasa kao aritmetička sredina \pm SEM. N=10 miševa po grupi. (C) tri i šest nedelja nakon imunizacije CIV-om. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.4. Ženke *Swiss* miševa imunizovane CIV-om imaju manji broj splenocita koji sintetišu citokin IL-4 u odnosu na mužjake

Uzimajući u obzir polne razlike u profilu IgG potklasa i podatke koji ukazuju da kod miševa ravnoteža Th1/Th2 citokina određuje odnos IgG2a/IgG1 potklasa antitela [166,167], u kulturi splenocita imunizovanih *Swiss* miševa oba pola određena je zastupljenost ćelija koje sintetišu citokine karakteristične za ćelije Th1 (IFN- γ) i Th2 (IL-4) tipa [168]. Ćelije koje sekretuju citokine IFN- γ i IL-4, detektovane su ELISPOT-om u kulturama splenocita, 14 dana od imunizacije CIV-om, a nakon *in vitro* restimulacije svakim od tri soja virusa gripa pojedinačno. Nakon restimulacije splenocita H1N1, H3N2 ili B sojevima virusa gripa nije bilo polnih razlika u broju ćelija koje sekretuju IFN- γ , dok je broj splenocita koji produkuju IL-4 bio manji u kulturama splenocita imunizovanih miševa ženskog pola u odnosu na kulture splenocita mužjaka (Slika 4). Ovakav nalaz je u korelaciji sa titrom sekretovanih specifičnih antitela IgG2a i IgG1 potklasa u serumu miševa.



Slika 4. Broj ćelija koje sekretuju IL-4 citokin je manji u kulturama splenocita ženki u poređenju sa kulturama mužjaka *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) protiv gripa. Splenociti su izolovani iz mužjaka i ženki mladih *Swiss* miševa 14 dana nakon imunizacije CIV-om (I) i kontrolnih, neimunizovanih miševa (K). ELISPOT metodom su detektovani splenociti koji sekretuju citokine (A) IFN- γ i (B) IL-4 48 sati nakon *in vitro* restimulacije A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2), ili B/Brisbane/60/2008 (B) inaktiviranim sojevima virusa gripa koji su bili sadržani u vakcini. Broj citokin-sekretujućih ćelija (engl. *secreting cells*, SC) je određen na osnovu broja tačaka na 1×10^6 splenocita u stimulisanim kulturama splenocita imunizovanih miševa (I) i splenocita neimunizovanih kontrolnih (K) miševa. Broj ćelija koje sekretuju citokine je izražen kao broj tačaka (SC) na 1×10^6 splenocita. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. N= 10 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

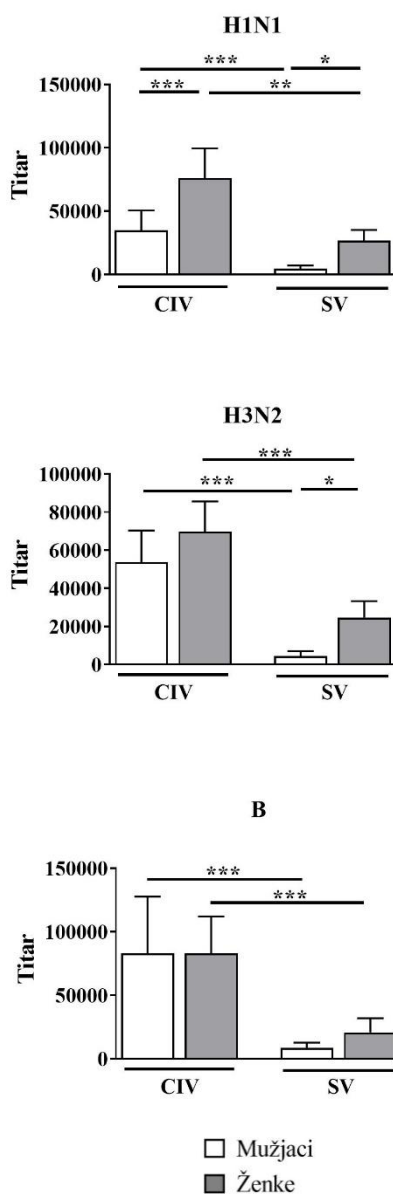
4.2. Uticaj tipa vakcine na polne razlike u imunskom odgovoru *Swiss* miševa na vakcinu protiv gripa

4.2.1. Titar virus-specifičnih IgG antitela u serumu miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa zavisi od pola miševa, soja virusa i tipa vakcine

U cilju utvrđivanja uticaja tipa vakcine na polne razlike u imunskom odgovoru, u narednim eksperimentima su korišćena dva tipa vakcina protiv gripa: CIV i SV. Za razliku od ispitivanja prikazanih u prethodnom odeljku (4.1.) gde je humoralni odgovor na vakcinu praćen u dve vremenske tačke, u ispitivanjima čiji rezultati su prikazani u ovom odeljku ovaj parametar je određivan u jednoj vremenskoj tački – četiri nedelje nakon imunizacije. Ova vremenska tačka je odabrana na osnovu literaturnih podataka koji opisuju kinetiku humoralnog odgovora kod miševa nakon imunizacije vakcinom protiv gripa, prema kojima titar specifičnih antitela u serumu dostiže svoj maksimum 2 - 3 nedelje [169], odnosno 2-5 nedelja [170] nakon imunizacije, a što je u korelaciji i s podacima prikazanim u prethodnom odeljku. Titar IgG antitela specifičnih za H1N1 ($p < 0,001$ kod ženki i $p < 0,01$ kod mužjaka), H3N2 ($p < 0,001$ za oba pola) i B ($p < 0,001$ za oba pola) sojeve virusa gripa u serumima mladih mužjaka i ženki *Swiss* miševa bio je manji kod miševa imunizovanih SV-om u poređenju sa miševima imunizovanim CIV-om (Slika 5).

Kada su u pitanju polne razlike, u saglasnosti s rezultatima dobijenim tri nedelje nakon imunizacije CIV-om i prikazanim u prethodnom poglavlju, četiri nedelje nakon imunizacije ovom vakcinom ženki *Swiss* miševa titar H1N1 virus-specifičnih antitela u serumu bio je veći ($p < 0,001$) u poređenju sa mužjacima, dok se titri antitela specifičnih za H3N2 i B sojeve virusa nisu razlikovali između polova (Slika 5). Za razliku od *Swiss* imunizovanih CIV-om, kod miševa ovog soja imunizovanih SV-om četiri nedelje nakon imunizacije su detektovane u polne razlike u titru specifičnih antitela ne samo za H1N1 virus ($p < 0,05$), već i za H3N2 virus, odnosno titar ovih antitela je bio veći ($p < 0,05$) kod ženki nego kod mužjaka (Slika 5). Titar IgG antitela specifičnih za B soj virusa gripa bio uporediv između polova (Slika 5).

IgG titar

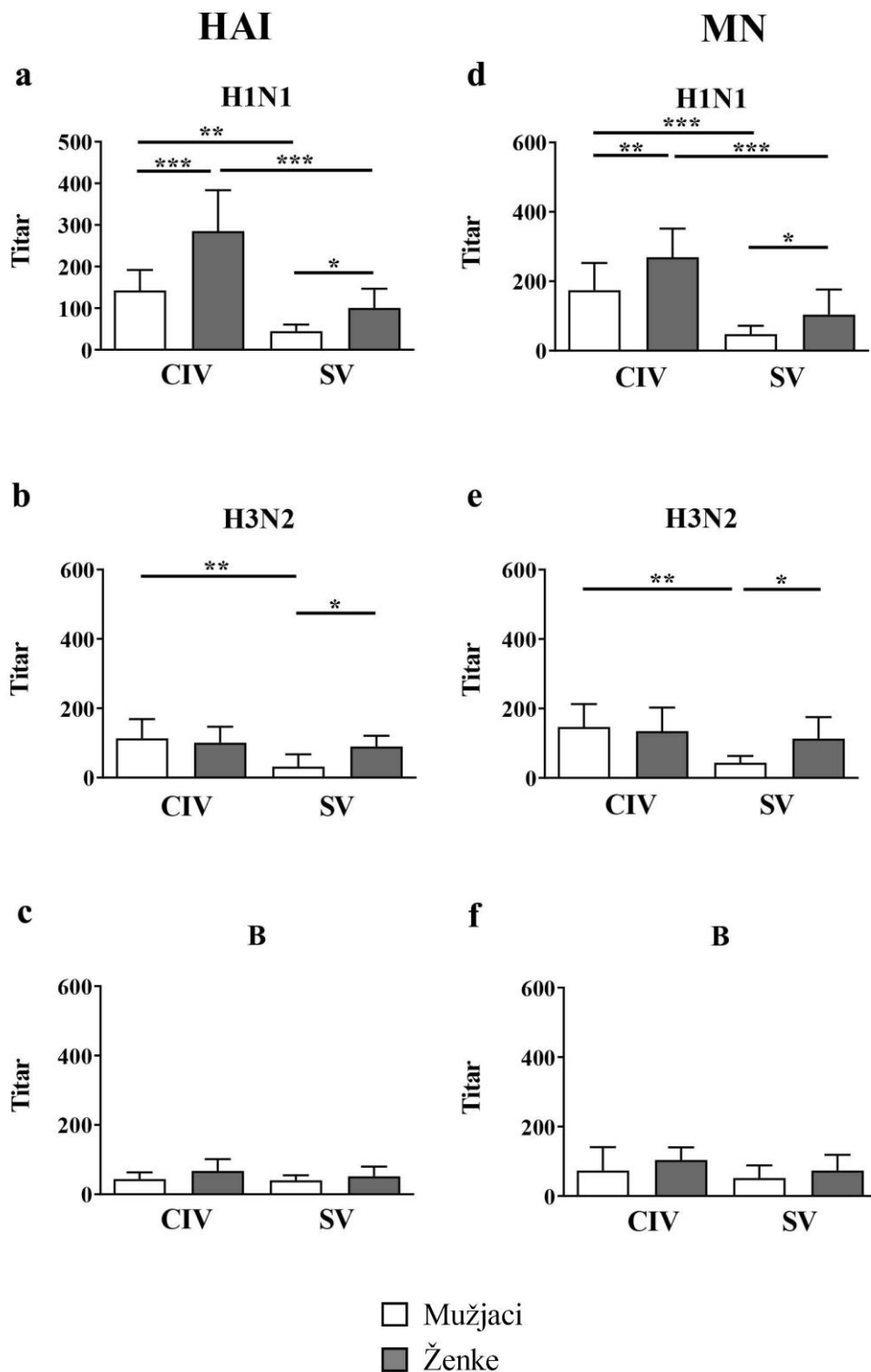


Slika 5. Titar IgG antitela specifičnih za sojeve virusa gripa sadržane u vakcinama u serumu mladih mužjaka i ženki *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom celovirusnom vakcinom (CIV) ili *split* vakcinom (SV). Miševi su imunizovani CIV-om ili SV-om u čiji sastav su ulazili H1N1 (A/California/7/2009), H3N2 (A/Perth/16/2009) i (B/Brisbane/60/2008) sojevi virusa gripa. Uzorci krvi su uzeti četiri nedelje nakon imunizacije i titri IgG antitela specifični za a) H1N1, b) H3N2 i c) B soj gripa su određeni ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N= 8 miševa po grupi. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.2.2. Titar antitela značajnih za protektivni odgovor protiv virusa gripa u serumu *Swiss* miševa imunizovanih vakcinom protiv gripa zavisi od pola miševa, soja virusa i tipa vakcine

Serumi *Swiss* miševa koji su imunizovani CIV-om i SV-om, ispitani su i na prisustvo funkcionalnih (značajnih za protektivni odgovor) antitela testovima HAI i MN, četiri nedelje nakon imunizacije. U serumima i mužjaka (HAI: $p < 0,01$; MN: $p < 0,001$) i ženki (HAI i MN: $p < 0,001$) miševa oba pola imunizovanih CIV-om nađen je veći titar funkcionalnih H1N1 virus-specifičnih antitela u poređenju sa serumima miševa imunizovanih sa SV-om (Slika 6 a i d). Bez obzira na test, titar antitela specifičnih za H3N2 soj virusa je bio veći u serumima miševa oba pola imunizovanih CIV-om u poređenju sa miševima imunizovanih SV-om, ali je ta razlika dostigla statističku značajnost samo kod mužjaka ($p < 0,01$) (Slika 6 b i e). Takođe, primećeno je da su i titri antitela specifičnih za B soj virusa bili veći u serumima mužjaka i ženki mladih *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om u poređenju sa serumima miševa odgovarajućeg pola imunizovanih SV-om, ali ni u jednom testu razlika nije dostigla statističku značajnost (Slika 2 c i f).

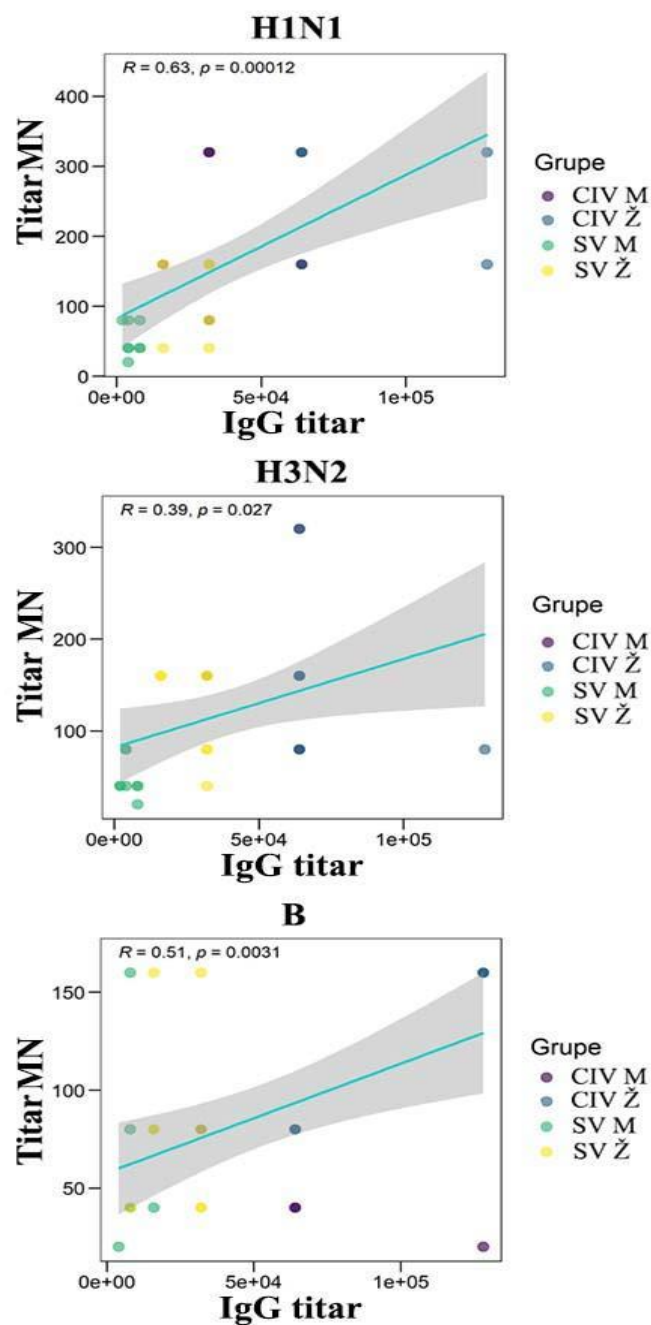
Analizom polnih razlika uočeno je da je kod miševa imunizovanih CIV-om (HAI: $p < 0,001$ MN: $p < 0,01$) ili SV-om ($p < 0,05$) titar funkcionalnih H1N1 virus-specifičnih antitela veći kod ženki u poređenju sa mužjacima (Slika 6 a i d). Veći titar ($p < 0,05$) H3N2 virus-specifičnih funkcionalnih antitela nađeni su u serumima ženki u poređenju sa mužjacima miševa imunizovanih SV-om samo HAI testom, dok, nezavisno od toga koji je test korišćen, statistički značajne polne razlike nije bilo kod miševa imunizovanih CIV-om (Slika 2b i e). Bez obzira na tip vakcine, nijednim od dva primenjena testa nisu utvrđene statistički značajne razlike u titru funkcionalnih antitela specifičnih za B soj virusa u serumu među polovima (Slika 2 c i f).



Slika 6. Titar funkcionalnih (značajnih za protektivni odgovor protiv virusa gripa) antitela specifičnih za sojeve virusa gripa koji su sadržani u vakcini, u serumima mužjaka i ženki mladih *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) ili sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV). Mladi *Swiss* miševi oba pola imunizovani su CIV-om ili SV-om koje su sadržale H1N1 (A/California/7/2009), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008) sojeve virusa. Četiri nedelje nakon imunizacije uzorkovana im je krv i određivan je titar funkcionalnih antitela testovima inhibicije hemaglutinacije

(HAI) i mikroneutralizacije (MN). Određivana su antitela specifična za H1N1 (a-HAI test; d-MN test), H3N2 (b-HAI test; e-MN test) i B (c-HAI test; f-MN test) sojeve virusa gripa. Rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N= 8 miševa po grupi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

U sledećem koraku ispitivana je korelacija između titra virus-specifičnih neutrališućih antitela i ukupnog titra virus-specifičnih IgG antitela Pirsonovim testom korelacije. Rezultati pokazuju da postoji pozitivna korelacija između titra neutrališućih antitela - antitela određenih MN testom i ukupnog titra H1N1, H3N2 i B virus-specifičnih IgG antitela (Slika 7). Budući da je pokazano da titri virus-specifičnih neutrališućih antitela i ukupnih IgG specifičnih antitela pozitivno koreliraju, u daljim istraživanjima ispitivan je samo ukupan IgG titar virus-specifični antitela.

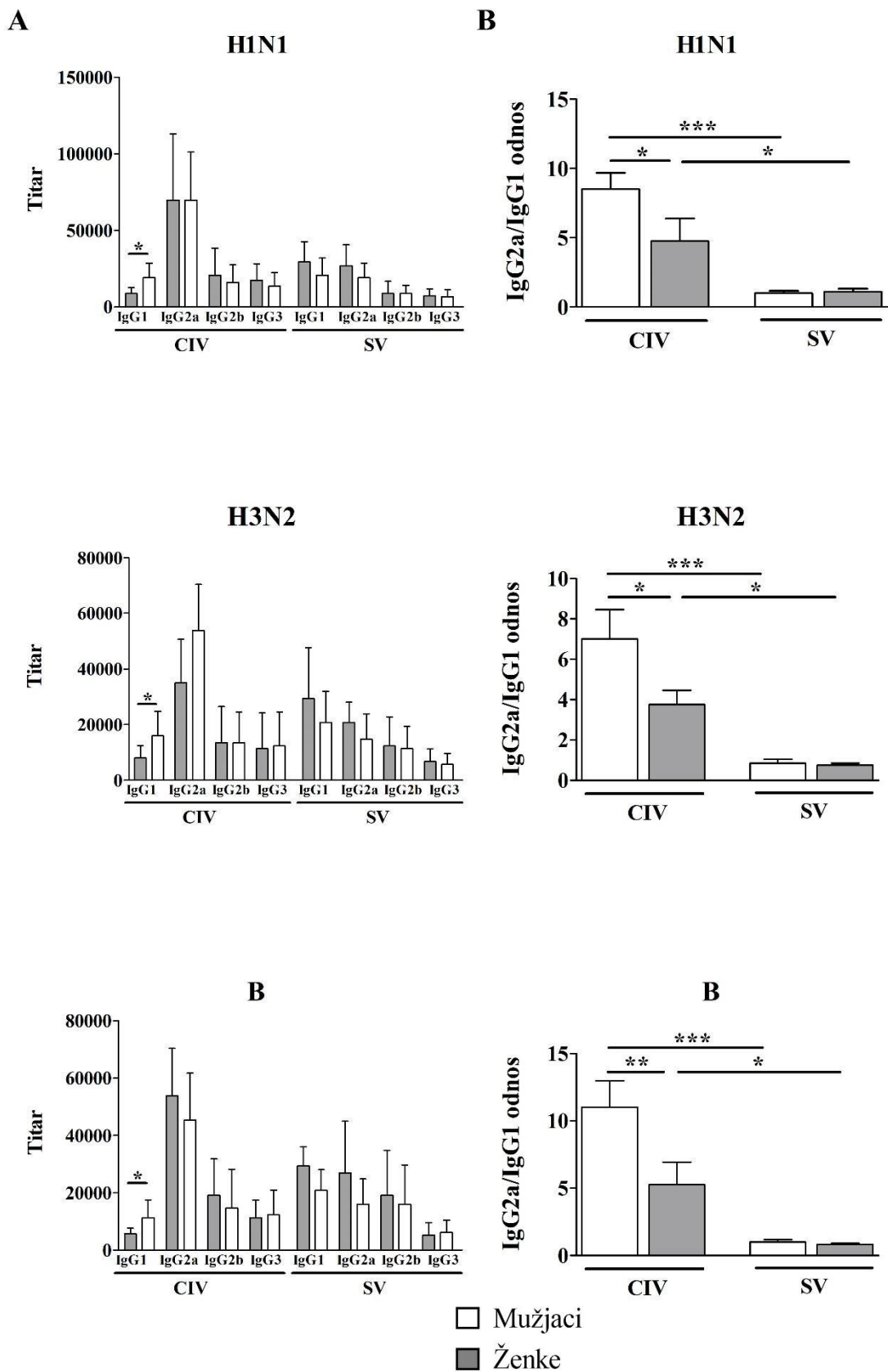


Slika 7. Titar IgG antitela specifičnih za sojeve viruse gripa u serumu mladih mužjaka i ženki *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) ili sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa pozitivno korelira sa titrom neutrališućih antitela (određenih MN testom) specifičnih za sojeve virusa gripa koji su sadržani u vakcini. Miševi su imunizovani CIV-om ili SV-om u čiji sastav su ulazili H1N1 (A/California/7/2009), H3N2 (A/Perth/16/2009) i (B/Brisbane/60/2008) sojevi virusa gripa. Uzorci krvi su uzeti četiri nedelje nakon imunizacije i titar IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B soj virusa gripa je određen ELISA testom. Na grafiku je prikazan R- Pirsonov koeficent korelacije i nivo značajnosti – p. CIV M, mužjaci imunizovani CIV-om; CIV Ž, ženke imunizovane CIV-om; SV M, mužjaci imunizovani SV-om; SV Ž, ženke imunizovane SV-om. N=8 miševa po grupi.

4.2.3. Profil potklasa IgG antiteala specifičnih za viruse sadržane u vakcini protiv gripa u serumu *Swiss* miševa zavisi od njihovog pola i tipa vakcine

U serumima mladih *Swiss* miševa oba pola imunizovanih CIV-om, slično kao i tri nedelje nakon imunizacije (prikazano u 4.1.3. odeljku ove disertacije), i četiri nedelje nakon imunizacije, IgG2a potklasa je bila najzastupljenija. Polne razlike nisu uočene u titru IgG2a antitela specifičnih za bilo koji od tri soja virusa gripa koja su ulazili u sastav CIV-a (Slika 8A). Međutim, u serumu ženki nađeni su niži titri IgG1 antitela specifičnih za sva tri soja virusa gripa ($p < 0,05$ za H1N1 i B soj, a $p < 0,01$ za H3N2 soj) u poređanju sa serumima mužjaka (Slika 8). Shodno tome, količnik titrova IgG2a/IgG1 antitela bio je veći kod ženki ($p < 0,05$ za oba A soja virusa i $p < 0,01$ za B) u poređanju sa mužjacima (Slika 8B). Ovaj nalaz sugerije favorizovano usmeravanje odnosa Th imenskog odgovora prema Th1 odgovoru [171] kod ženki miševa.

U serumima ženki i mužjaka imunizovanih SV-om nije bilo značajne razlike u titru IgG2a i IgG1 antitela specifičnih za svaki od tri soja virusa koji su ulazili u sastav ove vakcine (Slika 8A). Iz tog razloga, u serumima ovih miševa odnos titrova IgG2a/IgG1 antitela bio je približno jednak (Slika 8B) kod mužjaka i ženki miševa. Sa druge strane ni pol miševa ni tip vakcine nisu značajno uticali na titar IgG2b i IgG3 antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B soj virusa gripa (Slika 8).

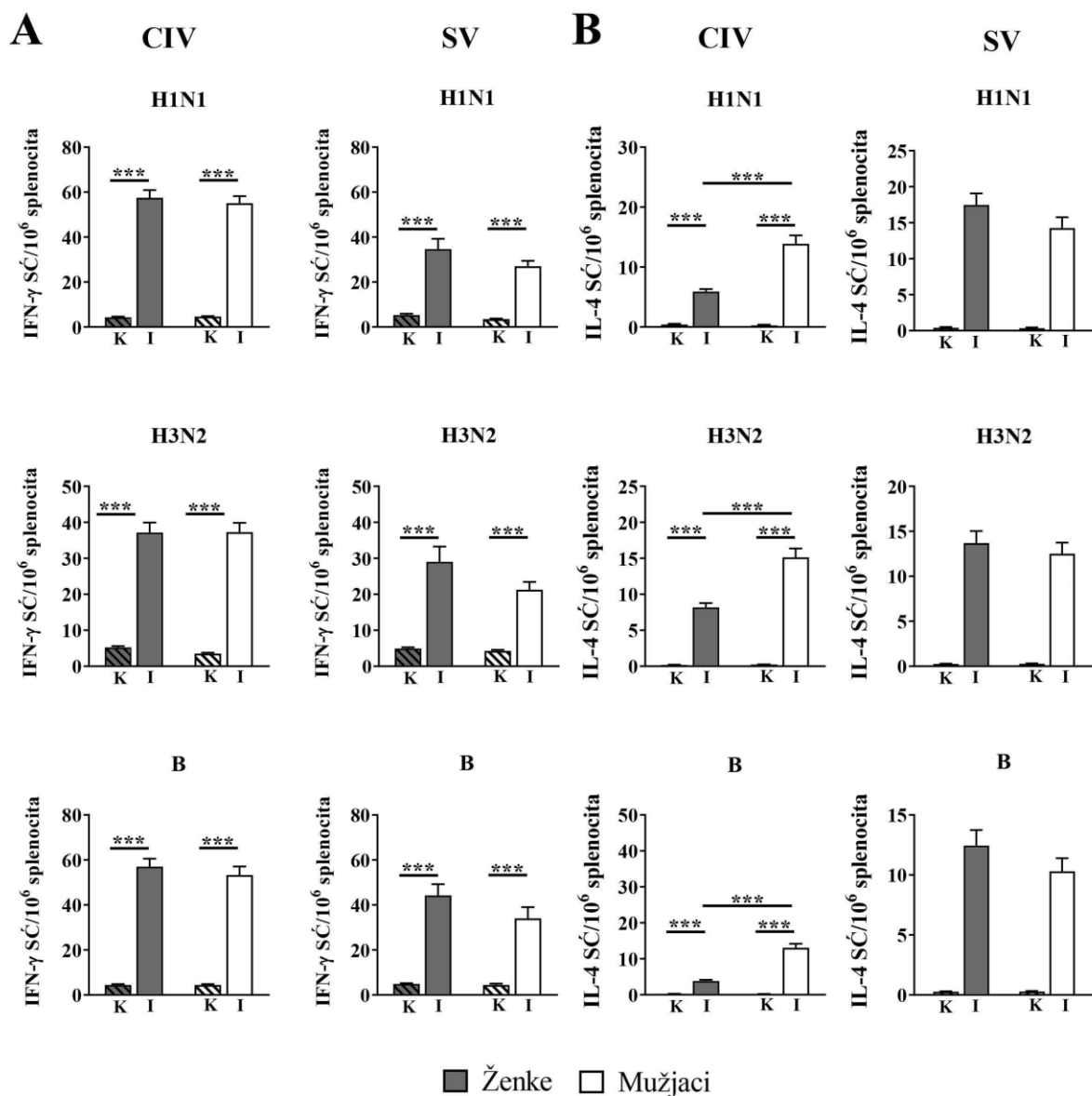


Slika 8. Profil potklasa IgG antitela specifičnih za H1N1 (A/California/7/2009), H3N2 (A/Perth/16/2009) i B (B/Brisbane/60/2008) sojeve virusa gripa koji su sadržani u vakcini i količnik tita IgG2a/IgG1 antitela u serumima mužjaka i ženki mladih *Swiss* miševa imunizovanih

sezonskom trovalentnom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) ili sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Mužjaci i ženke mladih *Swiss* miševa imunizovani su CIV-om ili SV-om protiv gripa. Krv je uzorkovana četiri nedelje nakon imunizacije i određeni je titar A) IgG potklasa i B) odnos titrova IgG2a/IgG1 antitela specifičnih za a) H1N1, b) H3N2 i c) B soj virusa gripa. Rezultati koji se odnose na titre potklasa su prikazani kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI), a oni koji se odnose na odnos potklasa kao aritmetička sredina \pm SEM. N=8 miševa po grupi. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.2.4. Tip vakcine protiv gripa utiče na polne razlike u broju splenocita koji sekretuju IL-4

Pomoću ELISPOT testa ispitana je sekrecija IFN- γ i IL-4 citokina u kulturi splenocita imunizovanih vakcinom protiv gripa životinja, nakon *in vitro* antigenima sva tri soja virusa gripa koji su ulazili u sastav ove vakcine. U kulturama splenocita mladih *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om i SV-om, restimulacija sa svakim od tri soja virusa koji su ulazili u sastav vakcina podstakla je sintezu IFN- γ i IL-4 citokina (Slika 9). Nakon *in vitro* restimulacije sa H1N1 ili H3N2 ili B sojem virusa gripa nije bilo razlike u broju ćelija koje sekretuju IFN- γ , citokin koji je karakterističan za Th1 tip imunskog odgovora između kultura splenocita izolovanih iz mužjaka i ženki imunizovanih CIV-om. (Slika 9). Broj ćelija koje sekretuju IL-4, citokin koji je Th2 tipa imunskog odgovora, bio je manji (p<0,001) u ćelijskim kulturama splenocita ženki u poređenju sa mužjacima imunizovanih miševa (Slika 9). U kulturama splenocita miševa imunizovanih SV-om nisu pronađene polne razlike u broju ćelija koje sintetišu IFN- γ kao ni u broju ćelija koje sintetišu IL-4, nakon restimulacije bilo kojim od tri soja virusa koji su ulazili u sastav vakcine protiv gripa (Slika 9). Ovi rezultati su u saglasnosti sa pokazanim odnosom titrova IgG2a/IgG1 potklasa, koji takođe upućuje da je kod ženki miševa imunizovanih CIV-om, za razliku od mužjaka, Th imunski odgovor više usmeren ka Th1 tipu imunskog odgovora.



Slika 9. Polne razlike u broju ćelija koji sekretuju IFN- γ i IL-4 u kulturama splenociti *Swiss* miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom celovirusnom inaktivisanom vakcinom (CIV) ili sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Splenociti su izolovani iz mužjaka i ženki miševa imunizovanih CIV-om ili SV-om (I) i iz kontrolnih, neimunizovanih miševa (K) 14 dana nakon imunizacije su restimulisani *in vitro* 48 sati sa H1N1 (A/California/7/2009), H3N2 (A/Perth/16/2009) ili B (B/Brisbane/60/2008) virusom koji su sadržani u vakcini protiv gripa koja je korišćena za imunizaciju. ELISPOT test je korišćen za utvrđivanje broja ćelija koje sekretuju citokine (SC) A) IFN- γ i B) IL-4. Broj ćelija koje su sekretovale ove citokine (SC) je određivan na osnovu broja tačaka u kulturama na 1×10^6 splenocita. Rezultati su predstavljani kao aritmetička sredina \pm SEM. N=8 miševa po grupi, ***p<0,001.

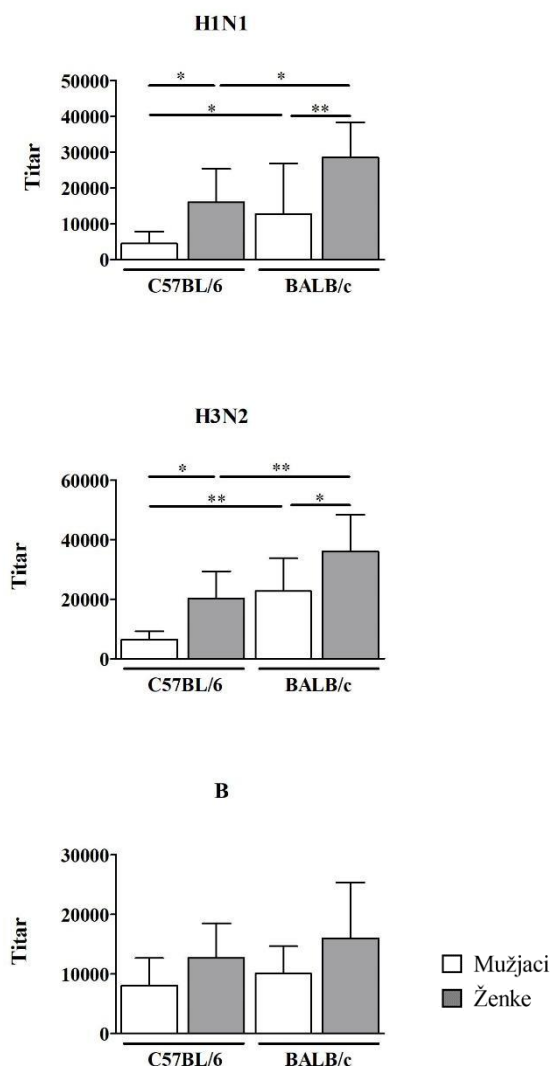
4.3.Uticaj genetske osnove miševa na polne razlike u odgovoru na vakcinu protiv gripa kod mladih adultnih životinja

U cilju ispitivanja uticaja genetske osnove na imunski odgovor na vakcinu protiv gripa, u sledeći segment istraživanja bili su uključeni mladi adultni (mladi) miševi visokosrodnih sojeva BALB/c i C57BL/6. Ovi sojevi su odabrani jer je poznato da se razlikuju prema sklonostima ka razvoju Th adaptivnog imunskog odgovora u odgovoru na antigenski stimulus, a što se smatra da je uslovljeno različitom genetskom osnovom [172,173]. Imunski odgovor je kod C57BL/6 miševa više usmeren ka Th1, dok je kod BALB/c miševa više usmeren ka razvoju Th2 tipa odgovora [174]. Budući da je utvrđeno da i pri slabijem imunskom odgovoru koji je izazvan imunizacijom SV-om postoje polne razlike, i da je ovaj tip vakcine u češćoj upotrebi, dalja istraživanja su rađena na životinjama imunizovanim ovom vakcinom.

4.3.1.Soj i pol mladih adultnih miševa utiču na titar virus-specifičnih IgG antitela u serumima miševa imunizovanih SV-om, ali ne i na njihov aviditet

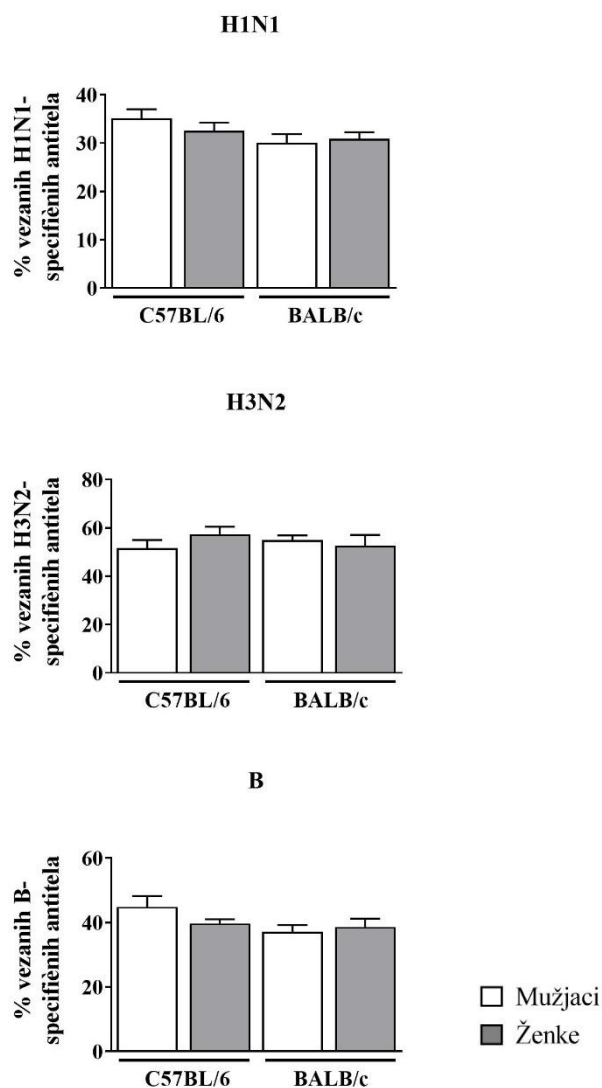
Četiri nedelje nakon imunizacije mladih mužjaka i ženki BALB/c i C57BL/6 miševa SV-om u njihovom serumu određivan je titar IgG antitela specifičnih za svaki od tri soja virusa koji su ulazili u sastav vakcine. U serumu miševa BALB/c soja oba pola pronađen je veći titar IgG antitela specifičnih za H1N1 ($p<0,05$) i H3N2 ($p<0,01$) soj virusa u poređenju sa serumima C57BL/6 miševa, dok se titar IgG antitela specifičnih za virus B soja nije statistički značajno razlikovao između ova dva soja miševa istog pola (Slika 10). Uočene su i polne razlike u sintezi H1N1 i H3N2 virus-specifičnih IgG antitela. Ženke miševa oba soja imale su veći titar IgG antitela specifičnih za H1N1 ($p<0,05$ kod C57BL/6 i $p<0,01$ kod BALB/c) i H3N2 ($p<0,05$) soj virusa (Slika 10). Titar IgG antitela specifičnih za virus B soja je takođe bio veći kod ženki oba soja, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost (Slika 10).

IgG titar



Slika 10. Pol i soj mladih adultnih miševa utiču na titar IgG antitela specifičnih za sojeve virusa gripa koji su ulazili u sastav sezonske trovalentne *split* inaktivisane vakcine (SV) protiv gripa. Mladi mužjaci i ženke miševa BALB/c i C57BL/6 soja su imunizovani SV-om koja je sadržavala A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) i B/Brisbane/60/2008 (B). Titar IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B sojeve je određivan u serumima četiri nedelje nakon imunizacije ELISA testom, titracijom do krajnjeg razblaženja. Podaci su prikazani kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N=6 miševa po grupi. *p<0,05; **p<0,01.

Pored kvantitativnog određivanja titra antitela važan parametar za određivanje efikasnosti vakcine predstavlja i kvalitet (aviditet) virus-specifičnih antitela [175]. Povećanje aviditeta antitela sugerise formiranje GC, što je neophodno za uspostavljanje dugoročnog imunskog odgovora [175]. Stoga je ispitan i aviditet antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B sojeve virusa gripa. Nisu nađene ni polne ni sojne razlike u ovom parametru (Slika 11).



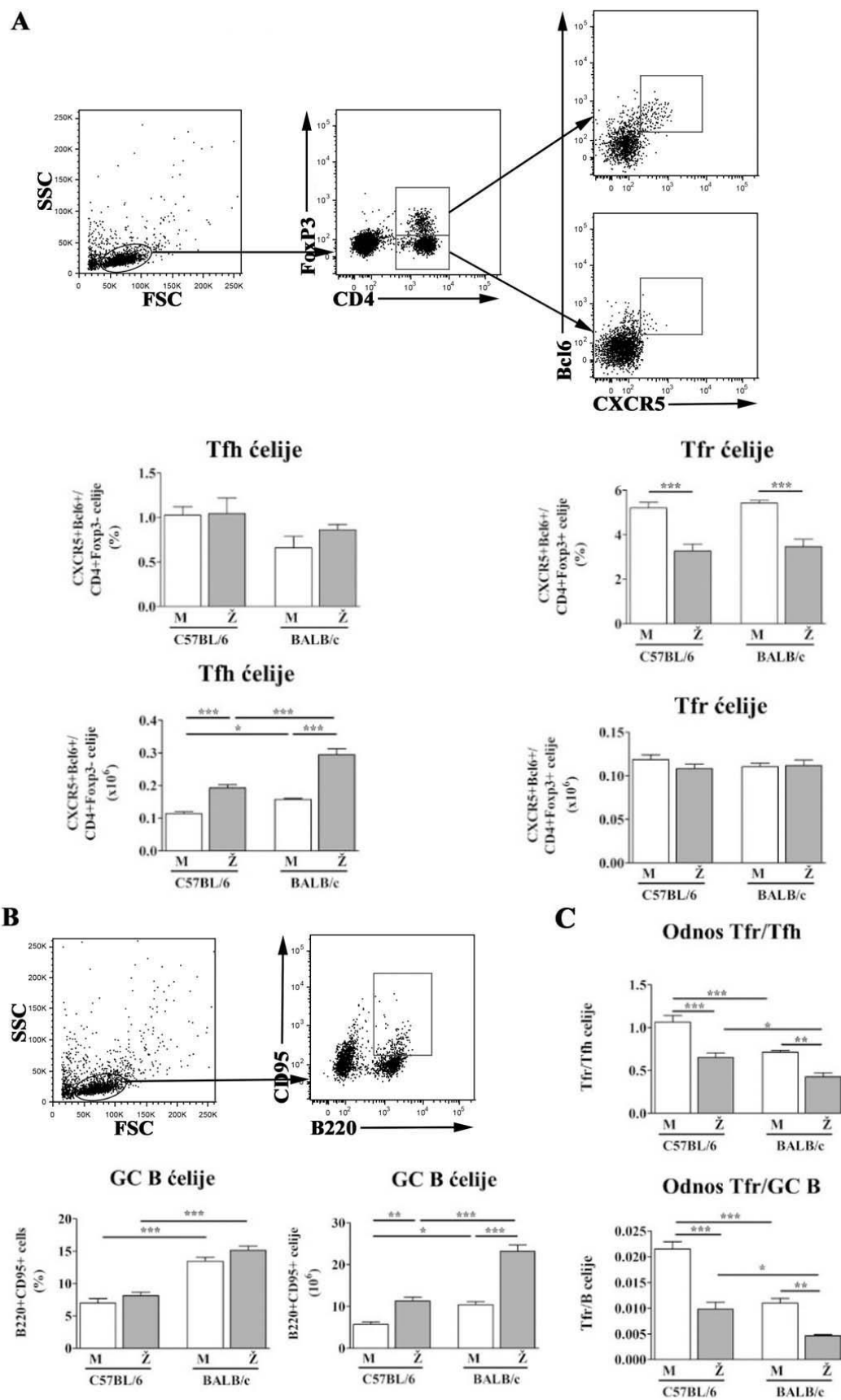
Slika 11. Aviditet IgG antitela specifičnih za sojeve virusa gripa koji su sadržani u sezonskoj trovalentnoj *split* inaktivisanoj vakcini (SV) protiv gripa vakcini nije se razlikovao između imunizovanih mladih adultnih miševa različitog soja i pola. Mladi mužjaci i ženke miševa BALB/c i C57BL/6 soja su imunizovani SV-om, u čiji sastav su ulazili: A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) i B/Brisbane/60/2008 (B) sojevi virusa gripa. Aviditet IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B soj virusa gripa određivan je modifikovanim ELISA testom. Serumi u određenom razblaženju su tretirani sa 1M KSCN. Procenat H1N1, H3N2 i B virus-specifičnih IgG antitela određen je kao količnik apsorbance nakon tretmana sa KSCN i apsorbance ne-tretiranih uzoraka x 100%. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SEM. N=6 miševa po grupi.

4.3.2. Soj i pol utiču na zastupljenost Tfh, Tfr i GC B-ćelija i njihove odnose u slezini mladih adultnih miševa imunizovanih SV-om

Humoralni odgovor na T-zavisne antigene je rezultat kompleksne interakcije Tfh, Tfr i B ćelija u GC u sekundarnim limfoidnim organima [58,176,177]. Stoga je ispitan procenat CXCR5+Bcl6+ u okviru CD4+Foxp3- i CD4+Foxp3+ ćelija i broj Tfh ćelija (CD4+CXCR5+Bcl6+Foxp3- fenotip) i Tfr ćelija (CD4+CXCR5+Bcl6+Foxp3+ fenotip) u slezini mladih mužjaka i ženki BALB/c i C57BL/6 soja miševa koji su imunizovani SV-om. Budući da je interakcija između Tfh i Tfr ćelija

ključna za produkciju visoko-afinitetnih antitela [178], izračunat je i količnik apsolutnog broja Tfr/Tfh ćelija kao „mera“ njihovog odnosa u slezini. Takođe, budući da Tfr ćelije imaju sposobnost inhibicije funkcije Tfh i GC B-ćelija, čime regulišu reakciju GC na antigenski stimulus [179], izračunat je i količnik apsolutnog broja Tfr/GC B-ćelija u slezini.

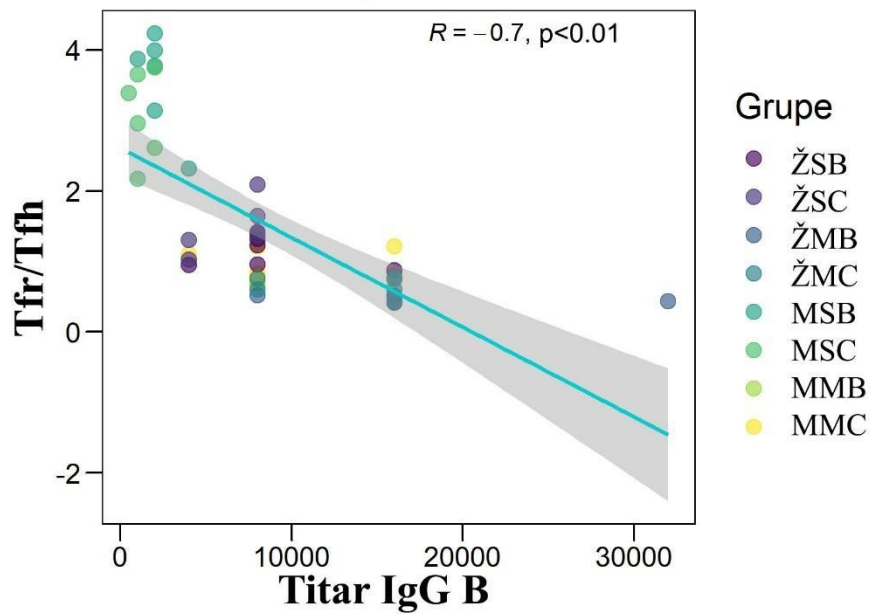
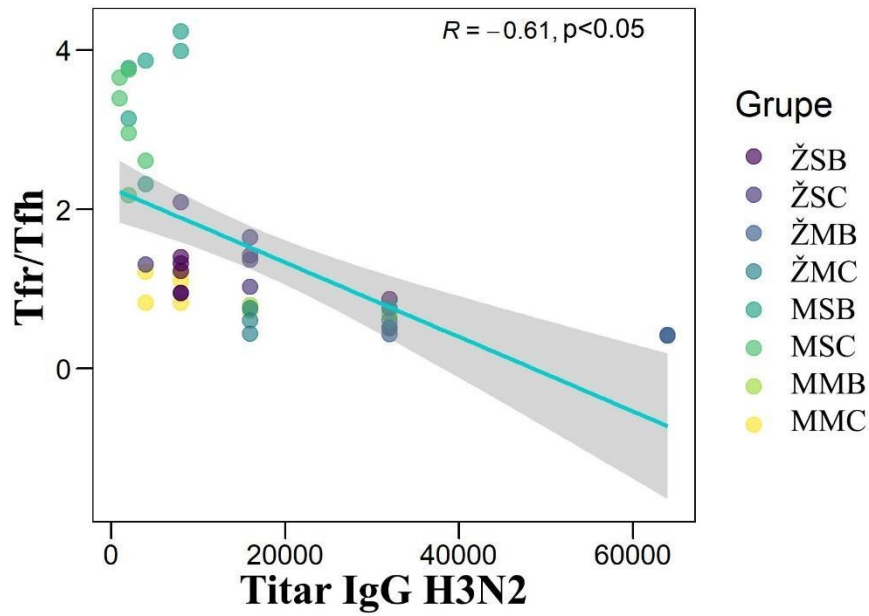
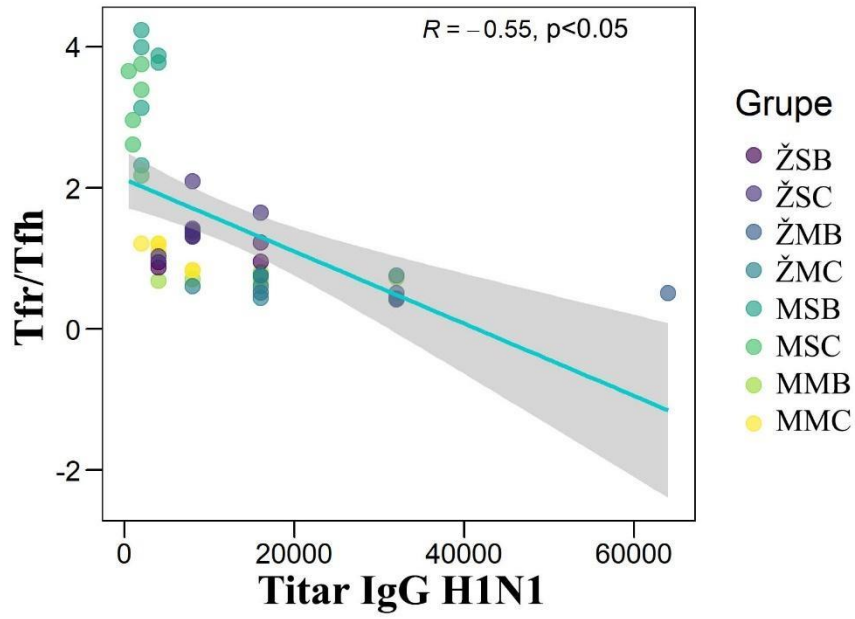
Nije pokazana polna razlika u procentu Tfh ćelija (procenat CXCR5+Bcl6+ u okviru CD4+Foxp3 ćelija) kod imunizovanih BALB/c i C57BL/6 miševa (Slika 12A). Međutim, miševi BALB/c soja su imali veći apsolutni broj Tfh ćelija u poređenju sa miševima C57BL/6 soja ($p < 0,001$ za ženke, $p < 0,05$ za mužjake) (Slika 12A). Takođe, kod oba soja miševa, apsolutni Tfh ćelija bio je značajno veći kod ženki u poređenju sa mužjacima miševa ($p < 0,001$) (Slika 12A). Analiza Tfr ćelija, posebne subpopulacije Th regulatornih ćelija, je pokazala da ne postoje značajne sojne razlike ni u procentualnoj zastupljenosti ni u broju Tfr ćelija kod imunizovanih miševa (Slika 12A). Analiza polnih razlika je pokazala manju ($p < 0,001$) procentualnu zastupljenost Tfr ćelija (procenat CXCR5+Bcl6+ u okviru CD4+Foxp3+ ćelija) kod ženki oba soja u poređenju sa mužjacima (Slika 12A). Međutim nije bilo polne razlike u apsolutnom broju Tfr ćelija (Slika 12A). Procenat GC B-ćelija (B220+CD95+ ćelije) u suspenziji splenocita, bio je veći ($p < 0,001$) kod BALB/c miševa oba pola u poređenju sa C57BL/6 miševima odgovarajućeg pola, dok polne razlike u njihovoj procentualnoj zastupljenosti nisu nađene (Slika 12B). Apsolutni broj GC B-ćelija je bio veći ($p < 0,05$ za mužjake i $p < 0,001$ za ženke) kod BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima odgovarajućeg pola (Slika 12B). Apsolutan broj ovih ćelija kod ženki miševa oba soja je bio veći ($p < 0,05$ za C57BL/6 i $p < 0,01$ za BALB/c miševe) u poređenju sa mužjacima istog soja (Slika 12B). Količnik apsolutnog broja Tfr/Tfh ćelija, koji se smatra merom efikasnosti inhibicije humoralnog odgovora od strane Tfr ćelija [180], bio je manji ($p < 0,001$ za mužjake, $p < 0,05$ za ženke) kod BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima istog pola, odražavajući relativno veću zastupljenost Tfh ćelija. Pored toga, kod ženki je u poređenju sa mužjacima oba soja miševa odnos broja Tfr/Tfh bio pomećen ka Tfh ćelijama ($p < 0,001$ za C57BL6 i $p < 0,01$ za BALB/c) (Slika 12C). Količnik apsolutnog broja Tfr/GC B-ćelija bio je manji ($p < 0,001$ za mužjake i $p < 0,05$ za ženke) u slezini BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima (Slika 12C). Ovaj količnik je bio manji kod ženki ($p < 0,001$ za C57BL6 i $p < 0,01$ za BALB/c miševe) u poređenju sa mužjacima kod oba soja odražavajući relativno veću zastupljenost GC B-ćelija (Slika 12C).



Slika 12. Zastupljenost Tfr, Tfh i GC B-ćelija i njihovi međusobni odnosi u slezini imunizovanih mladih adultnih miševa zavise od soja i pola miševa. Kod mladih mužjaka (M) i ženki (Ž) BALB/c i C57BL/6 soja miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom protiv

gripa (SV) koja sadrži A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 virusa (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A (H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virusa, dve nedelje nakon imunizacije urađena je splenektomija i ćelije su imunofluorescentno obojene za detekciju markera Tfh, Tfr i GC B-ćelija i analizu na protočnom citofluorometru. (A) Na reprezentativnim tačkastim protočno-citofluorometrijskim profilima prikazano je izdvajanje ćelija za analizu. Ćelije su na osnovu svoje veličine (engl. *forward scatter*, FSC) i stepena granuliranosti (engl. *side scatter*, SSC) selektovane u „limfocitni region“ i izdvojene (engl. *gated*), a potom su, na osnovu ispoljavanja CD4 i Foxp3 markera među njima izdvojene CD4+Foxp3+ ćelije (gornji kvadrant) i CD4+Foxp3- (donji kvadrant) u okviru kojih su, na osnovu ispoljenosti CXCR5 i Bcl6 markera izdvajane i analizirane CXCR5+Bcl6+ ćelije (sa leva na desno). Grafici prikazuju procenat CXCR5+Bcl6+ u okviru CD4+Foxp3- i CD4+Foxp3+ ćelija i apsolutne brojeve CD4+Foxp3-CXCR5+Bcl6+ (Tfh) ćelija i CD4+Foxp3+CXCR5+Bcl6+ (Tfr) ćelija u suspenziji splenocita ženki miševa soja BALB/c i C57BL/6 mužjaka. (B) Na reprezentativnim protočno-citofluorometrijskim tačkastim profilima prikazano je izdvajanje ćelija za analizu. Ćelije su na osnovu svoje veličine (FSC) i stepena granuliranosti (SSC) selektovane u „limfocitni region“ i izdvojene, a zatim su među njima, na osnovu ispoljenosti B220 i CD95 markera analizirane B220+CD95+ ćelije (sa leva na desno). Grafici prikazuju procenat i apsolutni broj B220+CD95+ GC B-ćelija u suspenziji splenocita ženki i mužjaka miševa BALB/c i C57BL/6 soja. (C) Na graficima je predstavljen odnos broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B-ćelija u slezinama ženki i mužjaka BALB/c i C57BL/6 miševa. Na graficima je predstavljena aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

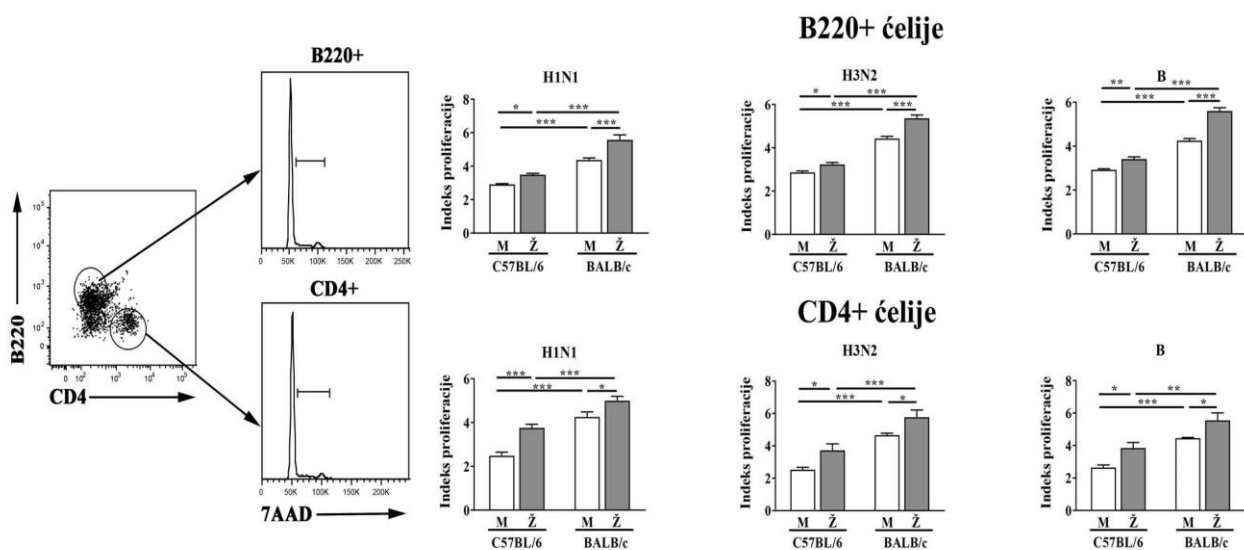
Ispitivana je i korelacija između odnosa broja Tfr i Tfh ćelija i sinteze H1N1, H3N2 i B virus-specifičnih antitela (Slika 13) Pirsonovim testom korelacije. Analiza je uključila mlade i stare miševe oba soja. Pokazano je da postoji negativna korelacija između odnosa broja Tfr i Tfh ćelija i sinteze antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B sojeve virusa gripa (Slika 13).



Slika 13. Odnos broja Tfr/Tfh ćelija je u negativnoj korelaciji sa sintezom antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B sojeve virusa gripa. Mladi i stari miševi BALB/c soja oba pola su imunizovani SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Broj ćelija je određen metodom protočne citofluorimetrije korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela (kao što je prikazano na slici 12), dok su titri IgG antitela specifičnih za vakcinalne antigene određeni u serumima imunizovanih životinja ELISA testom. Na grafiku je prikazan R – Pirsonov koeficijent korelacije i nivo značajnosti – p. ŽSB, ženke stare BALB/c; ŽSC, ženke stare C57BL/6; ŽMB, ženke mlade BALB/c; ŽMC, ženke mlade C57BL/6; MSB, mušjaci stari BALB/c; MSC, mušjaci stari C57BL/6; MMB, mušjaci mladi BALB/c; MMC, mušjaci mladi C57BL/6. N=6 životinja/grupi.

4.3.3. Soj i pol miševa imunizovanih SV-om uticali su na virus-specifičan proliferativni odgovor splenocita u kulturi

Indukcija uspešnog humoralnog imunskog odgovora uključuje klonsku ekspanziju antigen-specifičnih limfocita [181,182]. Humoralni imunitet protiv virusa gripa je zavisen od Th ćelija [183]. U skladu s prethodno navedenim činjenicama, ispitana je proliferacija Th (CD4+ ćelija) i B (B220+ ćelija) splenocita mladih C57BL/6 i BALB/c miševa imunizovanih SV-om nakon *in vitro* restimulacije antigenima H1N1, H3N2 ili B sojeva virusa. Kao kontrole korišćene su ćelije imunizovanih životinja koje su gajene samo u medijumu, bez dodatnih stimulatora (bazalna proliferacija). Proliferativni odgovor CD4+ ćelija ($p < 0,001$ za H1N1, $p < 0,001$ za H3N2 soj i $p < 0,001$ za B soj kod mušjaka i $p < 0,01$ za B soj kod ženki) i B220+ ćelija ($p < 0,001$) na restimulaciju antigenima bilo kojeg od tri soja koji se nalaze u vakcini protiv gripa bio je veći u kulturama splenocita BALB/c miševa u poređenju sa miševima C57BL/6 soja (Slika 14). Kod ženki miševa C57BL/6 (CD4+ ćelije: $p < 0,001$ za H1N1, $p < 0,05$ za H3N2 soj i $p < 0,05$ za B soj; B220+ ćelije: $p < 0,05$ za H1N1, $p < 0,05$ za H3N2 soj i $p < 0,01$ za B soj) i BALB/c soja (CD4+ ćelije: $p < 0,05$; B220+ ćelije: $p < 0,001$) utvrđen je veći proliferativni odgovor u poređenju sa mušjacima odgovarajućeg soja (Slika 14) bez obzira na soj virusa koji je korišćen za restimulaciju (Slika 14). Proliferativni odgovor je izražen kao indeks proliferacije, tj. kao odnos između procenta proliferišućih (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa) CD4+ i B220+ ćelija u kulturama splenocita sa stimulatorima i procenta proliferišućih ćelija gajenih bez prisustva stimulatora.

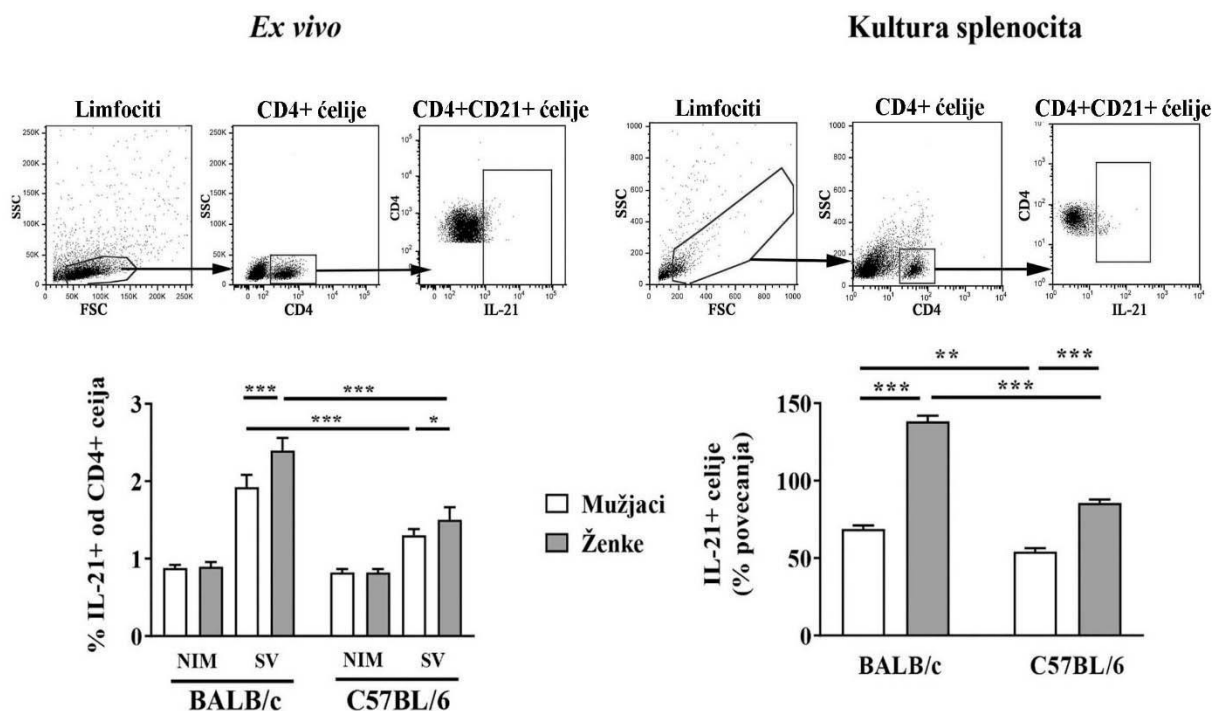


Slika 14. Soj i pol miševa uticao je na proliferativni odgovor splenocita nakon restimulacije antigenima virusa iz sezonske trovalentne *split* inaktivisane vakcine (SV) protiv gripa u kulturi. Mladi mužjaci (M) i ženke (Ž) miševa BALB/c i C57BL/6 imunizovani su SV-om koja sadrži: A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A (H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti eksperimentalnih životinja i gajeni 72 sata u kulturi u medijumu (RPMI-1640 sa 10% FCS) bez (kontrolne kulture) ili sa dodatkom antigena H1N1, H3N2 i B sojeva virusa gripa. Grafici prikazuju povećanje procenata B (B220+ ćelije) i Th (CD4+ ćelije) splenocita koji proliferišu u kulturi stimulisani antigenima H1N1, H3N2 ili B virusa u odnosu na odgovarajuće ćelije koje su kultivisane samo u medijumu, bez stimulatora (kontrolne kulture). Reprezentativni protočno-citofluorometrijski profili (levo) prikazuju izdvajanja ćelija (engl. *gating*) relevantnih za analizu. Na tačkastom protočno-citofluorimetrijskom profilu („limfocitni gate“, izdvojen kao što je pokazano na slici 12) prikazano je izdvajanje ćelija na osnovu ispoljavanja B220 i CD4 markera, a zatim su u okviru izdvojenih subpopulacija (B220+ i CD4+) splenocita analizirane ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa na osnovu bojenja fluorescentnom bojom 7-AAD, što je prikazano protočno-citofluorometrijskim histogramom. Proliferativni odgovor je predstavljen kao indeks proliferacije (odnos između procenta proliferišućih ćelija u kulturama sa stimulatorima i procenta proliferišućih ćelija u kontrolnim kulturama). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.4. Soj i pol utiču na sintezu IL-21 u CD4+ ćelijama slezine miševa imunizovanih SV-om

Citokin IL-21 sintetišu aktivirane Th ćelije, naročito Tfh i GC Tfh ćelije [184]. Ovaj citokin ima širok spektar delovanja, između ostalog utiče na proliferaciju, diferencijaciju i efektorske funkcije T- i B- ćelija [185,186]. Smatra se ključnim za formiranje GC i dugo-živećih plazma ćelija i faktorom od kojeg zavisi stvaranje visoko-afinitetnih antitela i memorijskih B-ćelija [187]. Iz tog razloga, a u cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi utvrđenih polnih i sojnih razlika u imunskom odgovoru na vakcinu, ispitana je zastupljenost IL-21+ ćelija u okviru populacije CD4+ splenocita izolovanih iz oba pola mladih miševa BALB/c i C57BL/6 soja dve nedelje nakon imunizacije *ex vivo*, kao i u kulturi, nakon 72 h restimulacije ovih ćelija antigenima virusa sadržanim u SV.

U subpopulaciji CD4+ splenocita miševa BALB/c soja procentualna zastupljenost IL21+ ćelija bila je veća ($p < 0,001$) u poređenju sa miševima C57BL/6 soja odgovarajućeg pola (Slika 15). Ženke oba soja imale su veći ($p < 0,001$ za BALB/c; $p < 0,05$ za C57BL/6) procenat IL-21+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ splenocita u poređenju sa mužjacima (Slika 15). Dodatno, sa ciljem da se potvrdi da su IL-21 sintetisale antigen-specifične ćelije, određivan je procenat IL-21+CD4+ ćelija specifičnih sojeve virusa gripa iz vakcine u kulturama splenocita koji su *in vitro* restimulisani antigenima koji potiču iz svih sojeva virusa sadržanim u vakcini i kulturama splenocita koji nisu restimulisani, već su kultivisani samo u medijumu. I ovi rezultati su pokazali isti trend, tj. nađen je veći ($p < 0,01$ za mužjake; $p < 0,001$ za ženke) procenat povećanja antigen-specifičnih CD4+IL-21+ splenocita kod BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima odgovarajućeg pola, kao i veće ($p < 0,001$) povećanje procentualne zastupljenosti ovih ćelija kod ženki u poređenju sa mužjacima odgovarajućeg soja (Slika 15).

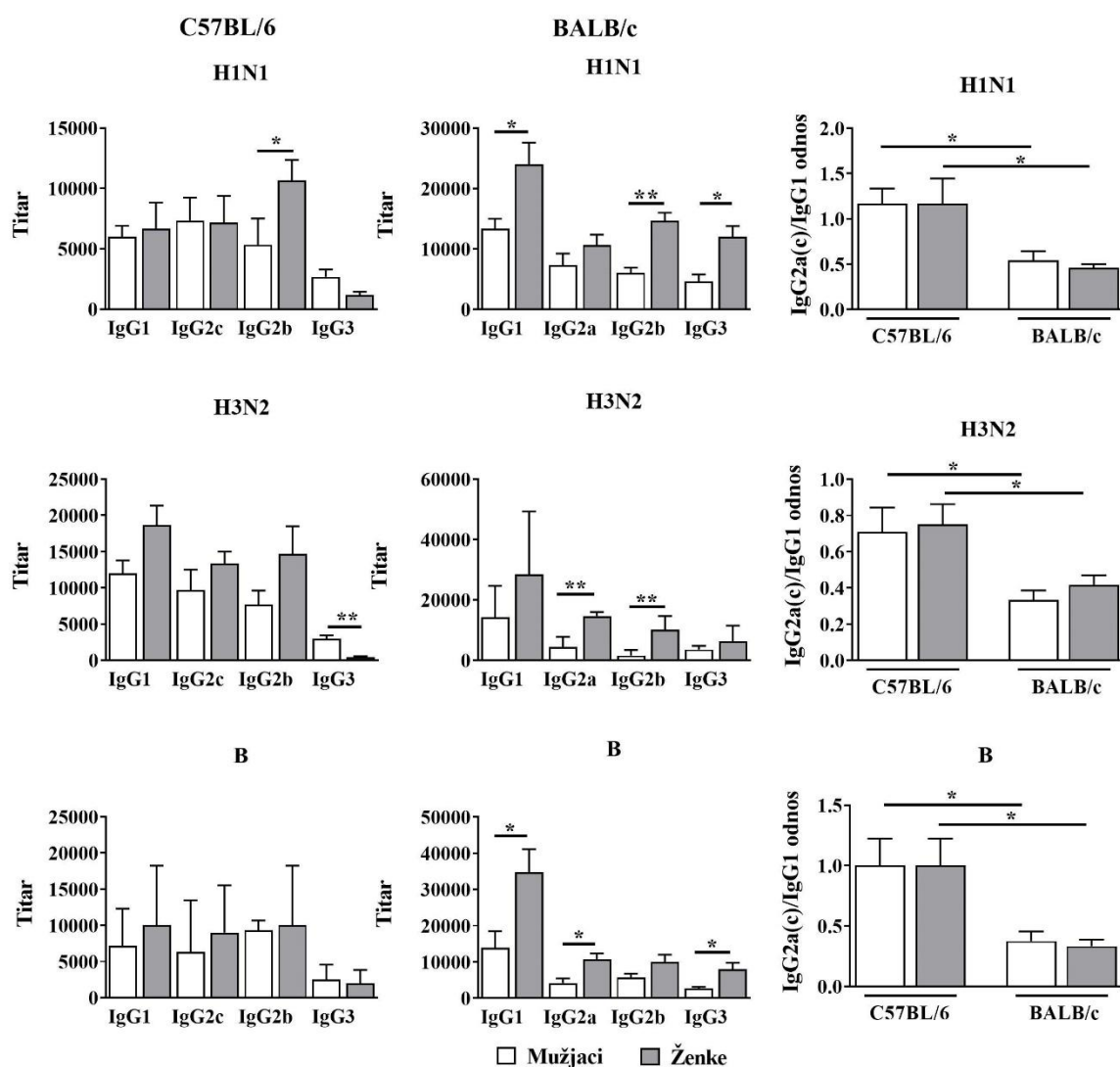


Slika 15. Soj i pol miševa imunizovanih trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa utiču na zastupljenost CD4+ T-splenocita koji sintetišu IL-21. Mladi BALB/c i C57BL/6 miševi oba pola imunizovani su SV-om sastava: A/California/7/2009(H1N1)pdm09, A/Texas/361/2011(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti i korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela metodom protočne citofluorometrije određivana je zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-21. Na reprezentativnim tačkastim protočno-citofluorometrijskim profilima prikazano je izdvajanje ćelija za analizu CD4+IL-21+ ćelija u svežim suspenzijama splenocita (gore levo) i u suspenzijama splenocita iz kulture (gore desno). Ćelije su i u sveže izolovanoj suspenziji i kulturi splenocita analizirane na isti način. Na osnovu veličine (engl. *forward scatter*, FSC) i stepena granuliranosti (engl. *side scatter*, SSC) ćelije su selektovane u „limfocitni region“ i izdvajane, a potom su u „limfocitnom regionu“ izolovane CD4+ ćelija (na osnovu ispoljavanja CD4 markera), a zatim u okviru ove subpopulacije i ćelija koje ispoljavaju IL-21 (CD4+IL-21+ ćelije). Grafici prikazuju učestalost IL-21+ ćelija u okviru CD4+ splenocita sveže izolovanih (*ex vivo*) iz neimunizovanih (NIM) i imunizovanih (SV) miševa. Prikazan je i porast procentualne zastupljenosti IL-21+ ćelija u subpopulaciji CD4+ ćelija u kulturi splenocita stimulisanih antigenima sadržanim u vakcini u odnosu na splenocite koji su kultivisani samo u medijumu, a koji su takođe izolovani iz miševa imunizovanih SV-om (tzv. indeks stimulacije). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.5. Soj miševa utiče na profil IgG potklasa u serumu

Profili IgG potklasa razlikuju se između različitih sojeva miševa [188,189]. U tom kontekstu važno je napomenuti da miševi soja C57BL/6 nemaju gene za produkciju antitela IgG2a potklase, ali je u njihovom serumu detektovano prisustvo IgG2c antitela [155,190]. Iz tog razloga smo kod ovog soja miševa u analizu uključili ovu potklasu IgG antitela. Analiza potklasa IgG antitela u serumima miševa četiri nedelje nakon imunizacije SV-om je pokazala da je u odgovoru na imunizaciju svim sojevima virusa gripa iz vakcine kod BALB/c miševa najzastupljenija IgG1 potklasa, dok kod C57BL/6 miševa nađena slična zastupljenost antitela potklasa IgG1 i IgG2c (Slika 16). Pokazano je

da su kod ženki miševa BALB/c soja titri svake od potklasa specifičnih za virus gripa IgG antitela veći nego kod mužjaka istog soja (Slika 16). Statistička značajnost dostignuta je za titar IgG1 antitela specifičnih za H1N1 i B soj ($p < 0,05$), titar IgG2a antitela za H3N2 ($p < 0,01$) i B soj virusa ($p < 0,05$), za titar IgG2b antitela specifičnih za H1N1 i H3N2 soj virusa ($p < 0,01$) i za IgG3 antitela za H1N1 i B soj virusa ($p < 0,05$) (Slika 16). Kod miševa C57BL/6 soja uglavnom nije primećena polna razlika u titrima potklasa IgG antitela specifičnih za virus gripa, izuzetak je veći titar IgG2b antitela specifičnih za H1N1 kod ženki u poređenju sa mužjacima ($p < 0,05$) i veći titar IgG3 antitela specifičnih za H3N2 kod mužjaka u poređenju sa ženkama ($p < 0,05$) (Slika 16). Mužjaci i ženke miševa soja BALB/c u poređenju sa miševima soja C57BL/6 imaju značajno nižu ($p < 0,05$) vrednost količnika titra antitela IgG2a/IgG1. Na osnovu ovih nalaza može se zaključiti da je Th imunski odgovor kod miševa BALB/c soja usmeren ka Th2 odgovoru (Slika 16).

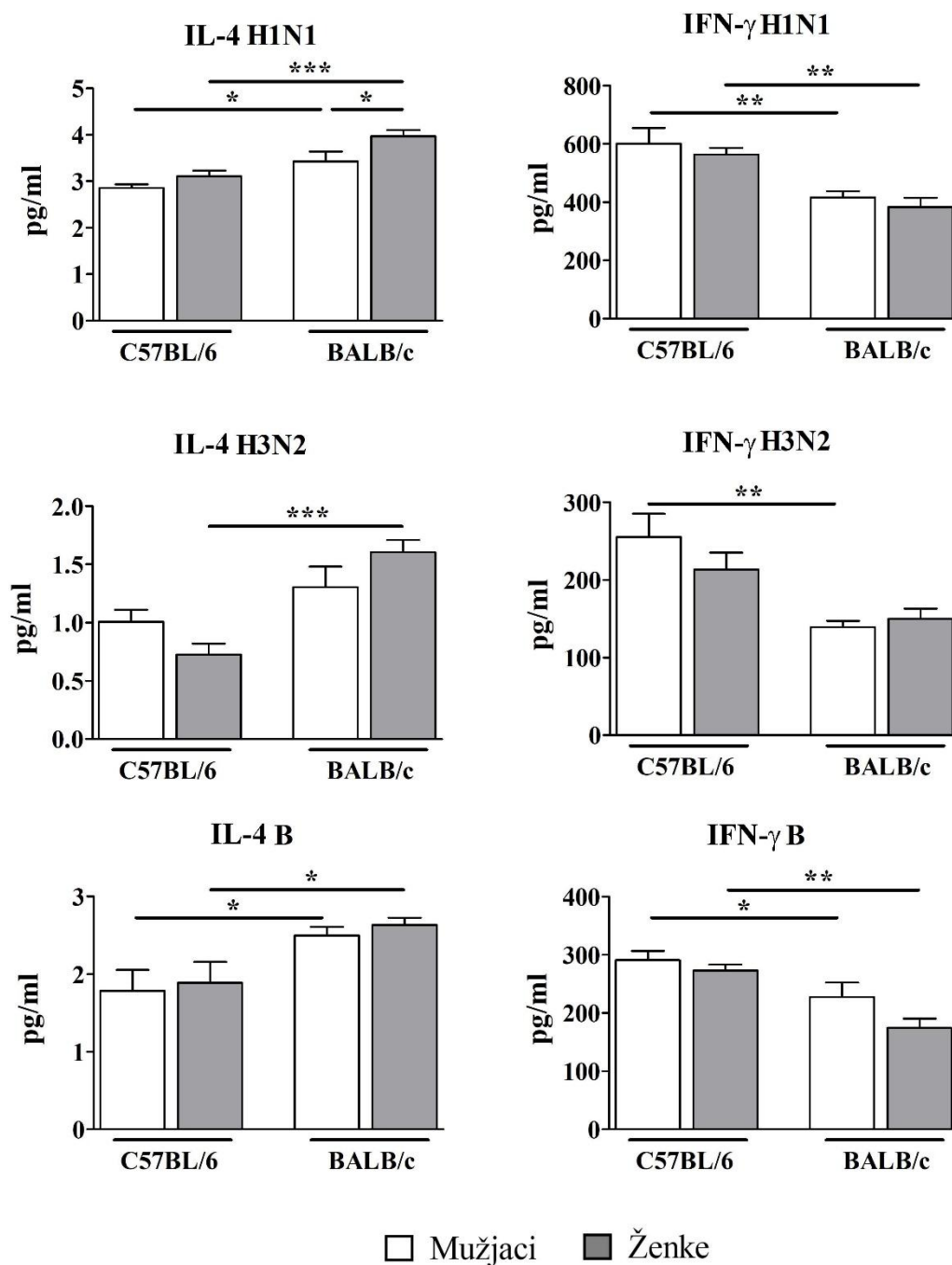


Slika 16. Soj miševa je uticao na profil IgG potklasa. Mladi mužjaci i ženke miševa BALB/c i C57BL/6 soja imunizovani su trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa koja je sadržala California/7/2009 (H1N1)pdm09 virusa (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumima su analizirani titri

IgG potklasa i izračunat je odnos titrova IgG2a(IgG2c)/IgG1 potklasa antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B virus gripa. Rezultati titrova antitela su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI), a odnosa potklasa antitela kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.3.6. Sinteza IFN- γ i IL-4 u ćelijama slezine miševa imunizovanih SV-om nakon restimulacije antigenima virusa iz vakcine zavisi od soja, ali ne i od njihovog pola

Koncentracije IFN- γ i IL-4 su izmerene u supernatantima kultura splenocita izolovanih iz mladih miševa C57BL/6 i BALB/c soja koji su imunizovani SV-om i restimulisani *in vitro* antigenima svih sojeva virusa gripa iz vakcine. U saglasnosti sa dobijenim rezultatima za profile IgG potklasa, splenociti BALB/c miševa u kulturi su sintetisali veću količinu IL-4 citokina nakon restimulacije antigenima svih sojeva virusa gripa iz vakcine (Slika 17). Tačnije, splenociti mužjaka ($p < 0,05$) i ženki ($p < 0,001$) BALB/c miševa su kao odgovor na restimulaciju antigenima H1N1 i B soja virusa gripa ($p < 0,05$ za oba pola) sintetisali veću količinu IL-4 u poređenju sa splenocitima C57BL/6 miševa odgovarajućeg pola (Slika 17). Međutim, nakon restimulacije splenocita H3N2 antigenom, razlika u koncentraciji IL-4 je bila statistički značajna ($p < 0,001$) samo između kultura splenocita ženki BALB/c i C57BL/6 miševa (bila je veća u kulturama splenocita ženki BALB/c miševa) (Slika 17). Sa druge strane, u odgovoru na *in vitro* restimulaciju antigenima svih sojeva virusa gripa iz vakcine splenociti BALB/c miševa sintetisali su manju količinu IFN- γ u poređenju sa C57BL/6 miševima odgovarajućeg pola (Slika 17). Ova razlika dostigla je statističku značajnost nakon restimulacije antigenima virusa H1N1 ($p < 0,01$ kod oba pola) i B soja ($p < 0,05$ za mužjake i $p < 0,01$ za ženke) (Slika 17). Značajno niža sinteza IFN- γ ($p < 0,01$) detektovana je i nakon restimulacije splenocita mužjaka BALB/c miševa antigenima H3N2 virusa u poređenju sa mužjacima C57BL/6 soja (Slika 17).



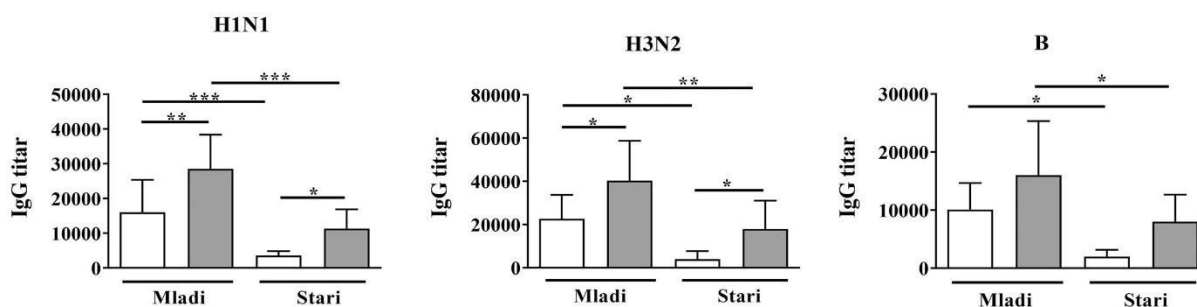
Slika 17. Sinteza IL-4 i IFN- γ u splenocitima izovanih iz miševa imunizovanih trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa nakon restimulacije antigenima virusa iz vakcine zavisi od soja miševa. Grafici predstavljaju koncentraciju citokina IL-4 i IFN- γ u supernatantima kultura splenocita mužjaka i ženki miševa C57BL/6 i BALB/c soja izolovanim dve nedelje nakon imunizacije *split* inaktivisanom vakcinom koja sadrži A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus, a restimuliranih tokom 72 sata antigenim virusa H1N1, H3N2 ili B soja. Koncentracije su određivane ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa sa različitim genetskom osnovom

4.4.1. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod BALB/c miševa

4.4.1.1. Pol i starost BALB/c miševa imunizovanih sa SV-om utiču na titar i aviditet IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u vakcine u serumu

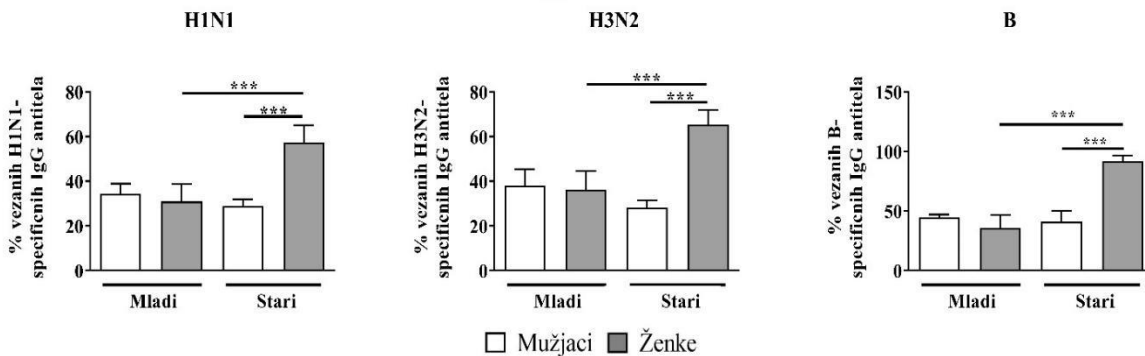
Četiri nedelje nakon imunizacije u serumu mladih i starih BALB/c miševa oba pola ispitan je titar IgG antitela, specifičnih za antigene svakog od tri soja virusa koji su ulazili u sastav SV-a. Uočeno je da je titar IgG antitela niži kod starih u poređenju sa mladim miševima istog pola ($p < 0,001$ za antitela specifična za H1N1 soj kod oba pol; $p < 0,05$ kod mužjaka i $p < 0,01$ kod ženki za antitela specifična za H3N2 soj i $p < 0,05$ za antitela specifična za B soj kod oba pola) (Slika 18). Pokazno je da su titri IgG antitela protiv antigena virusa gripa tipa A bili viši (za H1N1: $p < 0,01$ kod mladih i $p < 0,05$ kod starih životinja; za H3N2: $p < 0,05$ kod miševa obe starosti) u serumima ženki u poređenju sa mužjacima miševa obe starosne grupe (Slika 18). Za titar IgG antitela specifičnih za B tip virusa gripa uočen je isti trend, ali ove razlike nisu bile statistički značajne (Slika 18).



Slika 18. Titar IgG antitela specifičnih za antigene sojeva virusa gripa sadržane u vakcini u serumu BALB/c miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa zavisi od pola i starosti miševa. Mladi i stari miševi BALB/c soja oba pola su imunizovani SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije uzeti su uzorci krvi i u serumima je određen titar IgG antitela specifičnih za vakcinalne antigene ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Da bi se utvrdio uticaj pola na kvalitet antitela indukovanih imunizacijom SV-om, ispitan je aviditet IgG antitela specifičnih za svaki od tri pojedinačna soja virusa koji su ulazili u sastav vakcine. Nije bilo polne razlike u aviditetu IgG antitela specifičnih za antigene H1N1, H3N2 i B soja virusa koji su ulazili u sastav SV-a mladih BALB/c miševa (Slika 19). Međutim, neočekivano, IgG antitela specifična za antigene sva tri soja virusa koji ulaze u vakcinu iz seruma starih ženki pokazala su veći ($p < 0,001$) aviditet u poređenju sa mladim miševima istog pola i u poređenju sa starim miševima muškog pola (Slika 19).

Aviditet IgG antitela



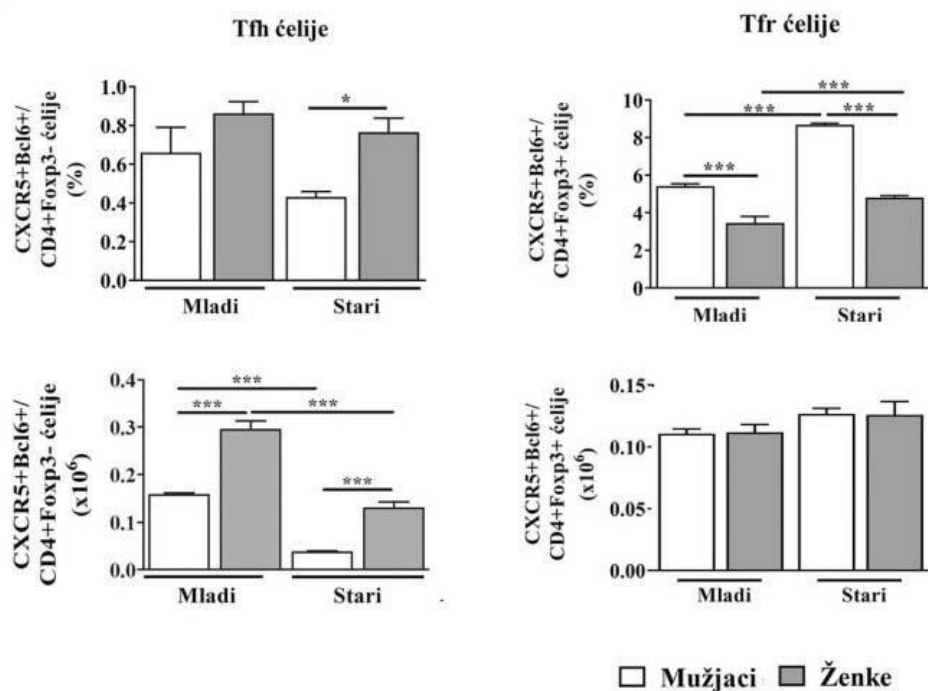
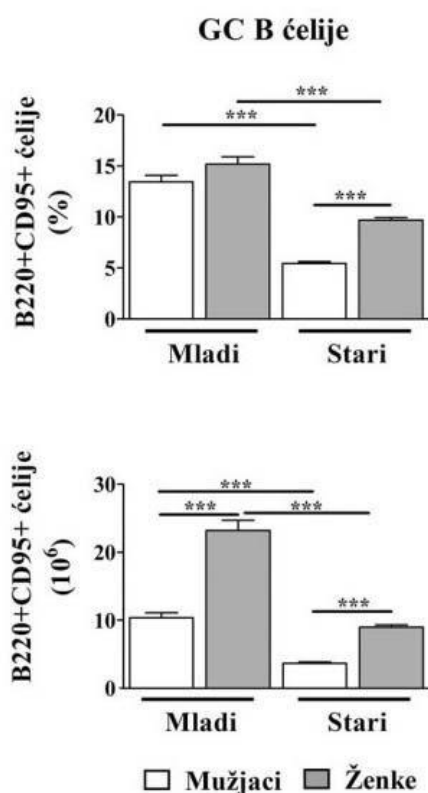
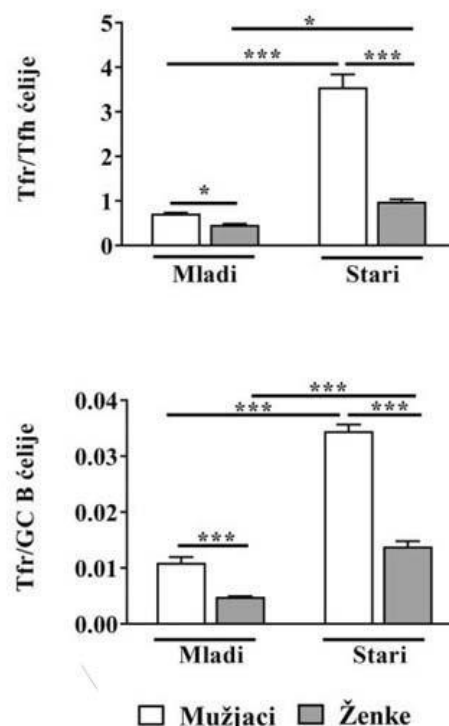
Slika 19. Aviditet IgG antitela specifičnih za viruse sojeva H1N1, H3N2 i B koji su sadržani u sezonskoj trovalentnoj *split* inaktiviranoj vakcini (SV) protiv gripa povećava se kod ženki, ali ne i kod mužjaka BALB/c miševa imunizovanih ovom vakcinom starenjem. Mladi i stari miševi BALB/c soja imunizovani su SV-om sledećeg sastava: A/California/7/2009(H1N1)pdm09 (H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumima miševa, modifikovanim ELISA testom, utvrđen je aviditet IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B sojeve virusa gripa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. ***p < 0,001.

4.4.1.2. Starost i pol utiču na zastupljenost Tfh, Tfr i GC B-ćelija u slezini kod miševa imunizovanih SV-om

Ispitan je procenat, apsolutni broj Tfh, Tfr i GC B-ćelija, kao i njihov odnos (izražen kao količnik njihovog broja) u slezinama mladih i starih BALB/c miševa oba pola dve nedelje nakon imunizacije SV-om. Procentualna zastupljenost Tfh ćelija nije se značajno razlikovala između mladih i starih miševa istog pola (Slika 20A). Međutim, kod starih miševa procenat CXCR5+Bcl6+ ćelija u okviru CD4+Foxp3- (Tfh) ćelija bio je veći (p<0,05) kod ženki u poređenju sa mužjacima (Slika 20A). Starenje je dovelo do smanjenja ukupnog broja splenocita i kod ženki ($156,3 \pm 9,66 \times 10^6$ kod mladih vs $92,54 \pm 1,35 \times 10^6$ kod starih) i kod mužjaka ($85,90 \pm 2,63 \times 10^6$ kod mladih vs $67,63 \pm 1,48 \times 10^6$ kod starih) miševa. Posledično je i broj Tfh splenocita bio manji (p<0,001) kod starih u poređenju sa mladim miševima oba pola (Slika 20A). Pokazano je i da je broj Tfh splenocita veći (p<0,001) kod mladih i starih ženki miševa u poređenju sa mužjacima odgovarajuće starosti (Slika 19A). Sa druge strane, procenat CXCR5+Bcl6+ ćelija u okviru CD4+Foxp3+ (Tfr) ćelija se povećao (p<0,001) starenjem kod miševa oba pola (Slika 20A). Međutim, apsolutni broj Tfr ćelija se nije menjao starenjem ni kod mužjaka ni kod ženki miševa (Slika 20A). Kod životinja oba uzrasta, ženke su imale manju (p<0,001) procentualnu zastupljenost CXCR5+Bcl6+ ćelija u okviru CD4+Foxp3+ (Tfr) ćelija upoređenju sa mužjacima miševa, dok je broj ovih ćelija bio uporediv između polova (Slika 20A). Procenat i apsolutni broj GC B-ćelija u slezinama starih miševa bili su manji (p<0,001) u poređenju sa mladim miševima kod oba pola (Slika 20B). Iako kod mladih miševa nije bilo polne razlike u procentualnoj zastupljenosti GC B-ćelija u slezini, kod starih miševa uočena je veća (p<0,001) procentualna zastupljenost kod ženki u poređenju sa mužjacima (Slika 20C). Apsolutni broj GC B-ćelija je bio veći (p<0,001) u slezini ženki u poređenju sa ovim brojem u slezini mužjaka u obe starosne grupe (Slika 20B).

Količnik apsolutnog broja Tfr/Tfh ćelija bio je veći (p<0,05 za ženke i p<0,001 za mužjake) kod starih u poređenju sa mladim miševima oba pola, što ukazuje na smanjenje broja Tfh ćelija (Slika

20B). Pored toga, u poređenju sa mužjacima, kod ženki mladih i starih miševa ovaj količnik je bio manji ($p < 0,05$ za mlade i $p < 0,001$ za stare) kao rezultat većeg broja Tfh ćelija (Slika 20C). Kao posledica smanjenja broja GC B-ćelija starenjem, količnik broja Tfr/GC B-ćelija se povećao ($p < 0,001$) kod starih u poređenju sa mladim miševima oba pola (Slika 20C). Takođe je uočeno da je ovaj količnik niži ($p < 0,001$) u slezini ženki u poređenju sa slezinom mužjaka kod miševa u obe starosne grupe, što je posledica većeg broja GC B-ćelija u slezini ženki miševa u odnosu na mužjake (Slika 20C).

A**B****C**

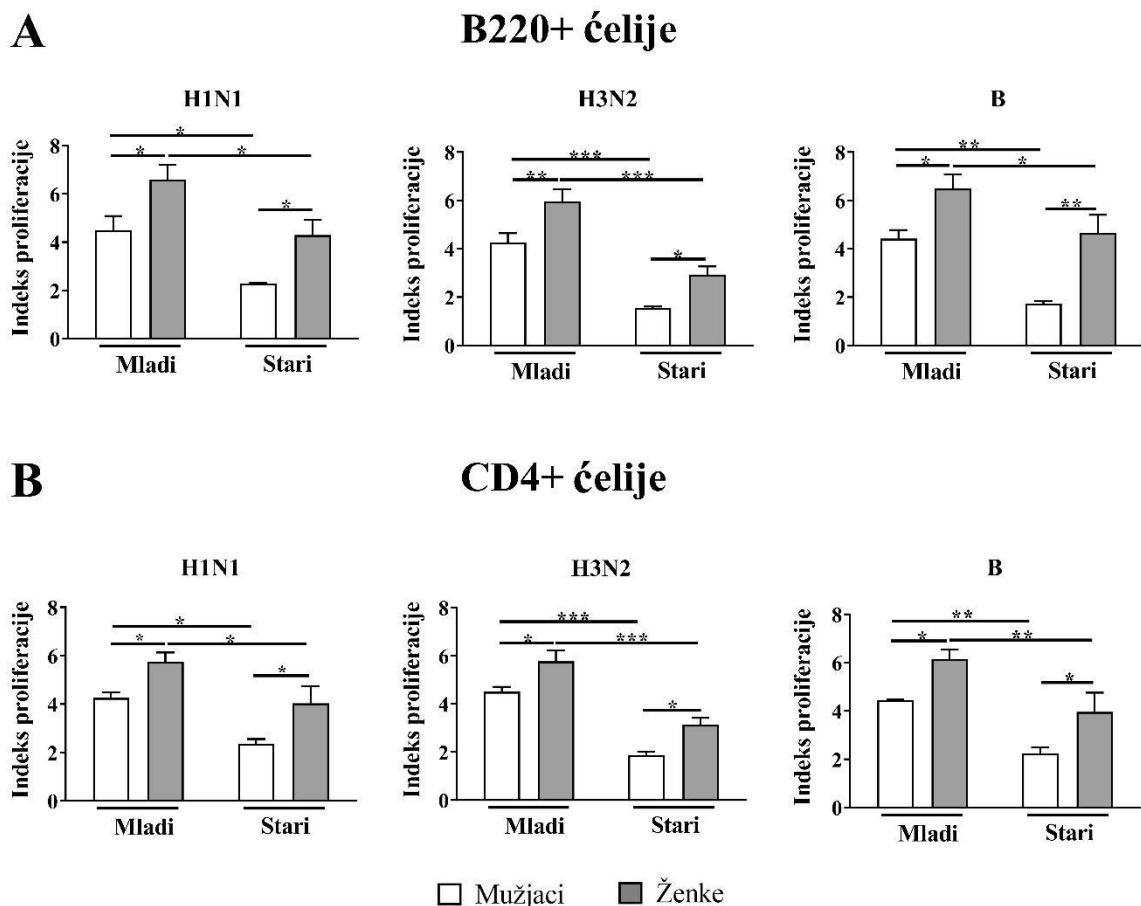
Slika 20. Zastupljenost Tfh, Tfr i GC B splenocita kod mladih i starih BALB/c miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa zavise od pola i uzrasta životinja. Mladi i stari miševi BALB/c soja imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i

B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovana je slezina i ćelije su imunofluorescentno obojene za detekciju markera Tfh, Tfr i GC B-ćelija i analizu na protočnom citofluorometru. Strategija je prikazana na Slici 12. (A) Grafici prikazuju procenat CXCR5+Bcl6+ u okviru CD4+Foxp3- i CD4+Foxp3+ ćelija i apsolutne brojeve CD4+CXCR5+Bcl6+Foxp3- (Tfh) ćelija i CD4+CXCR5+Bcl6+Foxp3+ (Tfr) ćelija u suspenziji splenocita ženki miševa soja BALB/c i C57BL/6 mužjaka. Strategija izdvajanja ćelija za relevantnu analizu je prikazana na Slici 12A. (B) Grafici prikazuju procenat i apsolutni broj B220+CD95+ GC B-ćelija u suspenziji splenocita mladih i starih ženki i mužjaka miševa BALB/c soja. Strategija izdvajanja ćelija za relevantnu analizu prikazana je na Slici 12B. (C) Na graficima je predstavljen odnos broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B-ćelija u slezinama ženki i mužjaka BALB/c i C57BL/6 miševa. Na graficima je predstavljena aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4.1.3. Pol i starost utiču na proliferativni odgovor B220+ i CD4+ splenocita izolovanih iz BALB/c miševa imunizovanih SV-om na restimulaciju antigenima sojeva virusa iz vakcine u kulturi
Rezultati su prikazani kao indeks proliferacije i on predstavlja odnos između procenta proliferišućih (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa) CD4+ i B220+ ćelija u kulturama splenocita sa stimulatorima i procenat proliferišućih ćelija gajenih bez prisustva stimulatora. Određen je odnos procenta proliferišućih ćelija u kulturi splenocita restimuliranih antigenima iz vakcine i procenta proliferišućih ćelija koje su kultivisane samo u medijumu (kontrolna kultura, bazalna proliferacija), odnosno tzv. indeks proliferacije.

U kulturama splenocita starih BALB/c miševa imunizovanih SV-om detektovan je smanjen proliferativni odgovor B220+ ćelija na *in vitro* restimulaciju antigenima H1N1 (p<0,05), H3N2 (p<0,001) i B (p<0,01 kod mužjaka i p<0,05 kod ženki) virusa iz vakcine (Slika 21A). Kada je reč o polnim razlikama, indeks proliferacije B220+ ćelija u kulturama splenocita mladih i starih BALB/c miševa bio je veći (kod mladih p<0,05 za antigene H1N1 i B virusa, a p<0,01 za antigene H3N2 virusa; kod starih p<0,05 za antigene virusa gripa A tipa i p<0,01 za antigene B virusa) kod ženki u poređenju sa mužjacima iste starosti pri restimulaciji antigenima svakog od tri soja virusa iz vakcine (Slika 21A).

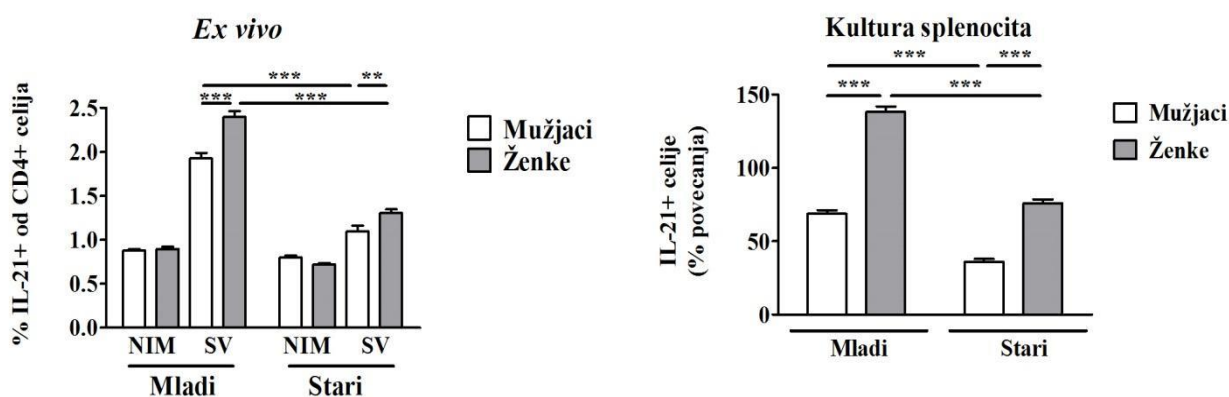
Ispitan je i proliferativni odgovor CD4+ splenocita, mužjaka i ženki mladih i starih BALB/c miševa vakciniranih SV-om, u kulturi nakon restimulacije antigenima virusa gripa koji su ulazili u sastav ove vakcine. Uočen je sličan obrazac razlika u indeksu proliferacije CD4+ ćelija kao kod proliferacije B220+ ćelija. Starenjem kod miševa oba pola indeks proliferacije se smanjuje u kulturama splenocita restimuliranih antigenima H1N1 (p<0,05), H3N2 (p<0,001) i B (p<0,01) virusa (Slika 21B). Nakon restimulacije antigenima svih sojeva virusa gripa, proliferativni indeks CD4+ T-ćelija bio je veći (p<0,05) u kulturama splenocita ženki u poređenju sa kulturama splenocita mužjacima miševa iste starosti (Slika 21B).



Slika 21. Proliferativni odgovor splenocita izolovanih iz mladih i starih BALB/c miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* vakcinom (SV) protiv gripa na restimulaciju antigenima H1N1, H3N2 i B virusa iz vakcine u kulturi. Mladi i stari miševi BALB/c soja imunizovani su SV-om sastava: A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A (H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti eksperimentalnih životinja i gajeni 72 sata u kulturi u medijumu (RPMI-1640 sa 10% FCS) sa ili bez (kontrolne kulture) dodatih H1N1, H3N2 i B antigena. Grafici prikazuju povećanje procenata (A) Th (CD4+) i (B) B (B220+) splenocita koji proliferišu (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa izdvojene na osnovu bojenja fluorescentnom bojom 7-AAD metodom protočne citofluorometrije, kako je prikazano na Slici 14. levo) u kulturi stimulisani antigenima H1N1, H3N2 ili B virusa u odnosu na odgovarajuće ćelije koje su kultivisane samo u medijumu, bez stimulatora. Povećanje je predstavljeno kao indeks proliferacije (odnos između procenta proliferišućih ćelija u kulturama sa stimulatorima i učestalosti proliferišućih ćelija u kontrolnim kulturama). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.4. Pol i starost utiču na zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 kod BALB/c miševa imunizovanih SV-om

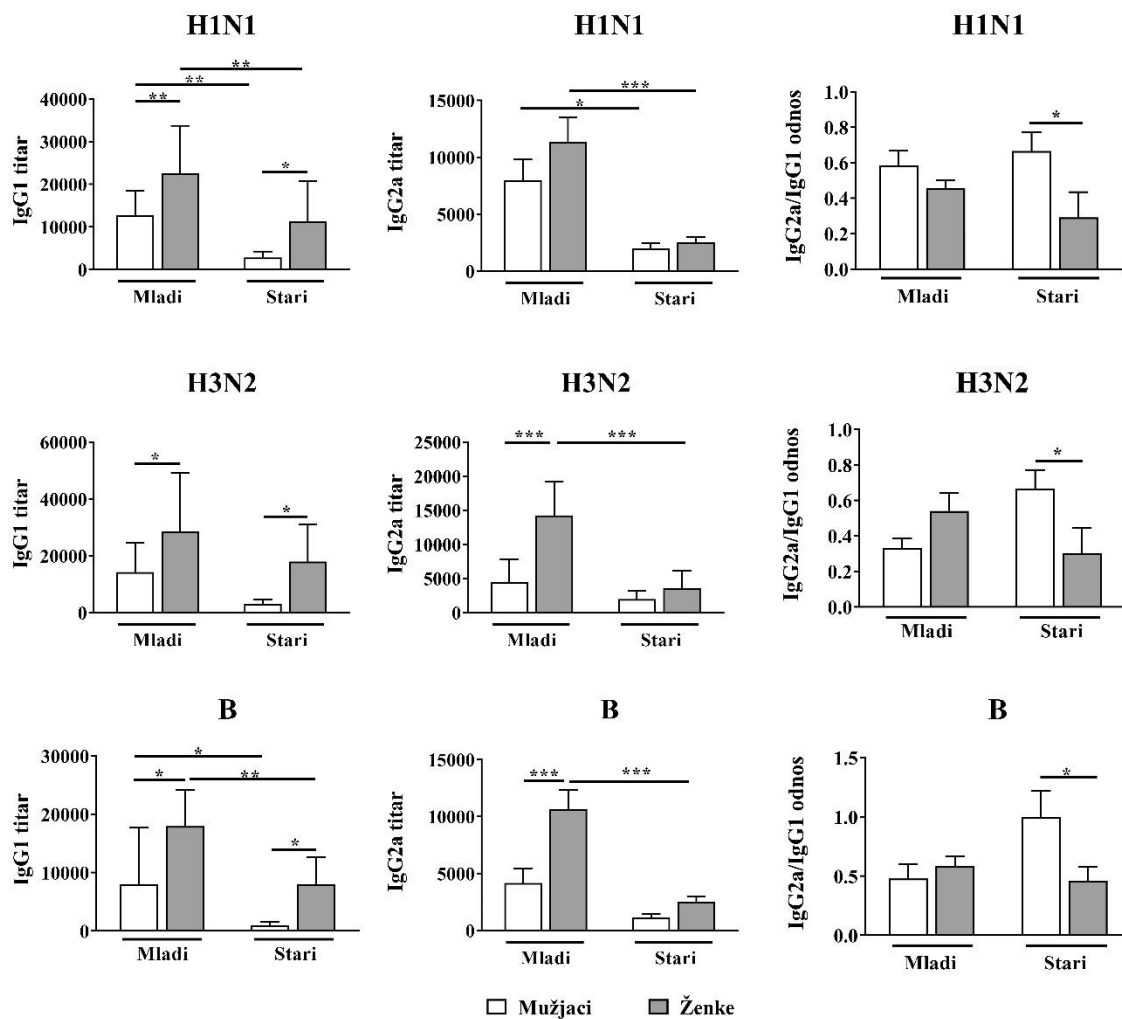
Utvrđeno je prisutvo IL-21+ ćelija u subpopulaciji sveže izolovanih CD4+ splenocita (*ex vivo*), kao i u kulturi splenocita nakon 72 sata restimulacije antigenima svih sojeva virusa sadržanim u vakcini. Bez obzira na uzrast procentualna zastupljenost IL-21+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ splenocita je bila veća ($p < 0,001$) kod ženki u poređenju sa mužjacima (Slika 22). Kod starih BALB/c miševa procentualna zastupljenost ovih ćelija je bila značajno manja ($p < 0,001$) u poređenju sa mladim miševima ovog soja (Slika 22). Da bi se utvrdila zastupljenost IL-21+CD4+ ćelija specifičnih za vakcinalne antigene, splenociti miševa imunizovanih SV-om su u kulturi 72 sata restimulisani antigenima virusa gripa iz vakcine. Rezultati su pratili trend kao i kod sveže izolovanih splenocita. Naime, indeks stimulacije (procentualno povećanje zastupljenosti IL-21+ ćelija u subpopulaciji CD4+ splenocita nakon restimulacije u odnosu na kulture samo sa medijumom) bio je veći ($p < 0,001$ kod mladih; $p < 0,01$ kod starih) u kulturama splenocita izolovanih iz ženki u poređenju sa kulturama ovih ćelija izolovanih iz mužjaka miševa oba uzrasta. Takođe, veći ($p < 0,001$) procenat povećanja ovog indeksa je registrovan u kulturama ovih ćelija izolovanih iz mladih u poređenju sa kulturama ovih ćelija izolovanih iz starih miševa istog pola (Slika 22).



Slika 22. Starenje i pol BALB/c miševa imunizovanih sezonskom *split* inaktivisanom trovalentnom vakcinom (SV) utiču na procentualnu zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21. Mladi i stari miševi BALB/c soja oba pola imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09, A/Texas/361/2011(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti i korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela metodom protočne fluorocitometrije određena je zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-21. Strategija selektovanja IL-21+ ćelija u svežim suspenzijama splenocita i u suspenzijama splenocita iz kulture prikazana je na Slici 15. Grafici prikazuju učestalost IL21+ ćelija u okviru CD4+ splenocita sveže izolovanih (*ex vivo*) iz neimunizovanih (NIM) i imunizovanih (SV) miševa. Prikazan je i porast procentualne zastupljenosti IL21+ ćelija u subpopulacije CD4+ ćelija u kulturi splenocita stimulisanih antigenima sadržanim u vakcini u odnosu na splenocite koji su kultivisani samo u medijumu, a koji su takođe izolovani iz miševa imunizovanih SV-om (tzv. indeks stimulacije). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.5. Pol i uzrast utiču na profil IgG1 i IgG2a potklasa antitela specifičnih za virus gripa u serumu BALB/c miševa imunizovanih SV-om

Analiza potklasa IgG je pokazala da je titar IgG1 antitela specifičnih za antigene H1N1 ($p < 0,01$ za mlade i $p < 0,05$ za stare), H3N2 ($p < 0,05$) i B ($p < 0,05$ za oba uzrasta) virusa veći u serumima ženki u poređenju sa mužjacima BALB/c miševa odgovarajuće starosti (Slika 23). Titar IgG1 antitela se smanjivao starenjem u serumima mužjaka i ženki miševa ovog soja, ali su ove razlike kod miševa oba pola dostigle statističku značajnost samo za antigene H1N1 ($p < 0,01$) i B ($p < 0,05$) virusa (Slika 23). Titar IgG2a potklase antitela specifičnih za H3N2 i B soj virusa gripa bio je veći ($p < 0,001$) kod mladih ženki u poređenju sa mladim mužjacima, dok se titar IgG2a antitela specifičnih za H1N1 tip virusa nije statistički značajno razlikovao kod mladih životinja oba pola (Slika 23). Starenjem se titar IgG2a antitela specifičnih za antigene svakog od tri soja virusa iz vakcine smanjivao ($p < 0,001$) kod ženki, dok se kod mužjaka starenjem smanjivao ($p < 0,05$) samo titar IgG2a –antitela specifičnih za antigene H1N1 virusa (Slika 23). U serumu starih miševa nije bilo polne razlike u titru IgG2a antitela specifičnih za bilo koji od tri soja virusa u vakcini (Slika 23). Analiza odnosa (količnika titra) ove dve potklase antitela je pokazala da je, za razliku od mladih miševa kod kojih nije bilo polnih razlika u odnosu IgG2a/IgG1 antitela specifičnih za antigene bilo kojeg od tri soja virusa u vakcini, kod starih miševa ovog soja postojala razlika (Slika 23). Ženke su imale niže vrednosti ($p < 0,05$) ovog parametra, odnosno kod njih je bila dominantnija sinteza IgG1 antitela u poređenju sa mužjacima (Slika 23).

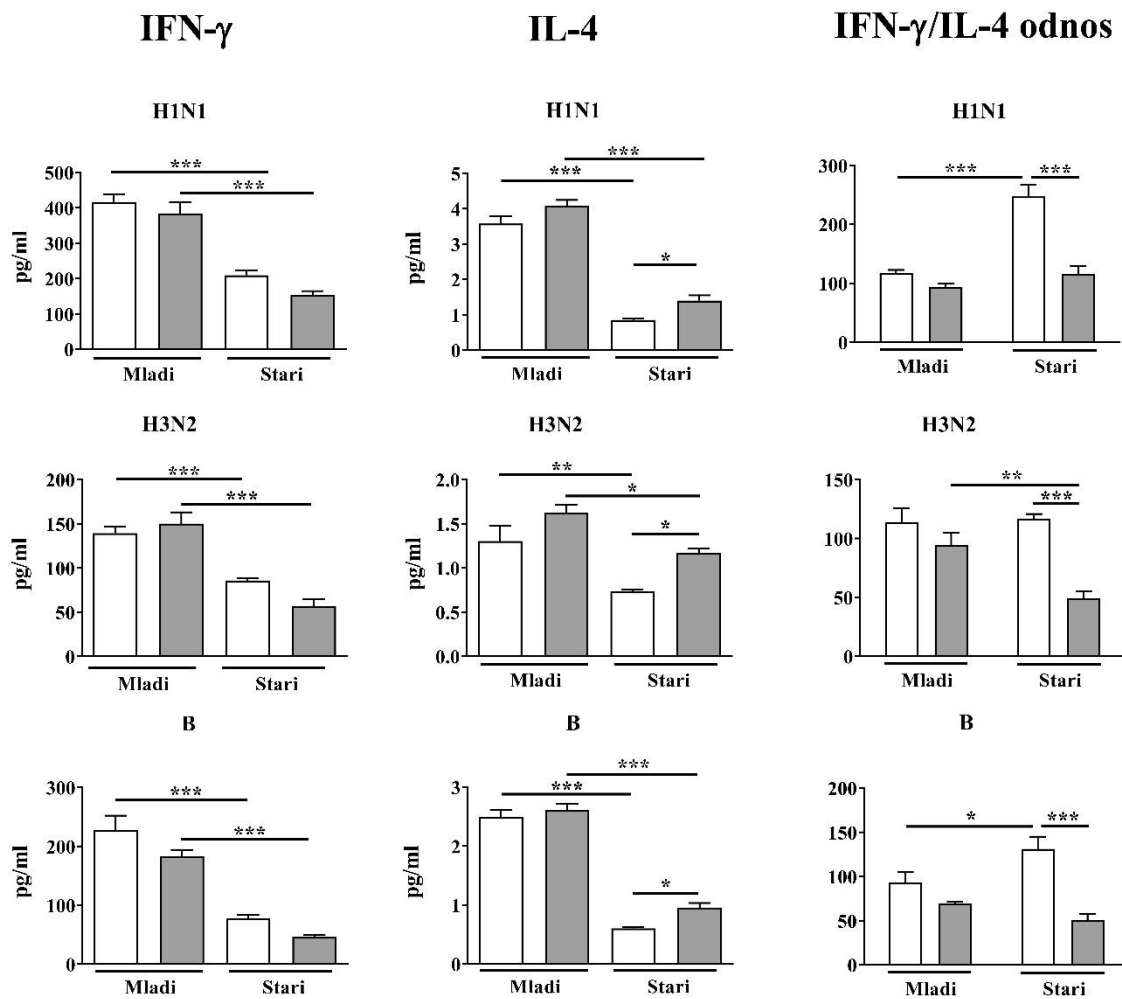


Slika 23. Titar IgG1 i IgG2a potklasa H1N1, H3N2 i B virus-specifičnih antitela i njihov odnos u serumu mladih i starih BALB/c miševa oba pola imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Mužjaci i ženke, mladih i starih miševa BALB/c soja imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumima miševa određivan je titar IgG1 i IgG2a antitela specifičnih za antigene iz vakcine ELISA testom i izračunat je odnos IgG2a/IgG1 potklasa antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B virus gripa. Rezultati titrova antitela su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI, a odnosa potklasa antitela kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.4.1.6. Starenje dovodi do nastanka polnih razlika u sintezi IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita izolovanih iz BALB/c miševa imunizovanih SV-om

Kao što je ranije navedeno (poglavlje 4.3.6), nisu pokazane polne razlike u sintezi IFN- γ i IL-4 citokina u kulturi splenocita mladih miševa kao odgovor na *in vitro* restimulaciju antigenima iz vakcine (Slika 24). Splenociti starih miševa nakon restimulacije antigenima virusa iz SV vakcine su sintetisali manje količine citokina u odgovoru na restimulaciju antigenima H1N1 (p<0,001), H3N2 (p<0,001 za IFN- γ ; p<0,01 kod mužjaka i p<0,05 kod ženki za IL-4) i B (p<0,001) virusa u poređenju sa splenocitima mladih miševa odgovarajućeg pola (Slika 24). Dodatno, u kulturama splenocita starih ženki miševa uočena je veća (p<0,05) sinteza IL-4 citokina u poređenju sa

kulturama splenocita starih mužjaka miševa restimuliranih antigenima bilo kog soja virusa iz vakcine (Slika 24). S druge strane, u kulturama starih miševa ovog soja sinteza IFN- γ nije se značajno razlikovala u zavisnosti od pola (Slika 24). Posledično, u kulturama splenocita starih ženki BALB/c miševa, u prisutvu antigena bilo kog od tri soja virusa iz vakcine, odnos IFN- γ /IL-4 citokina je bio pomećen ($p < 0,001$) na stranu IL-4 u poređenju sa kulturama splenocita starih mužjaka ovog soja (Slika 24).

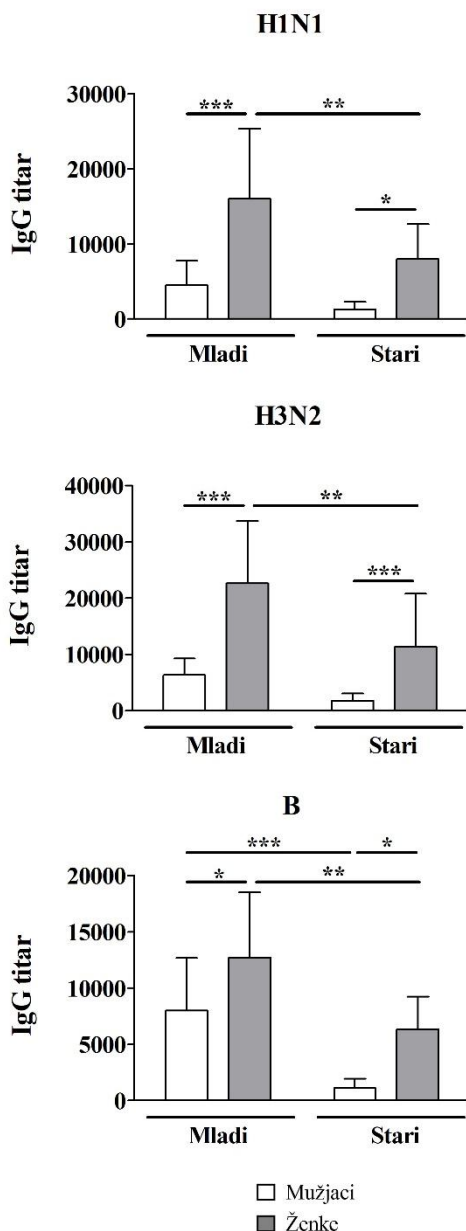


Slika 24. Sinteza citokina IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita BALB/c miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa restimuliranih antigenima virusa koji ulaze u sastav vakcine menja se starenjem. Grafici predstavljaju koncentraciju citokina IL-4 i IFN- γ i njihov odnos IFN- γ /IL-4 u supernatantima kultura splenocita mladih i starih mužjaka i ženki miševa BALB/c soja izolovanih dve nedelje nakon imunizacije SV-om koja sadrži A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus, a restimuliranih tokom 72 sata antigenima virusa H1N1, H3N2 ili B soja. Koncentracije su određene ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod C57BL/6 miševa

4.4.2.1. Pol i starost miševa imunizovanih SV-om utiču na titar i aviditet IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u vakcini u serumu

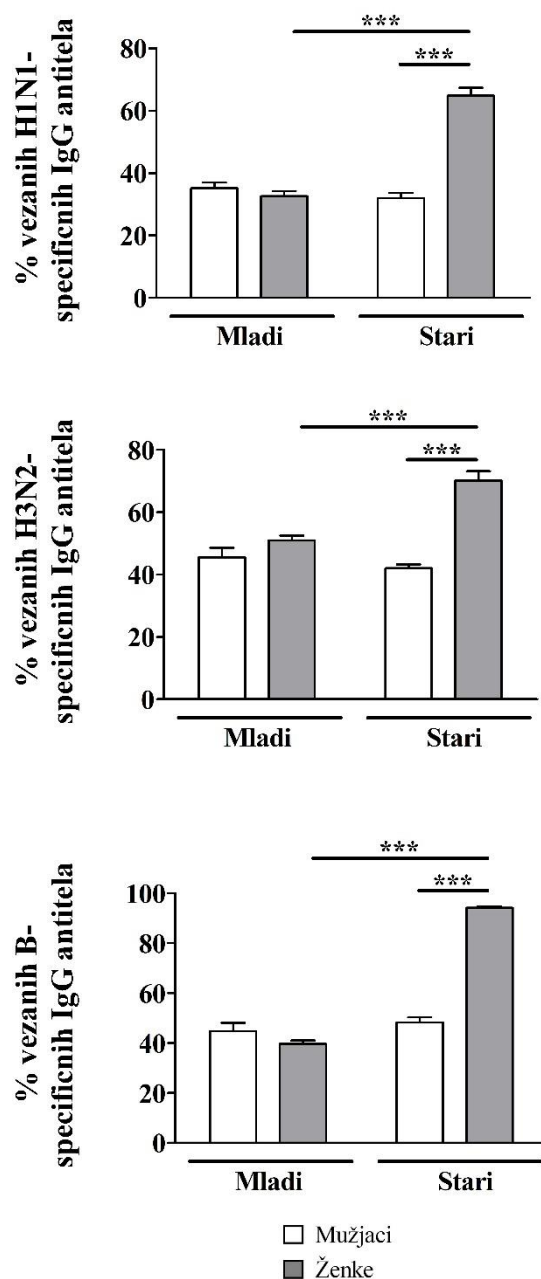
Kao i kod BALB/c miševa titar IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B soj virusa koji su ulazili u sastav SV određen je četiri nedelje nakon imunizacije i kod mladih i starih miševa C57BL/6 soja, oba pola. Rezultati su pokazali da je u serumu i mladih ($p < 0,001$ za H1N1; $p < 0,001$ za H3N2; $p < 0,05$ za B) i starih ($p < 0,05$ za H1N1 i B; $p < 0,001$ za H3N2) ženki miševa C57BL/6 soja titar specifičnih IgG antitela veći nego u serumu mužjaka odgovarajućeg uzrasta ovog soja (Slika 25). Utvrđeno je i da se starenjem smanjuje titar specifičnih IgG antitela u serumu SV-om imunizovanih miševa C57BL/6 soja (Slika 25). Kod ženki ovih miševa je razlika između IgG titra kod mladih i starih životinja dostigla statističku značajnost ($p < 0,01$) za sva tri soja virusa koji su bili sadržani u vakcini, dok je statistička značajnost ($p < 0,001$) kod mužjaka pokazana samo za titar IgG antitela specifičnih za antigene B soja virusa (Slika 25).



Slika 25. Titar IgG antitela specifičnih za antigene virusa gripa iz vakcine u serumu C57BL/6 miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa zavisi od pola i starosti miševa. Mladi i stari miševi C57BL/6 soja oba pola su imunizovani SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije uzeti su uzorci krvi i u serumima je određen titar IgG antitela specifičnih za antigene H1N1, H3N2 i B sojeve virusa iz vakcine, ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI). N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Kao i kod ženki miševa BALB/c soja, kod ženki C57BL/6 soja došlo je do porasta ($p < 0,001$) aviditeta IgG antitela specifičnih za antigene sva tri soja virusa gripa koji su bili uključeni u SV kod starih u poređenju sa mladim životinjama, dok kod mužjaka nije bilo razlike u aviditetu IgG antitela između mladih i starih životinja (Slika 26). Ovaj porast aviditeta IgG antitela kod starih ženki ukazao je na postojanje razlike između starih mužjaka i ženki ($p < 0,001$) koja nije uočena kod mladih (Slika 26).

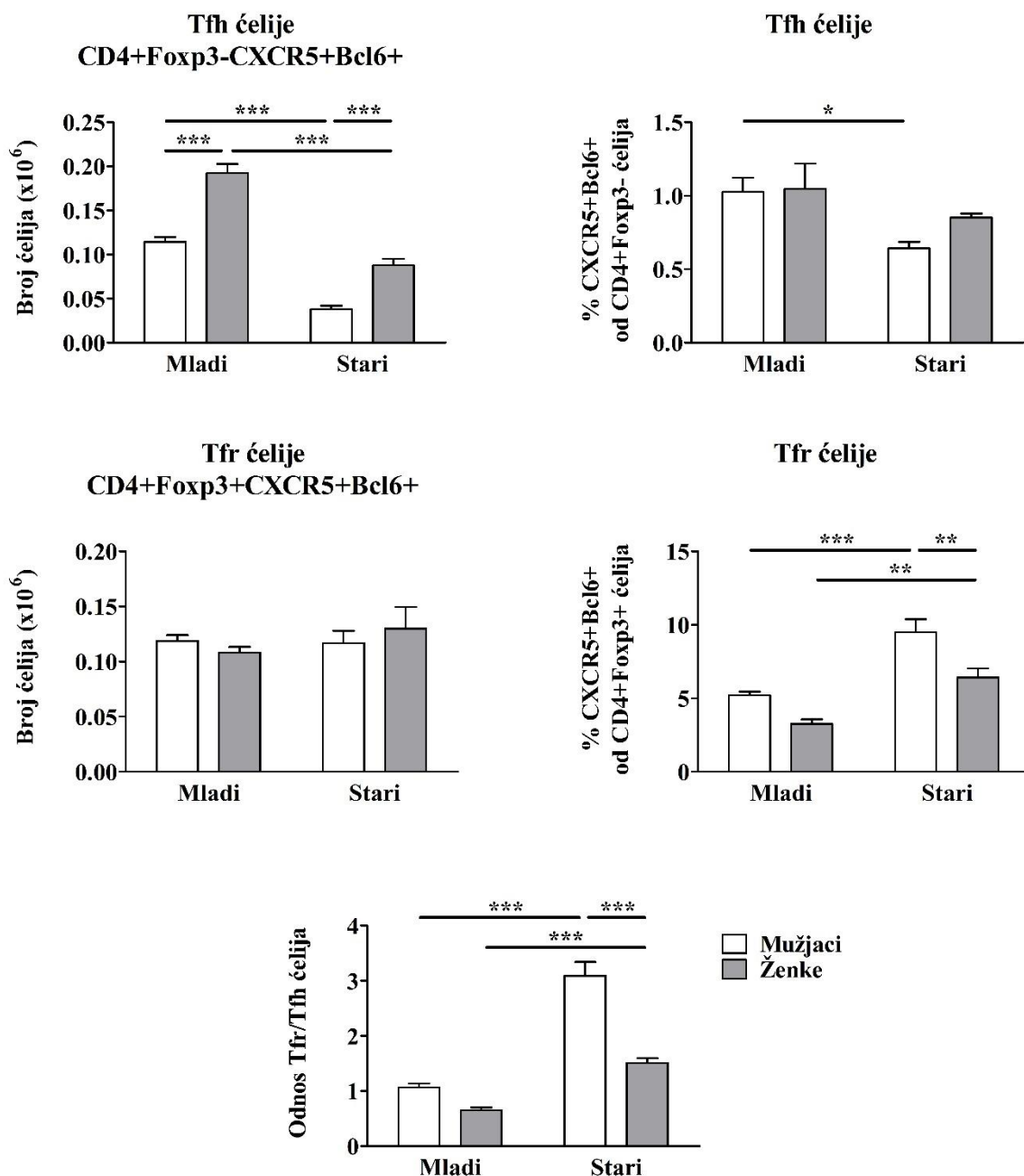
IgG aviditet



Slika 26. Starenje kod miševa C57BL/6 soja imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa utiče na aviditet IgG antitela specifičnih za antigene sojeva virusa koji ulaze u sastav vakcine na polno-zavisan način. Mladi i stari miševi C57BL/6 soja imunizovani su SV-om sledećeg sastava: A/California/7/2009(H1N1)pdm09 (H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumima miševa, modifikovanim ELISA testom, utvrđen je aviditet IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B soj virusa iz vakcine. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. ***p < 0,001.

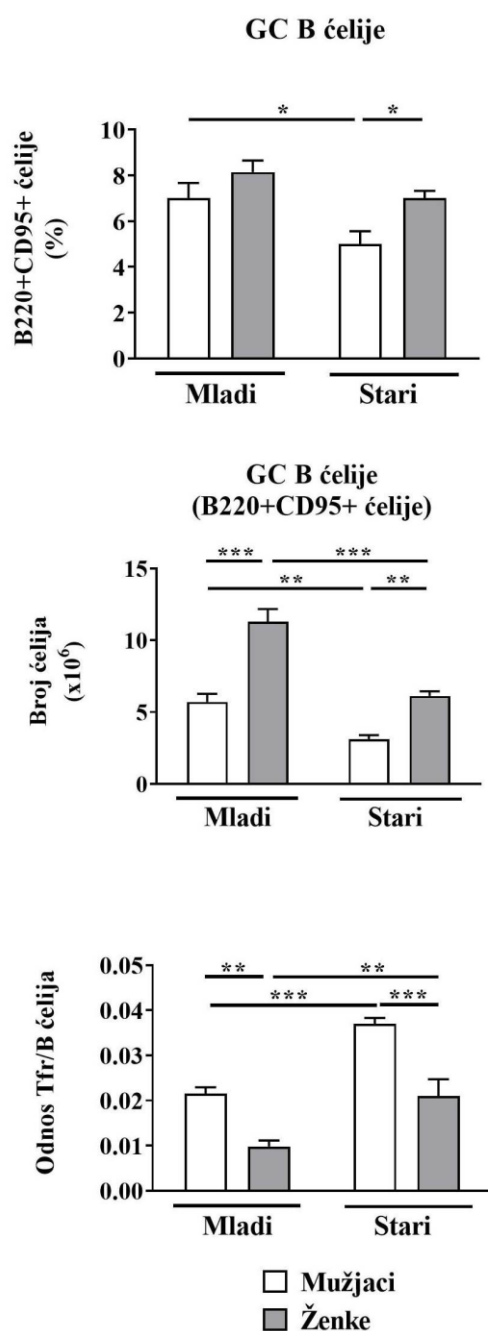
4.4.2.2. Pol i uzrast utiču na zastupljenost Tfr, Tfh i GC B-ćelija u slezini C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om

Pokazano je da nema polnih razlika u procentualnoj zastupljenosti Tfh ćelija ni kod mladih ni kod starih miševa. Razlike nije bilo ni između mladih i starih ženki, dok je zastupljenost Tfh ćelija bila manja kod starih u poređenju sa mladim mužjacima ($p < 0,05$) (Slika 27). Apsolutni broj Tfh ćelija bio značajno manji kod starih u poređenju sa mladima ($p < 0,001$) oba pola, dok su se polne razlike uočene kod mladih, zadržale i kod starih životinja u vidu značajno većeg broja Tfh ćelija kod ženki ($p < 0,001$) (Slika 27). Ustanovljena je veća zastupljenost Tfr kod starih u poređenju sa mladim miševima odgovarajućeg pola ($p < 0,01$ za ženke; $p < 0,001$ za mužjake), kao i veća zastupljenost Tfr ćelija kod starih mužjaka u poređenju sa ženkama iste starosti ($p < 0,01$) (Slika 27). Apsolutni broj Tfr ćelija nije se razlikovao između mladih i starih, a nisu uočene ni polne razlike u ovom parametru (Slika 27). Odnos Tfr/Tfh ćelija je, usled smanjenja broja Tfh ćelija tokom starenja, bio pomeren ka Tfr ćelijama ($p < 0,001$) kod starih u odnosu na mlade. Takođe je kod mužjaka pokazano da je odnos Tfr/Tfh ćelija pomeren ka Tfr ćelijama što je kod starih miševa dovelo i do statistički značajne polne razlike ($p < 0,001$) (Slika 27).



Slika 27. Starenje utiče na pomeranje odnosa Tfr/Tfh ćelija na polno-specifičan način. Mladi i stari miševi C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti, urađeno je imunofluorescentno bojenje i analiza na protočnom citofluorometru. Na graficima je prikazana učestalost CXCR5+Bcl6+ ćelija u okviru CD4+Foxp3- i CD4+Foxp3+ splenocita, kao i broj CD4+Bcl6+CXCR5+ Foxp3- (Tfh) i CD4+Bcl6+CXCR5+Foxp3+ (Tfr) ćelija u slezini. Prikazan je i odnos Tfr/Tfhćelija u slezinama mladih i starih C57BL/6 miševa muškog i ženskog pola. Strategija izdvajanja Tfh i Tfr ćelija je prikazana na Slici 12A. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± SEM. N=6 miševa po grupi. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Zastupljenost GC B-ćelija bila je veća kod starih ženki u poređenju sa starim mužjacima C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om ($p < 0,05$). Statistički značajno smanjenje zastupljenosti GC B-ćelija pokazano je i između mladih i starih mužjaka ($p < 0,05$), dok kod ženki nije bilo razlike između ove dve starosne grupe (Slika 28). Kod mladih i starih miševa utvrđeno je da je broj GC B-ćelija veći kod ženki u poređenju sa mužjacima ($p < 0,05$ kod mladih; $p < 0,01$ kod starih). Kod starih miševa oba pola je došlo do značajnog pada broja GC B-ćelija u odnosu na mlade ($p < 0,001$ kod ženki; $p < 0,01$ kod mužjaka). Odnos Tfr/B ćelija kod mužjaka je veći u poređenju sa ženkama ($p < 0,05$), kao posledica značajno manjeg broja B-ćelija kod ovog pola (Slika 28).

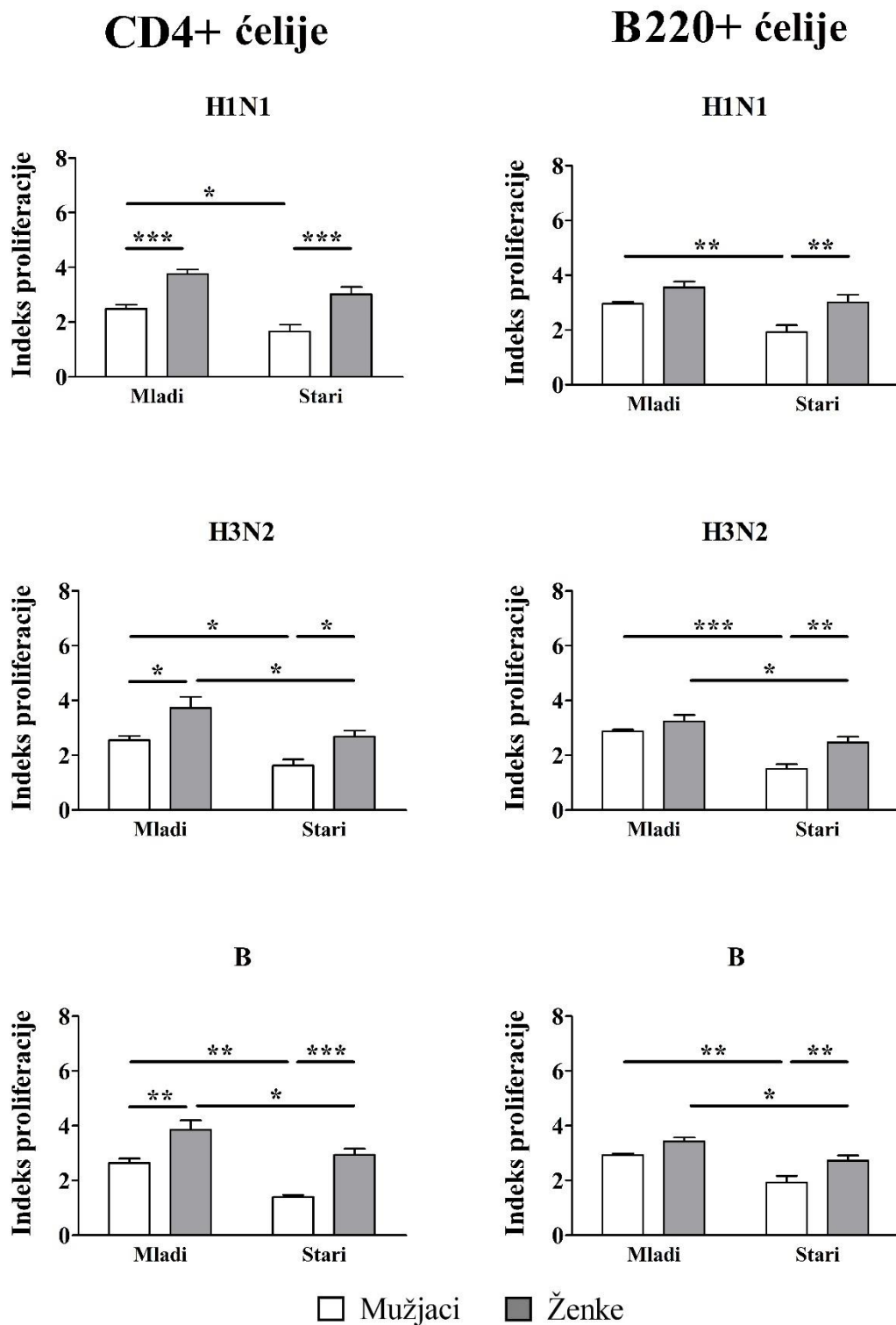


Slika 28. Pol i starost utiču na apsolutni broj i zastupljenost GC B-ćelija u slezinama kod mladih i starih C57BL/6 miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Mladi i stari miševi C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je sadržala:

A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovana je slezina i ćelije su imunofluorescentno obojene za detekciju markera GC B-ćelija i analizu na protočnom citofluorometru. Na graficima je prikazana učestalost i apsolutni broj B220+CD95+ splenocita u slezinama mladih i starih C57BL/6 miševa muškog i ženskog pola različitog uzrasta. Strategija selektovanja GC B-ćelija je prikazana na Slici 12B. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2.3. Pol i starost utiču na proliferativni odgovor B220+ i CD4+ splenocita izolovanih iz C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om na restimulaciju antigenima sojeva virusa iz vakcine u kulturi

U kulturama splenocita C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om određena je proliferacija B220+ i CD4+ ćelija nakon *in vitro* restimulacije H1N1, H3N2 i B antigenima iz vakcine. Za određivanje bazalnog proliferativnog odgovora korišćene su kulture splenocita imunizovanih miševa u medijumu bez stimulacije antigenima iz vakcine. Rezultat je prikazan kao procenat učestalosti ćelija restimulisanih antigenima iz vakcine koje proliferišu u odnosu na bazalnu proliferaciju (indeks proliferacije). Rezultati su pokazali da je indeks proliferacije B220+ ćelija veći kod ženki u poređenju sa mužjacima, dok je kod starih manji u poređenju sa mladima životinjama. Ove razlike dostigle su statističku značajnost za polne razlike kod starih za sva tri antigena ($p < 0,01$). Statistička značajnost je pokazana i u razlici između indeksa proliferacije B220+ ćelija između mladih i starih mužjaka ($p < 0,01$ za H1N1 i B; $p < 0,001$ za H3N2) i između mladih i starih ženki za H3N2 i B antigen ($p < 0,05$) (Slika 29). Isti trend je detektovan i kada je ispitivan proliferativni odgovor CD4+ ćelija. Indeks proliferacije je bio viši kod ženki u poređenju sa mužjacima, dok je kod starih bio niži u poređenju sa mladima. Polni dimorfizam dosegao je statističku značajnost u razlici u proliferativnom odgovoru CD4+ T-ćelija, u stimulaciji sa sva tri antigena iz vakcine, kod mladih ($p < 0,001$ za H1N1; $p < 0,05$ za H3N2 i B) i kod starih ($p < 0,001$ za H1N1 i B; $p < 0,05$ za H3N2) miševa. Statistička značajnost je pokazana i u razlici između indeksa proliferacije CD4+ T-ćelija između mladih i starih mužjaka ($p < 0,05$ za H1N1 i H3N2; $p < 0,01$ za B), kao i između mladih i starih ženki za H3N2 i B antigen ($p < 0,05$) (Slika 29).

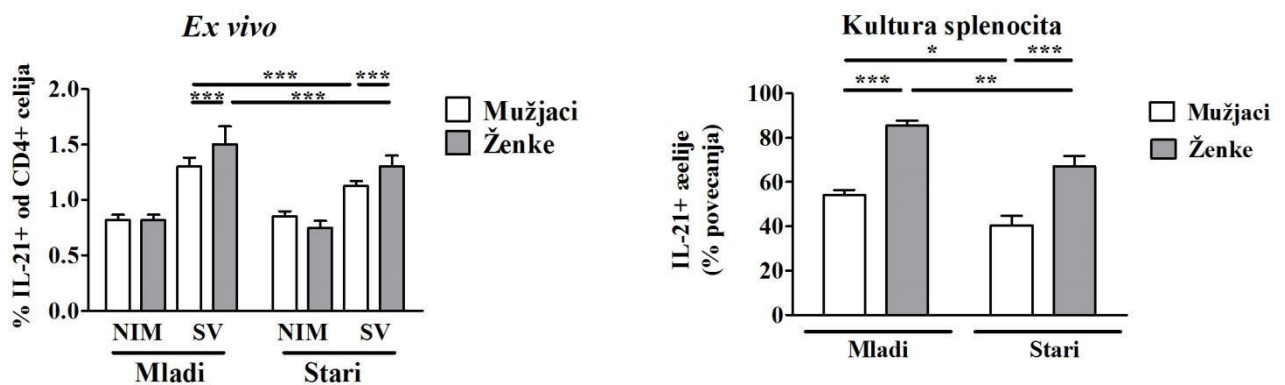


Slika 29. Proliferativni odgovor splenocita izolovanih iz mladih i starih C57BL/6 miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* vakcinom (SV) protiv gripa na restimulaciju antigenima H1N1, H3N2 i B virusa iz vakcine u kulturi. Mladi i stari miševi C57BL/6 soja imunizovani su SV-om sastava: A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A (H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti eksperimentalnih životinja i gajeni 72 sata u kulturi u medijumu sa ili bez (kontrolne

kulture) dodatih H1N1, H3N2 i B antigena. Grafici prikazuju povećanje procenata (A) Th (CD4+) i (B) B (B220+) splenocita koji proliferišu (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa izdvojene na osnovu bojenja sa fluorescentnom bojom 7-AAD metodom protočne citofluorometrije, strategija selektovanja ćelija je prikazana na Slici 14) u kulturi stimulisani antigenima H1N1, H3N2 ili B virusa u odnosu na odgovarajuće ćelije koje su kultivisane samo u medijumu, bez stimulatora. Povećanje je predstavljeno kao indeks proliferacije (odnos između procenta proliferišućih ćelija u kulturama sa stimulatorima i učestalosti proliferišućih ćelija u kontrolnim kulturama). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2.4. Pol i starost utiču na zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 kod C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om

Kod sveže izolovanih splenocita pokazan je veći procenat CD4+ T-ćelija koje proizvode IL-21 citokin i kod mladih i kod starih ženki miševa, u poređenju sa mužjacima odgovarajuće starosti ($p < 0,001$) (Slika 30). Kod starih miševa oba pola, procenat IL-21+ ćelija u populaciji CD4+ splenocita je bio niži u poređenju sa mladim miševima ($p < 0,001$) (Slika 30). Isti trend je zabeležen i kod CD4+ splenocita koji su kultivisani tokom 72 sata u prisustvu H1N1, H3N2 i B antigena koje je sadržavala vakcina. Detektovan je veći ($p < 0,001$) procenat povećanja IL-21+ ćelija u subpopulaciji CD4+ ćelija kod ženki u poređenju sa mužjacima miševa oba uzrasta, kao i manji procenat povećanja IL-21+ ćelija u subpopulaciji CD4+ ćelija kod starih u odnosu na mlade miševe ($p < 0,05$ kod mužjaka i $p < 0,01$ kod ženki) (Slika 30).

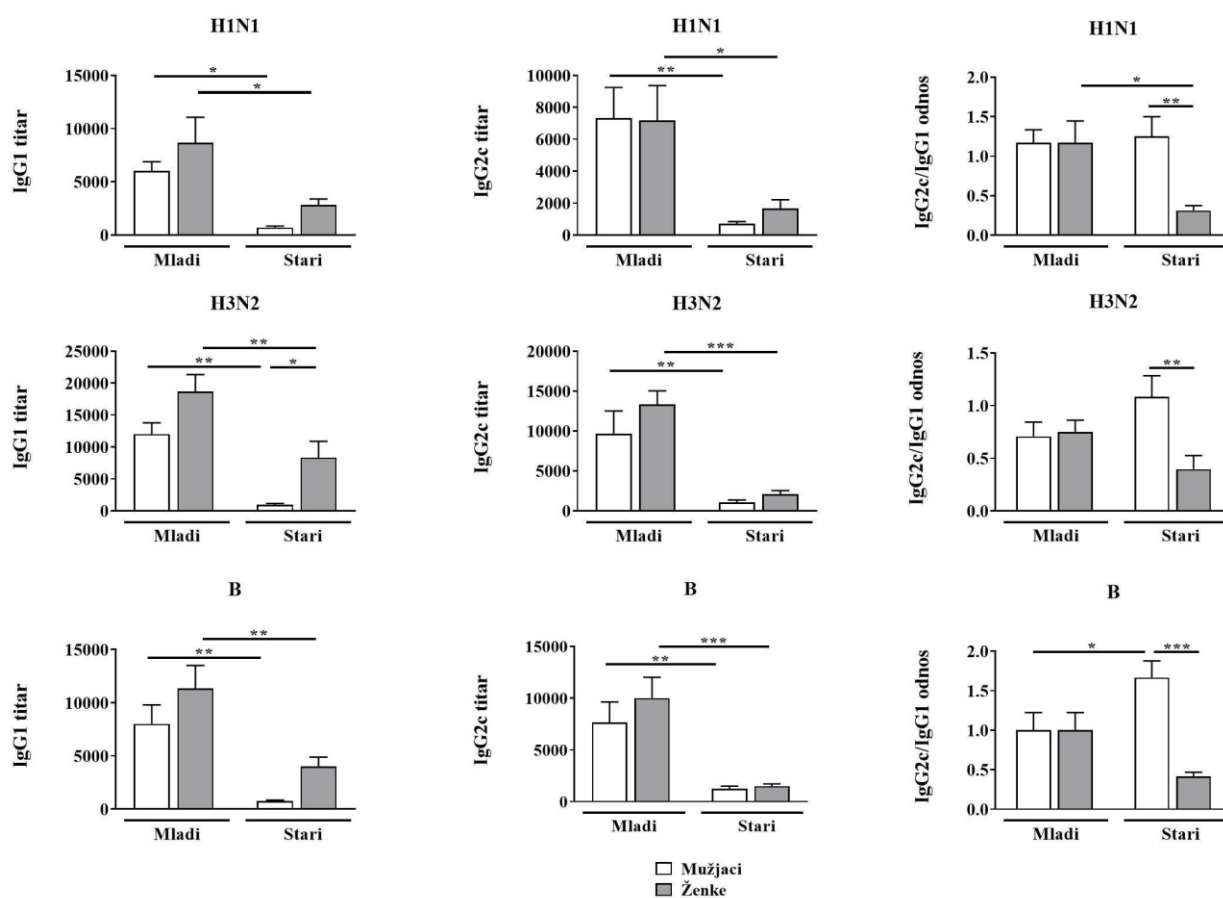


Slika 30. Starenje i pol C57BL/6 miševa imunizovanih sezonskom *split* inaktivisanom trovalentnom vakcinom (SV) utiču na procentalnu zastupljenost CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21. Mladi i stari miševi C57BL/6 oba pola imunizovani su SV-om koja je sadržavala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09, A/Texas/361/2011(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012. Dve nedelje nakon imunizacije izolovani su splenociti i korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela metodom protočne citofluorometrije određivana je zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-21 u okviru subpopulacije CD4+ ćelija. Strategija selektovanja IL-21+ ćelija u suspenzijama sveže izolovanih (*ex vivo*) splenocita i u suspenzijama splenocita iz kulture prikazana je na Slici 15. Grafici prikazuju učestalost IL21+ ćelija u okviru CD4+ splenocita sveže izolovanih (*ex vivo*) iz neimunizovanih (NIM) i imunizovanih (SV) miševa. Prikazan je i porast procentualne zastupljenosti IL21+ ćelija u subpopulaciji CD4+ ćelija u kulturi splenocita stimulisanih antigenima sadržanim u vakcini u odnosu na splenocite koji su kultivisani samo u medijumu, a koji su takođe izolovani iz

miševa imunizovanih SV-om (tzv. indeks stimulacije). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.4.2.5. Pol i uzrast utiču na profil IgG1 i IgG2c potklasa antitela specifičnih za virus gripa u serumu C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om

Utvrđeno je da kod mladih nije bilo polne razlike u odnosu zastupljenosti IgG2c/IgG1 potklasa između mužjaka i ženki, dok je kod starih bilo polne razlike za antitela specifična za sva tri soja virusa u vakcinj (p<0,01 za H1N1 i H3N2; p<0,001 za B) (Slika 31). Ova razlika je posledica značajnog smanjenja titra IgG1 (p<0,05 za H1N1; p<0,01 H3N2; p<0,01 za B) antitela starenjem kod mužjaka miševa, tako da je kod starih ženki titar antitela bio pomećen ka IgG1 tj. Th2 odgovoru u poređenju sa mužjacima.

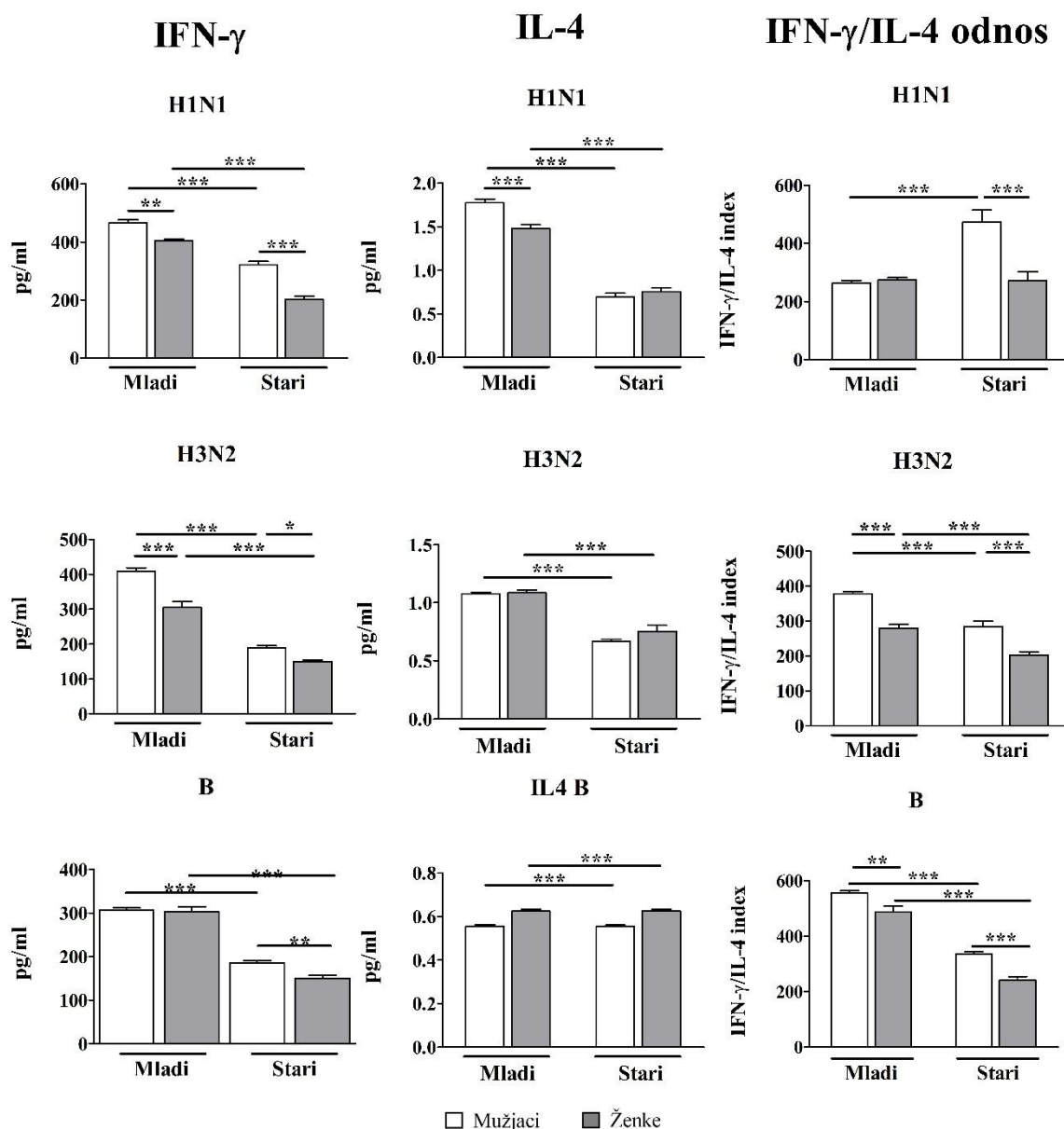


Slika 31. Titar IgG1 i IgG2c potklasa antitela specifični za H1N1, H3N2 i B sojeve virusa iz vakcine protiv gripa i njihov odnos u serumu mladih i starih C57BL/6 miševa oba pola imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Mužjaci i ženke, mladih i starih miševa C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011 (H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumima miševa određen je titar IgG1 i IgG2c antitela specifičnih za antigene specifične za sojeve visura gripa iz vakcine ELISA testom i izračunat je odnos titrova IgG2c/IgG1 potklasa antitela specifičnih za pojedine sojeve virusa gripa.

Titri antitela su predstavljeni kao geometrijska sredina \pm 95% interval poverenja (engl. *confidence interval*, CI), a odnosi potklasa antitela kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2.6. Starenje dovodi do polnih razlika u sintezi IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita izolovanih iz C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om

U kulturama splenocita C57BL/6 miševa restimuliranih *in vitro* antigenima iz vakcine određena je koncentracija citokina IFN- γ i IL-4, i izračunat je njihov odnos. U kulturama splenocita starih miševa detektovana je manja koncentracija i IFN- γ i IL-4 citokina u odnosu na kulture mladih miševa istog pola za sva tri antigena iz vakcine ($p < 0,001$). Polne razlike u vidu veće produkcije od strane ćelija ženki, pokazane su u produkciji IFN- γ u kulturi splenocita mladih C57BL/6 miševa stimuliranih antigenim H1N1 ($p < 0,01$), H3N2 sojem virusa gripa ($p < 0,001$) i u kulturi splenocita starih C57BL/6 miševa stimuliranih antigenima H1N1 ($p < 0,001$), H3N2 ($p < 0,05$) i B ($p < 0,01$) sojevima virusa gripa. Polnih razlika u produkciji IL-4 citokina nije bilo osim u kulturi splenocita mladih miševa stimuliranih antigenima H1N1 soja virusa gripa ($p < 0,001$) (Slika 32). Odnos IFN- γ /IL-4 citokina je bio veći kod mladih mužjaka u poređenju sa ženkama istog uzrasta u kulturama splenocita stimuliranih H3N2 ($p < 0,001$) i B ($p < 0,01$) sojem virusa gripa. Kod starih mužjaka IFN- γ /IL-4 odnos je bio veći ($p < 0,001$) u poređenju sa starim ženkama. Može se zaključiti da je sinteza citokina kod starih mužjaka bila usmerena ka više Th1 tipu odgovora u poređenju sa starim ženkama (Slika 32).

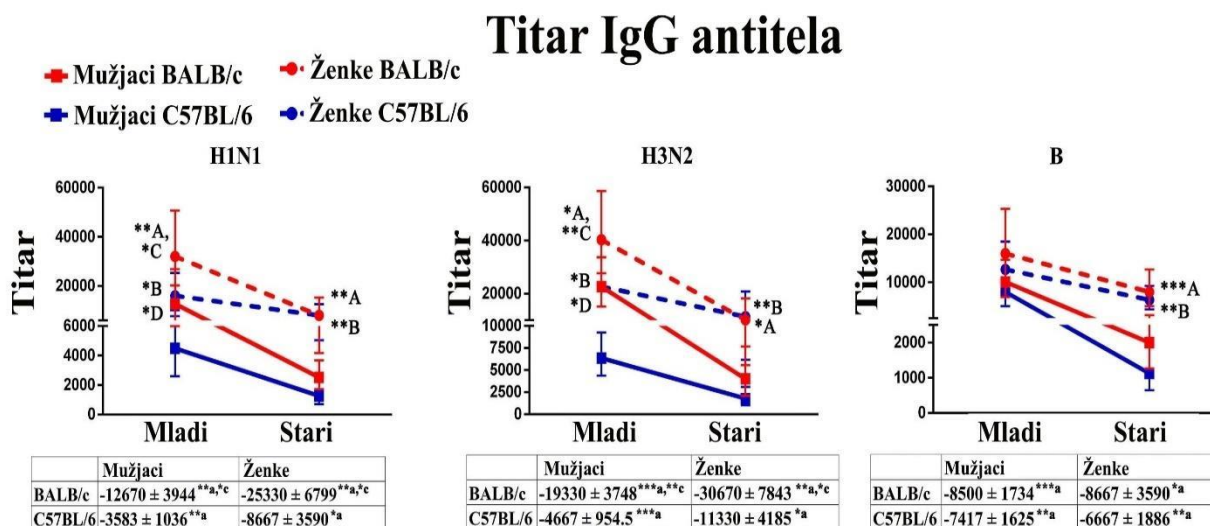


Slika 32. Sinteza citokina IFN- γ i IL-4 u kulturi splenocita C57BL/6 miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa restimuliranih antigenima virusa koji ulaze u sastav vakcine menja se starenjem. Grafici predstavljaju koncentraciju citokina IL-4 i IFN- γ i njihov odnos IFN- γ /IL-4 u supernatantima kultura splenocita mladih i starih mužjaka i ženki miševa C57BL/6 soja izolovanim dve nedelje nakon imunizacije SV-om koja sadrži A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (H1N1); A/Texas/361/2011 (H3N2) A(H3N2) i B/Massachusetts/2/2012 (B) virus, a restimuliranih tokom 72 sata antigenima virusa gripa H1N1, H3N2 ili B soja. Koncentracije su određene ELISA testom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4.3. Usporedni prikaz uticaja starenja na polne i sojne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa BALB/c i C57BL/6 soja

4.4.3.1. Titar IgG antitela specifičnih za viruse sadržane u SV smanjuje se starenjem u serumu miševa imunizovanih ovom vakcinom na sojno-specifičan način, dok se aviditet povećava na polno-specifičan način

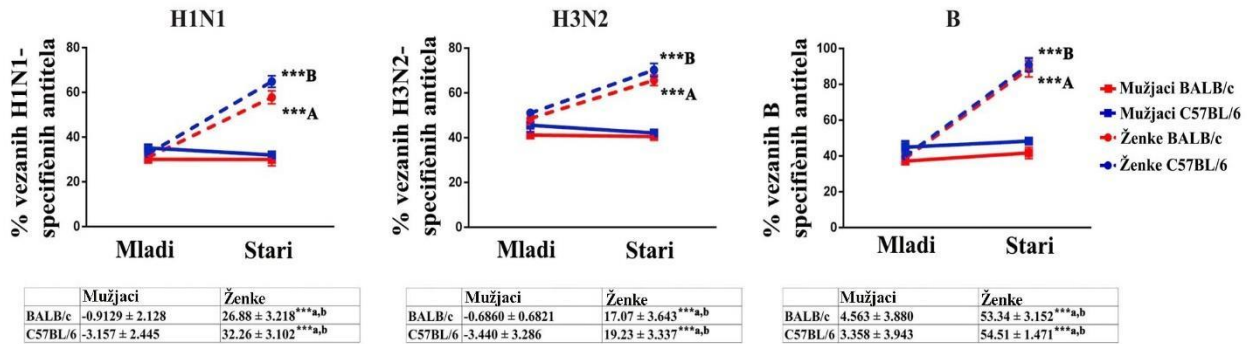
Kod BALB/c miševa detektovano je veće ($p < 0,05$) smanjenje titra IgG antitela specifičnih za H1N1 i H3N2 virus starenjem u poređenju sa C57BL/6 miševima (Slika 33). Titar IgG antitela specifičnih za sva tri soja virusa koja su ulazila u sastav vakcine, se smanjivao starenjem na sojno-specifičan način. Ovo je rezultiralo time da sojne razlike detektovane kod mladih (veći IgG titar antitela specifičnih za H1N1 i H3N2 soj virusa kod BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima) nisu bile prisutne kod starih miševa (Slika 33). Polne razlike u titru su se održale kod starih miševa oba soja, tj. ženke su imale veći titar IgG antitela specifičnih za sva tri antigena iz vakcine u poređenju sa starim mužjacima, kao što je već prikazano (poglavljja 4.4.1.1. i 4.4.2.1. (Slika 33)).



Slika 33 Starenje utiče na sojne, ali ne i na polne razlike u titru IgG antitela specifičnih za antigene virusa sadržanih u sezonskoj trovalentnoj *split* inaktivisanoj vakcini (SV) protiv gripa u serumu. Mladi i stari miševi BALB/c i C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je u svom sastavu imala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011(H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Titar antigen-specifičnih IgG antitela određen je u serumu miševa ELISA testom četiri nedelje nakon imunizacije. Grafici prikazuju geometrijsku sredinu titra ± 95% CI. N = 6 miševa po grupi. Nagib linije koji prikazuje smanjenje produkcije IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B virus tokom starenja prikazan je u tabeli ispod grafika. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^AMušjaci vs ženke BALB/c soj, ^BMušjaci vs ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mužjaci, ^aznačajan nagib linearne regresije, ^cznačajna razlika u linearnoj regresiji između BALB/c i C57BL/6 miševa.

Starenje je dovelo do porasta aviditeta virus-specifičnih IgG antitela kod ženki, što je rezultiralo polnim razlikama kod starih (Slika 34). Ovaj nalaz nije bio sojno-specifičan (Slika 34).

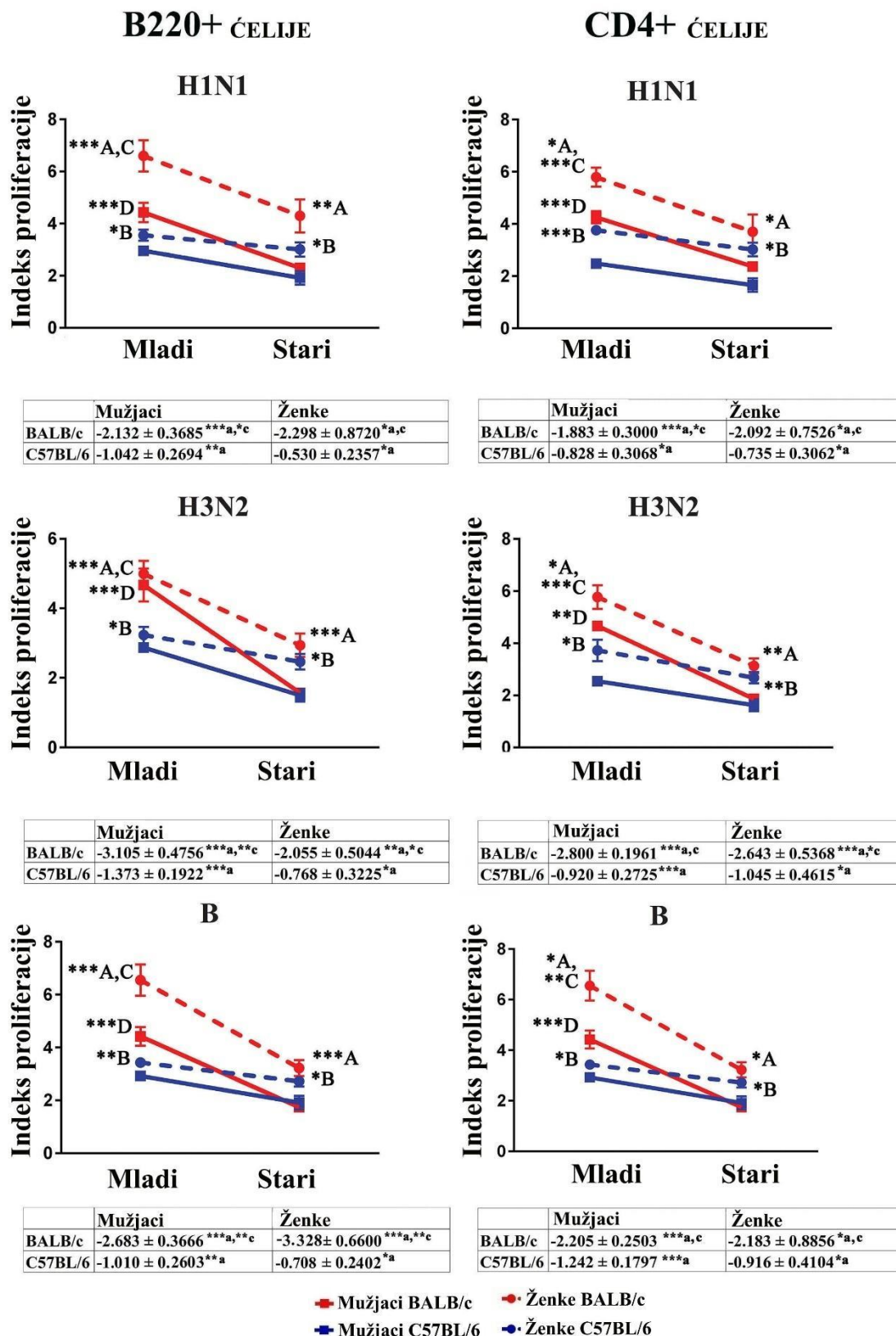
Aviditet IgG



Slika 34. Povećanje aviditeta IgG antitela specifičnih za virus gripa sadržane u sezonskoj trovalentnoj *split* inaktivisanoj vakcini (SV) protiv gripa kod ženki miševa BALB/c i C57BL/6 soja tokom starenja. Mladi i stari miševi BALB/c i C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je u svom sastavu imala A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011(H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Aviditet H1N1, H3N2 i B virus-specifičnih IgG antitela određen je u serumima četiri nedelje nakon imunizacije, modifikovanim ELISA testom. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SEM. *** $p < 0,001$. Nagib linije koji prikazuje promene u aviditetu IgG antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B virus tokom starenja prikazan je u tabeli ispod grafika. ^AMušjaci vs Ženke BALB/c soj, ^BMušjaci vs Ženke C57BL/6 soj, ^aznačajan nagib, ^bznačajna razlika u nagibu između mušjaka i ženki miševa u okviru istog soja. N=6 miševa po grupi. *** $p < 0.001$.

4.4.3.2. Starenje utiče na smanjenje proliferativnog odgovora B220+ i CD4+ splenocita na restimulaciju u kulturi antigenima virusa sadržanim u SV-i

Starenje je uticalo na smanjenje proliferativnog odgovora B220+ i CD4+ splenocita u kulturi miševa oba soja na restimulaciju antigenima virusa sadržanim u SV, s tim što je u kulturama splenocita BALB/c miševa detektovan veći pad indeksa proliferacije u odnosu na kulture splenocita C57BL/6 miševa (Slika 35). Ovo je dovelo do toga da sojne razlike uočene kod mladih miševa (veći indeks proliferacije u kulturama splenocita BALB/c miševa u poređenju sa kulturama splenocita C57BL/6 miševa) nisu bile detektovane kod starih miševa (Slika 35). Polne razlike su se održale u kulturama splenocita starih miševa oba soja, tj. u kulturama splenocita izolovanim iz ženki oba uzrasta indeks proliferacije CD4+ i B220+ ćelija specifičnih za antigene iz vakcine je bio veći u poređenju sa kulturama ovih ćelija izolovanim iz mušjaka odgovarajućeg uzrasta.

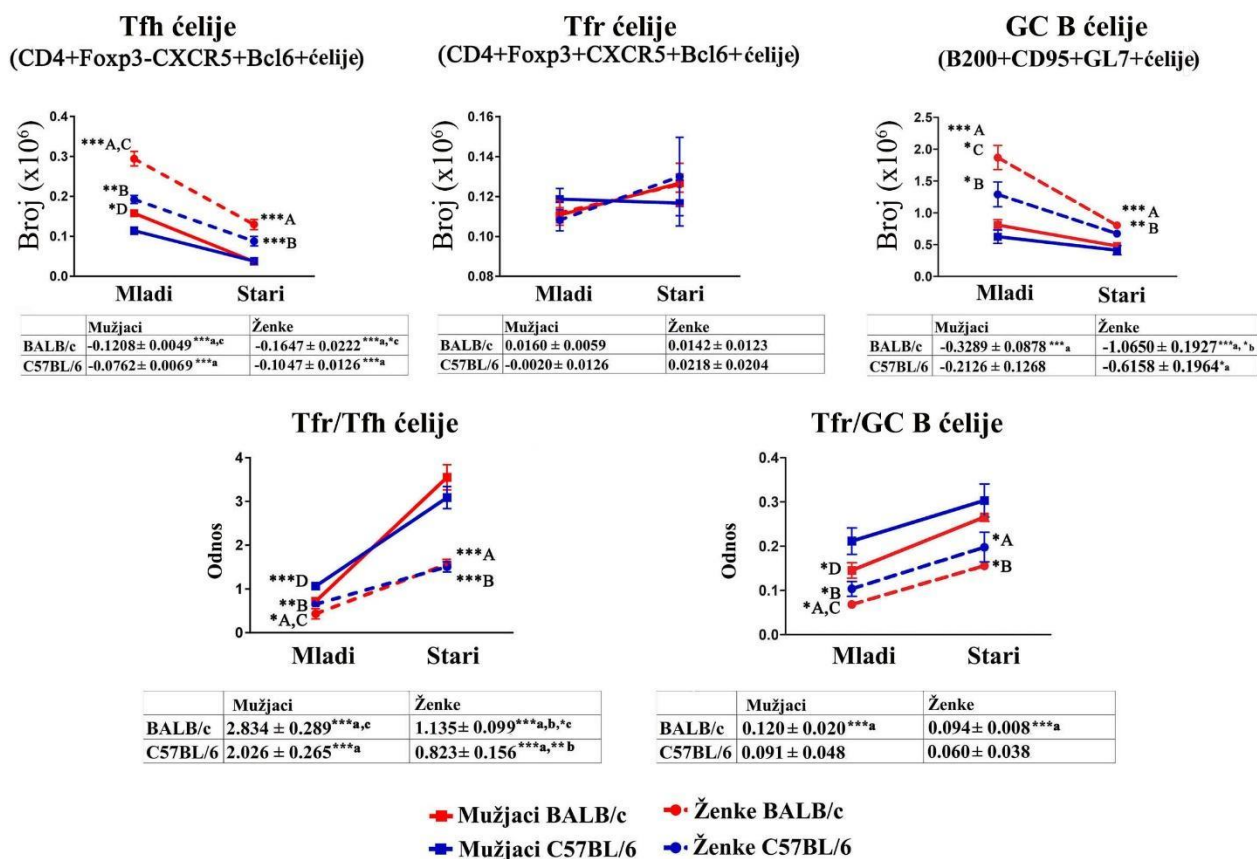


Slika 35. Proliferativni odgovor CD4+ i B220+ splenocita izolovanih iz miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa na restimulaciju u kulturi antigenima iz ove vakcine smanjuje se starenjem na sojno-specifičan način. Ispitana je proliferacija CD4+ i B220+ splenocita mladih i starih miševa C57BL/6 i BALB/c soja oba pola dve nedelje nakon imunizacije SV-om koja je u svom sastavu imala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1)

virus, A/Texas/361/2011(H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus, nakon 72 sata restimulacije antigenima sadržanim u vakcini. Rezultati su prikazani kao indeks proliferacije, tj. kao procenat povećanja proliferacije CD4⁺ i B220⁺ ćelija u kulturi splenocita nakon restimulacije vakcinalnim antigenima u odnosu na bazalnu proliferaciju (proliferacija odgovarajućih ćelija kultivisanih samo u medijumu), a korišćenjem fluorescentnog bojenja i protočne citofluorometrije kao što je pokazano na Slici 14). Linijski dijagrami prikazuju srednju vrednost indeksa proliferacije \pm SEM. N = 6 miševa po grupi. Nagib linije koji prikazuje promenu indeksa proliferacije tokom starenja prikazan je u tabeli ispod grafika. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. ^AMužjaci vs ženke BALB/c soj, ^BMužjaci vs ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mužjaci, ^aznačajan nagib, ^cznačajna razlika u nagibu između BALB/c i C57BL/6 miševa.

4.4.3.3. Starenje utiče na zastupljenost Tfr, Tfh i GC B-ćelija u slezini miševa imunizovanih SV-om na sojno-specifičan način

Apsolutni broj Tfh i GC B splenocita se smanjivao starenjem na sojno-specifičan način, tako što je značajnije smanjenje) zabeleženo kod BALB/c nego kod C67BL/6 miševa (Slika 36). Zbog toga sojna razlika u broju ovih ćelija, koja je zabeležena kod mladih miševa oba pola, nije detektovana kod starih miševa (Slika 36). Polne razlike, koje su se ogledale u većem broju Tfh splenocita kod ženki, zadržale su se i kod starih miševa oba soja (Slika 36). Za razliku od ovih ćelija, apsoltni broj Tfr splenocita nije se značajno menjao tokom starenja, polne razlike nisu nađene ni kod mladih ni kod starih miševa oba soja (Slika 36). Starenje je uticalo na povećanje odnosa (količnik broja) Tfr/Tfh splenocita (Slika 36). Apsolutni broj GC B-ćelija se smanjivao starenjem na sojno-specifičan način, polne razlike u vidu većeg broja GC B splenocita kod ženki, zadržale su se i kod starih miševa oba soja. Stoga, starenje je uticalo na povećanje odnosa Tfr/GC B splenocita, reflektujući prevashodno smanjenje broja GC B splenocita, na sojno-specifičan način (Slika 36).

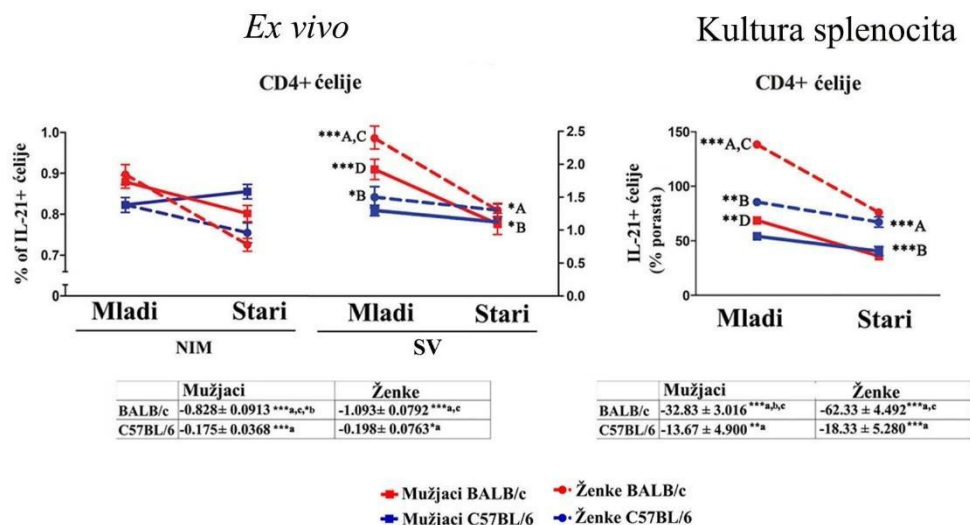


Slika 36. Starenje utiče na apsolutni broj Tfh i GC B splenocita i posledično na odnos (količnik apsolutnog broja) Tfr/Tfh i Tfr/GC B ovih ćelija kod miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa na sojno-specifičan način. Mladi i stari miševi BALB/c i C57BL/6 soja imunizovani su sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa koja je u svom sastavu imala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011(H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Dve nedelje nakon imunizacije urađeno je imunofluorescentno bojenje splenocita i analiza na protočnom citofluorometru (kao što je prikazano na Slici 12). Grafici predstavljaju broj Tfh, Tfr i GC B-ćelija i količnike apsolutnog broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B-ćelija. Linijski dijagrami prikazuju srednju vrednost indeksa proliferacije ± SEM. N = 6 miševa po grupi Nagib prave koji prikazuje promenu apsolutnog broja ćelija i njihovih odnosa tokom starenja prikazan je u tabeli ispod grafika. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. ^AMušjaci vs ženke BALB/c soj, ^BMušjaci vs ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mušjaci, ^aznačajan nagib, ^bznačajna razlika u nagibu između mušjaka i ženki miševa u okviru istog soja, ^cznačajna razlika u nagibu između BALB/c i C57BL/6 miševa.

4.4.3.4. Starenje utiče na smanjenje zastupljenosti CD4+ splenocita koji sintetišu IL-21 na sojno-specifičan način

Uočeno je da se starenjem smanjuje učestalost CD4+ T splenocita koji sintetišu IL-21 citokin sojno-specifično, tako da se sojne razlike uočene kod mladih (veći procenat CD4+ ćelija koje proizvode IL-21 kod BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima) gube kod starih miševa, dok se polne razlike koje se ogledaju u većem procentu CD4+ ćelija koje proizvode IL-21 kod ženki u poređenju sa mušjacima miševa oba soja zadržavaju (Slika 37). Isti trend promena tokom starenja je dobijen i analizom procenta povećanja IL-21+CD4+ ćelija u odgovoru na restimulaciju antigenima iz SV-a u

kulturama splenocita, odnosno polne razlike nađene kod mladih ostaju i kod starih, dok sojne razlike nestaju starenjem (Slika 37).

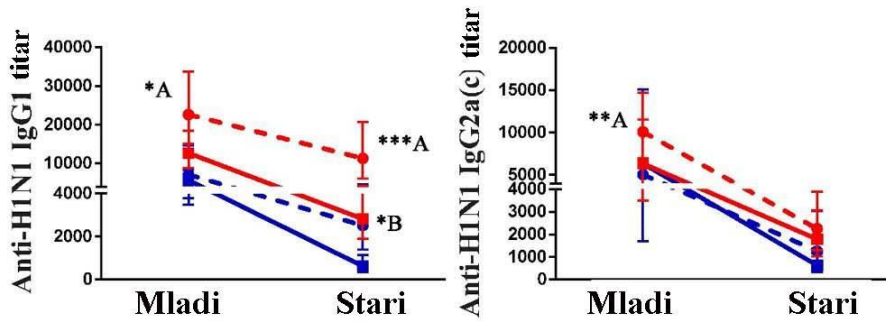


Slika 37. Starenje utiče na smanjenje procentualne zastupljenosti CD4+ T-splenocita koji sintetišu IL-21 na sojno-specifičan način kod miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa. Mladi i stari miševi BALB/c i C57BL/6 soja oba pola imunizovani su SV-om koja je sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, A/Texas/361/2011 (H2N2) virus i B/Massachusetts/2/2012 virus. Splenociti su izolovani dve nedelje nakon imunizacije. Linearni dijagram levo prikazuje učestalost IL21+ ćelija u okviru CD4+ splenocita sveže izolovanih (*ex vivo*) iz neimunizovanih (NIM) i imunizovanih (SV) miševa. Na lineranom dijagramu desno je prikazan procenat povećanja IL21+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ splenocita izolovanih iz imunizovanih miševa, u kulturi splenocita restimulisanih *in vitro* vakcinalnim antigenima tokom 72 sata, u odnosu na ćelije koje su kultivisane samo u medijumu (indeks stimulacije). Urađeno je imunofluorescentno bojenje i analiza na protočnom citofluorometru (kao što je pokazano na Slici 15). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina ± SEM. N=6 miševa po grupi. Nagibi linija koja opisuje promene u procentualnoj zastupljenosti IL21+ ćelija u okviru CD4+ splenocita i indeksu stimulacije starenjem prikazane su u tabeli. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. ^AMužjaci vs ženke BALB/c soj, ^BMužjaci vs Ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mužjaci, ^aznačajan nagib, ^bznačajna razlika u nagibu između mužjaka i ženki miševa u okviru istog soja, ^cznačajna razlika u nagibu između BALB/c i C57BL/6 miševa.

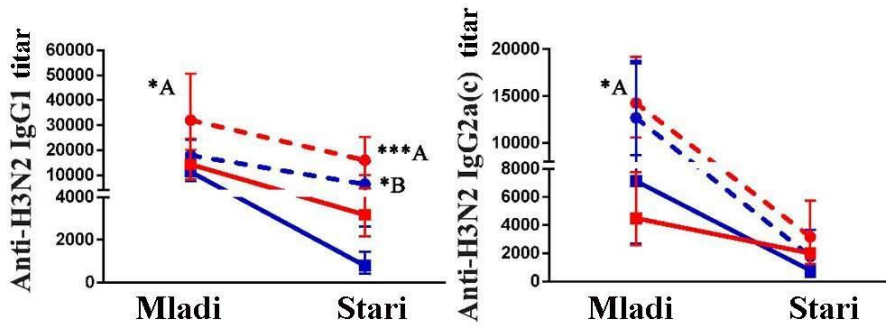
4.4.3.5. Starost i pol utiču na profil IgG potklasa antitela specifičnih za antigene iz SV vakcine u serumu miševa imunizovanih ovom vakcinom

Iako kod mladih miševa oba soja nije postojala polna razlika u odnosu (količniku) titra IgG2(a)c/IgG1 potklasa antitela specifičnih za antigene virusa iz SV kojom su ove životinje imunizovane, kod starih miševa su detektovane polne razlike za sva tri vakcinalna antigena gde je kod ženki pronađen manji količnik titra IgG2(a)c/IgG1 u poređenju sa mužjacima oba soja miševa (Slika 38). Ova razlika je posledica intenzivnijeg pada sinteze IgG1 antitela tokom starenja kod

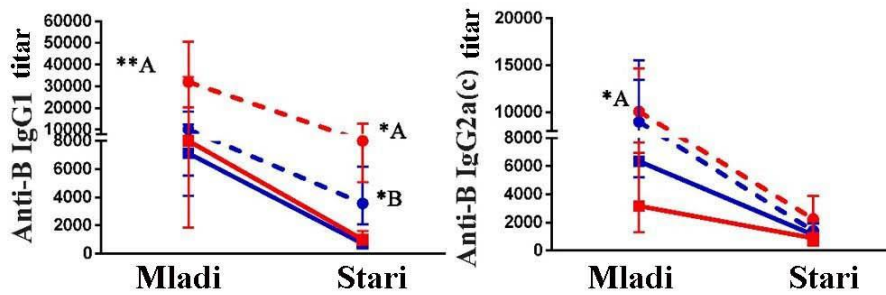
mužjaka u odnosu na ženke miševa. Posledično, u poređenju s mužjacima kod starih ženki miševa oba soja dominirao je IgG1 odgovor, odnosno Th2 odgovor [191] (Slika 38). Odnos (količnik titra) IgG2a/IgG1 antitela starenjem se nije menjao u serumu ženki BALB/c miševa (Slika 38). S druge strane kod ženki C57BL/6 soja odnos IgG2c/IgG1 antitela u serumu se smanjio tokom starenja (Slika 38). U serumu mužjaka miševa BALB/c soja odnos IgG2a/IgG1 antitela je bio veći kod starih u poređenju sa serumima mladih životinja (Slika 38). Odnos IgG2c/IgG1 antitela u serumu miševa C57BL/6 soja nije se menjao tokom starenja (Slika 38). Polne razlike u količniku IgG2(a)c/IgG1 nisu uočene kod mladih, ali su detektovane kod starih miševa, gde ovaj količnik bio manji kod ženki u poređenju sa mužjacima starih miševa oba soja.



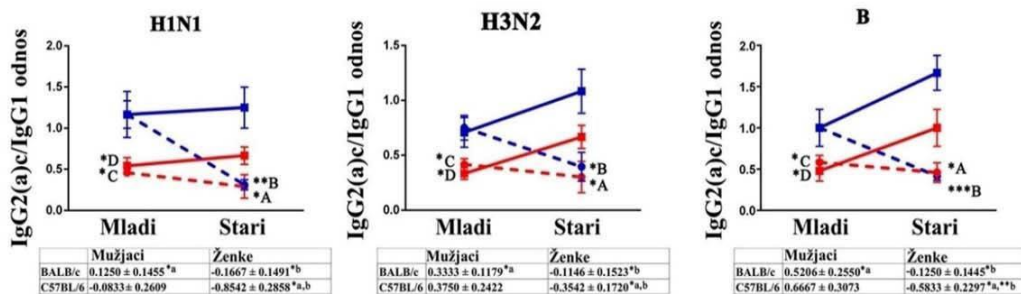
	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke
BALB/c	-10330 ± 1745 ^{***a}	-11330 ± 4185 ^{*a}	BALB/c	-5333 ± 1961 ^{*a}
C57BL/6	-5292 ± 905 ^{***a}	-1667 ± 2390 ^{*a,*b}	C57BL/6	-6625 ± 1914 ^{**a}



	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke
BALB/c	-12670 ± 3602 ^{**a}	-12000 ± 8198 ^{*a}	BALB/c	-2833 ± 1078 ^{*a}
C57BL/6	-11080 ± 1805 ^{***a}	-9667 ± 3593 ^{*a,*b}	C57BL/6	-8625 ± 2866 ^{*a}



	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke
BALB/c	-12750 ± 4655 ^{*a}	-26000 ± 6620 ^{**a}	BALB/c	-3042 ± 1311 ^{*a}
C57BL/6	-7250 ± 1792 ^{**a}	-7333 ± 2348 ^{*a,*b}	C57BL/6	-6417 ± 1977 ^{**a}



	Mužjaci	Ženke
BALB/c	0.1250 ± 0.1455 ^{*a}	-0.1667 ± 0.1491 ^{*b}
C57BL/6	-0.0833 ± 0.2609	-0.8542 ± 0.2858 ^{*a,*b}

	Mužjaci	Ženke
BALB/c	0.3333 ± 0.1179 ^{*a}	-0.1146 ± 0.1523 ^{*b}
C57BL/6	0.3750 ± 0.2422	-0.3542 ± 0.1720 ^{*a,*b}

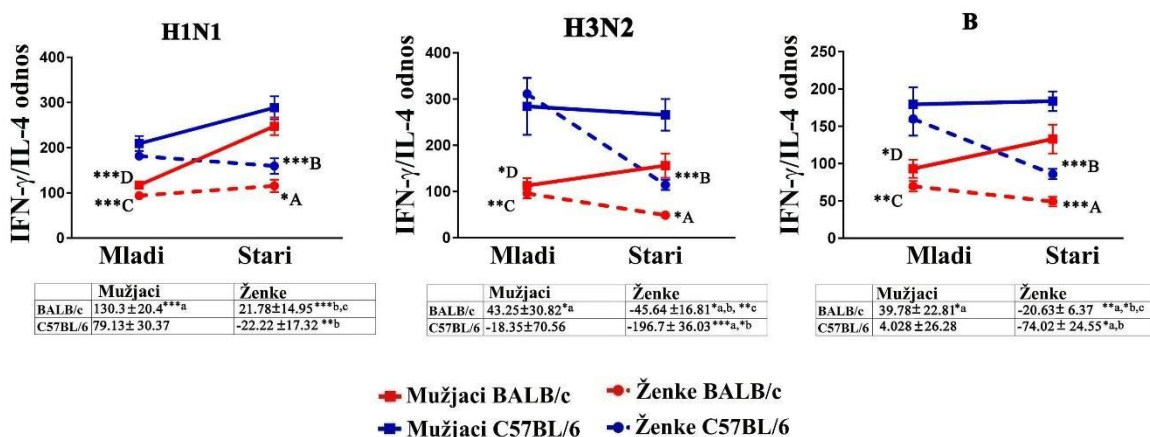
	Mužjaci	Ženke
BALB/c	0.5206 ± 0.2550 ^{*a}	-0.1250 ± 0.1445 ^{*b}
C57BL/6	0.6667 ± 0.3073	-0.5833 ± 0.2297 ^{*a,**b}

● Mužjaci BALB/c ● Ženke BALB/c
● Mužjaci C57BL/6 ● Ženke C57BL/6

Slika 38. Starenje utiče na odnos (količnik titrova) IgG2(a)c/IgG1 potklasa antitela specifičnih za antigene sadržane u sezonskoj trovalentnoj *split* inaktivisanoj vakcini (SV) protiv gripa kojom su imunizovani miševi na polno- i sojno-specifičan način. Mladi i stari miševi BALB/c i C57BL/6 soja imunizovani su SV-om koja je u sastavu sadržala: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like(H1N1) virus, A/Texas/361/2011(H3N2) virus i B/Massachusetts/2/2012-like (B) virus. Četiri nedelje nakon imunizacije u serumu je ELISA testom određen titar IgG1 i IgG2(a)c antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B antigene iz vakcine i izračunat njihov odnos. Linearni dijagrami prikazuju titar IgG1 i IgG2a(c) antitela specifičnih za pojedinačne antigene iz vakcine i odnos IgG2(a)c/IgG1 antitela specifičnih za H1N1, H3N2 i B antigene. Nagibi linija koje opisuju promene tokom starenja predstavljene su u tabeli ispod dijagrama. Rezultati koji prikazuju titar potklasa su prikazani kao geometrijska sredina \pm 95% inetrval poverenja (engl. confidence interval, CI), a odnos potklasa antitela je prikazan kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^AMušjaci vs Ženke BALB/c soj, ^BMušjaci vs ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mužjaci, ^aznačajan nagib, ^bznačajna razlika u nagibu između mužjaka i ženki miševa u okviru istog soja, ^cznačajna razlika u nagibu između BALB/c i C57BL/6 miševa.

4.4.3.6. Starenje utiče na odnos Th1/Th2 citokina u kulturi splenocita restimuliranih antigenima sadržanim u SV-i kojom su miševi imunizovani na sojno- i polno-specifičan način

Starenje je uticalo na odnos (količnik) koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina u kulturi splenocita BALB/c i C57BL/6 miševa imunizovanih SV-om i restimuliranih u kulturi antigenima sadržanim u ovoj vakcini (Slika 39). Ove promene su pratile promene u odnosu (količniku titra) IgG2(a)c/IgG1 antitela specifičnih za antigene iz SV-e u serumu (Slika 39). U kulturama splenocita starih miševa su se izgubile sojne razlike u odnosu koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina (mlade ženke BALB/c soja su imale manji količnik IFN- γ /IL-4 citokina u poređenju sa mladim ženkama C57BL/6 soja) uočene u odgovarajućim kulturama mladih životinja (Slika 39). Suprotno, iako nije bilo polnih razlika u vrednosti ovog količnika u kulturama splenocita mladih miševa, one su detektovane u kulturama splenocita starih miševa oba soja (Slika 39). Konkretno, u kulturama splenocita starih ženki oba soja miševa odnos koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina bio je manji u poređenju sa kulturama splenocita izolovanih iz mužjaka odgovarajućeg soja (Slika 39). Ova razlika je odražavala povećanje ovog količnika u kulturama starih mužjaka BALB/c miševa u odnosu na mlade, uz nepromenjen količnik kod ženki (Slika 39). U kulturama splenocita starih C57BL/6 miševa polna razlika u odnosu koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina je nastala zbog smanjenja koncentracije IFN- γ citokina u kulturama starih ženki u odnosu na kulture ovih ćelija koje su izolovane iz mužjaka istog uzrasta, kod kojih je ovaj odnos bio sličan u kulturama splenocita mladih i starih životinja (Slika 39).



Slika 39. Starenje utiče na odnos (količnik) koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina u kulturi splenocita izolovanih iz miševa imunizovanih sezonskom trovalentnom *split* inaktivisanom vakcinom (SV) protiv gripa, restimuliranih u kulturi antigenima iz ove vakcine, na sojno- i polno-specifičan način. Linearni dijagrami prikazuju količnik koncentracija IFN- γ /IL-4 citokina u kulturi splenocita, izolovanih iz mladih i starih miševa BALB/c i C57BL/6 soja dve nedelje nakon imunizacije SV-om i restimuliranih 72 sata sa H1N1, H3N2 i B virusnim antigenima iz vakcine. Nagib linija koje opisuje promene odnosa IFN- γ /IL-4 citokina tokom starenja predstavljene su u tabeli ispod dijagrama. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. N=6 miševa po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^AMušjaci vs Ženke BALB/c soj, ^BMušjaci vs Ženke C57BL/6 soj, ^CBALB/c vs C57BL/6 soj ženke, ^DBALB/c vs C57BL/6 soj mušjaci, ^aznačajan nagib, ^bznačajna razlika u nagibu između mužjaka i ženki miševa u okviru istog soja, ^cznačajna razlika u nagibu između BALB/c i C57BL/6 miševa.

5. DISKUSIJA

5.1. Polne razlike u IgG odgovoru *Swiss* miševa na CIV-u

Istraživanja sprovedena na mladim *Swiss* genetički nesrodnim miševima imunizovanim CIV-om su pokazala postojanje polnih razlika u titru IgG antitela specifičnih za vakcinalne viruse u serumu životinja imunizovanih ovom vakcinom. Ovo je u skladu sa brojnim literaturnim podacima koji pokazuju postojanje polnih razlika u imunskom odgovoru na virusne vakcine, u smislu snažnijeg odgovora kod jedinki ženskog pola [4,35,158]. Naime, u obe ispitane vremenske tačke nakon imunizacije, tj nakon tri i šest nedelja, titar IgG antitela specifičnih za virus bio je veći u serumu ženki *Swiss* miševa u poređenju sa mužjacima miševa istog soja. Sa druge strane, titar IgG antitela specifičnih za H3N2 i B soj virusa bio je jednak tri nedelje nakon imunizacije CIV-om, dok je šest nedelja nakon imunizacije detektovana polna razlika, tj. veći titar specifičnih antitela kod ženki u poređenju sa mužjacima *Swiss* miševa. Uočena polna razlika je posledica značajnog sniženja titra IgG antitela kod mužjaka u ovom vremenskom periodu, dok se titar kod ženki nije značajnije menjao. Poznato je da humoralni imunski odgovor započinje sintezom specifičnih antitela, najpre od strane kratko-živećih plazmablasta, i da ova antitela imaju inicijalnu zaštitnu ulogu [192]. Istovremeno, druga grana humoralnog odgovora, koja obuhvata odgovor GC i kao rezultat ima stvaranje memorijskih B-ćelija i dugoživećih plazma ćelija, pokreće stvaranje odloženog, dugotrajnijeg efektorskog imunskog odgovora koji pruža dugoročnu zaštitu [192]. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje polnih razlika u dinamici razvoja humoralnog imunskog odgovora na različite antigene. Može se pretpostaviti da, kada su u pitanju antitela specifična za H3N2 i B soj virusa, postojanje značajnih polnih razlika u kasnijoj vremenskoj tački, potiče od različite dinamike razvoja odloženog specifičnog imunskog odgovora na ove antigene. Ova razlika bi ukazivala i na veću efikasnost odgovora, što vodi dugotrajnijoj zaštiti protiv H3N2 i B virusa gripa kod ženki u poređenju sa mužjacima *Swiss* miševa. Rezultati ukazuju na to da jačina i dinamika humoralnog imunskog odgovora kod miševa zavisi od pola miševa, ali i od soja virusa gripa.

Titri funkcionalnih antitela su u korelaciji sa zaštitom od infekcije virusom gripa [163], budući da neutrališu aktivnost virusa i sprečavaju infekciju [42]. Značajno veći titar antitela specifičnih za H1N1 virus gripa koja su određena HAI i MN testom kod ženki *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om u poređenju sa mužjacima jeste u skladu sa literaturnim nalazima dobijenim kod ljudi, koji govore da žene nakon vakcinacije sintetišu veći titar neutrališućih antitela protiv virusa gripa tipa A u poređenju sa muškarcima [138]. Sa druge strane, titar funkcionalnih anti-H3N2 i anti-B antitela određenih HAI i MN testom nije se statistički značajno razlikovao u serumu mužjaka i ženki *Swiss* miševa nakon imunizacije CIV-om. Ovo sugerše da kod miševa, kao i kod ljudi [193] polne razlike u titru funkcionalnih antitela u odgovoru na CIV zavise od soja virusa.

Imajući u vidu da imunizacija CIV-om primarno obezbeđuje zaštitu od virusa gripa posredovanu IgG antitelima [97], kao i činjenicu da različiti izotipovi IgG antitela imaju posebne uloge u imunskom odgovoru [65], određeni su titri antitela različitih IgG izotipova u serumu *Swiss* miševa imunizovanih CIV-om. Najveći udeo u ukupnom titru IgG virus-specifičnih antitela i kod mužjaka i kod ženki *Swiss* miševa imala su IgG2a antitela, za koja je pokazano da su u pozitivnoj korelaciji sa efikasnošću vakcine protiv gripa [65]. Titar ove potklase antitela nije se razlikovao između mužjaka i ženki *Swiss* miševa. IgG2a antitela kod miša uglavnom učestvuju u uklanjanju virusa; njihov Fc region interaguje sa komponentama komplementa i aktivatorskim Fc γ receptorima sa velikim afinitetom [194]. Interakcijom sa Fc γ receptorima dolazi do aktivacije efektorskih mehanizama, između ostalih i ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitela koja učestvuje u uklanjanju

virusa gripa iz domaćina [195]. Imajući u vidu polne razlike u titrima ukupnih IgG antitela specifičnih za sojeve virusa koji su sadržani u vakcini, može se zaključiti da je titar IgG2a antitela specifičnih za H1N1 virus gripa u serumu bio robusniji kod ženki *Swiss* miševa u poređenju sa mužjacima. Međutim, titar IgG1 antitela specifičnih za sva tri soja virusa iz vakcine (H1N1, H3N2 i B) bio je niži kod ženki u poređenju sa mužjacima miševa. Za antitela IgG1 potklase pokazano je da doprinose neutralizaciji virusnih čestica u *in vitro* i *in vivo* uslovima [65]. Takođe, IgG1 antitela svojim Fc regionom ostvaruju interakciju nižeg afiniteta sa aktivatorskim Fc γ receptorima u poređenju sa IgG2a antitelima, te s toga oni manje efikasno aktiviraju efektorske mehanizme koji su posredovani ovim receptorima [196]. Ove dve potklase antitela sa svojim različitim funkcijama, obezbeđuju snažan imunski odgovor protiv virusa gripa [65].

Dalje, eksperimenti urađeni u sklopu ove disertacije su pokazali da je tri nedelje nakon imunizacije *Swiss* miševa CIV-om, odnos (količnik titrova) IgG2a/IgG1 antitela specifičnih za sva tri soja virusa sadržanih u vakcini, kod ženki bio pomećen ka produkciji IgG2a antitela u poređenju sa mužjacima. Ovaj odnos potklasa odslikava odnos između Th1 i Th2 imunskog odgovora, budući da IFN- γ , citokin Th1 odgovora, stimuliše produkciju IgG2a antitela, a IL-4, čija sinteza je karakteristična za Th2 ćelije, stimuliše produkciju IgG1 antitela [65]. Kao što je pomenuto u uvodu, IgG1 antitela imaju ulogu u neutralizaciji virusa, dok IgG2a antitela aktiviraju sistem komplementa, vežu se za Fc γ receptore na fagocitima i indukuju antitelima-posredovanu ćelijsku citotoksičnost [65].

Šest nedelja nakon imunizacije *Swiss* miševa CIV-om nije bilo polnih razlika u profilu IgG potklasa. Polne razlike u odgovoru IgG1 na viruse sva tri soja iz CIV-e koje su uočene tri nedelje nakon imunizacije, nisu detektovane šest nedelja nakon imunizacije, što ukazuje da postoje polne razlike u kinetici sinteze/poluzivotu IgG potklasa.

Th1 imunski odgovor prevashodno „upravlja“ celularnim imunitetom i ima ulogu u odbrani od virusa i drugih intracelularnih patogena, dok Th2 odgovor koji „upravlja“ humoralnim imunitetom, utiče na povećanje sinteze antitela i učestvuje u odbrani od ekstracelularnih patogena [197]. Imajući u vidu odnos potklasa, može se zaključiti da je kod ženki imunski odgovor „pomećen“ ka Th1 odgovoru u poređenju sa mužjacima. Uzimajući u obzir da su splenociti koji sintetišu IFN- γ bili jednako zastupljeni u kulturama mužjaka i ženki *Swiss* miševa splenocita restimuliranih antigenima CIV-a, dok su splenociti koji su sintetisali IL-4 bili manje zastupljeni u kulturama ovih ćelija izolovanih iz ženki u poređenju sa kulturama ćelija izolovanih iz mužjaka i podatke koji govore u prilog tome da se Th1 i Th2 ćelije međusobno regulišu, može se pretpostaviti da postoje polne razlike u recipročnoj regulaciji produkcije Th1/Th2 citokina [198].

5.2.Uticaj tipa vakcine na polne razlike u IgG odgovor *Swiss* miševa na CIV

Sledeći segment ispitivanja je imao za cilj da utvrdi značaj tipa vakcine protiv grip (CIV vs SV) na polne razlike u imunskom odgovoru kod mladih genetički nesrodnih (razrođenih) *Swiss* miševa. Pokazano je postojanje, kako kvantitativnih (u intenzitetu IgG odgovora merenog titrom ovih antitela u serumu), tako i kvalitativnih (u profilu IgG potklasa i titru funkcionalnih antitela u serumu) razlika u IgG odgovoru *Swiss* miševa na CIV i SV. Koliko je poznato, prvi put je pokazano da je odgovor na SV, koji je procenjen određivanjem titra IgG antitela specifičnih za vakcinalne sojeve virusa u serumu bio slabiji u poređenju sa odgovorom koji je indukovala CIV kod miševa odgovarajućeg pola. Niži titar IgG antitela kao odgovor na SV u poređenju sa odgovorom na CIV pokazan je na visokosrodnim miševima ženskog pola u nekoliko studija [66,199,200], kao i u studiji Cox i saradnika, za koju nedostaju podaci o polu miševa na kojima su eksperimenti izvedeni [201]. U skladu sa podacima koji su dobijeni u ovoj disertaciji, a koji pokazuju da ukupan titar IgG virus-

specifičnih antitela u serumu korelira sa titrom neutrališućih antitela, u serumu *Swiss* miševa imunizovanih SV-om detektovan je manji titar ovih antitela u poređenju sa onim koji je detektovan u serumu miševa istog soja koji su imunizovani CIV-om. Ova razlika u titru serumskih neutrališućih antitela bila je statistički značajna samo za IgG odgovor na antigene H1N1 i H3N2 virusa iz vakcine kod mužjaka. Razlog za ovakav nalaz može biti činjenici da, iako sve potklase IgG ispoljavaju sposobnost neutralizacije virusa, postoje razlike u kapacitetu obavljanja ove funkcije od strane različitih IgG potklasa [202], tako da iako titar neutrališućih antitela odražava dominantno titar ukupnih IgG antitela, on delimično reflektuje i profil potklasa IgG antitela [202]. Međutim, treba imati u vidu da ni ovaj parametar imunskog odgovora, tj. titar neutrališućih antitela, nije apsolutni indikator efikasnosti vakcine, te se sugerije i određivanja kompozicije IgG potklasa [62, 90]. U skladu sa tim, ispitan je i titar IgG1 i IgG2a antitela, i rezultati pokazuju da je kod mužjaka i ženki *Swiss* miševa imunski odgovor na CIV bio usmeren ka produkciji IgG2a potklase antitela specifičnih sojeve virusa iz vakcine, dok nakon imunizacije SV-om nije bilo značajnih razlika u titru IgG1 i IgG2a antitela specifičnih za vakcinalne viruse u serumu. Ove razlike u profilu potklasa IgG antitela u odgovoru na CIV i SV su konzistentne sa podacima dobijenim u drugim istraživanjima koji govore da IgG odgovor na vakcinu protiv gripa zavisi od brojnih faktora, uključujući dozu, način imunizacije i tip vakcine [203]. Odnos (količnik) titra IgG2a/IgG1 antitela specifičnih za sojeve virusa iz vakcine bio je usmeren ka sintezi antitela IgG2a potklase kod miševa vakcinisanih CIV-om u poređenju sa miševima vakcinisanih SV-om odgovarajućeg pola. Sinteza IgG2a antitela je, kako je ranije istaknuto, posebno važna za odbranu od virusnih infekcija i povezuje se sa Th2 tipom imunskog odgovora [65,66]. Ova uloga IgG2a antitela pripisuje se njihovoj sposobnosti da aktiviraju sistem komplementa [67], da se vežu za Fc γ receptore eksprimirane na fagocitima [68] i indukuju ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela [69]. Efikasniji imunski odgovor na vakcinaciju može biti vezan i za predominantnu sintezu IgG2a antitela [65,66]. Za razliku od odgovora na CIV, kod miševa oba pola imunizacija SV-om rezultovala je IgG odgovorom koga karakterišu titri IgG1 i IgG2a potklasa koji se značajno ne razlikuju, što je u skladu sa podacima dobijenim u ispitivanjima drugih istraživača [66,200]. Ovakvi nalazi, tj. odnos titra IgG2a/IgG1 koji je ukazivao na predominantnu sintezu antitela IgG2a potklase kod miševa imunizovanih CIV-om i uporedivi titri ovih potklasa kod miševa imunizovanih SV-om, koreliraju sa zastupljenošću splenocita koji produkuju IFN- γ i IL-4, što je u skladu sa ulogom ovih citokina u regulaciji sinteze IgG potklasa [65].

Prethodno opisane kvalitativne i kvantitativne razlike u sintezi specifičnih IgG antitela u odgovoru na imunizaciju CIV-om i SV-om, mogu biti povezane sa razlikama u sadržaju jednolančane (engl. *single-strained*, ss) RNK [199] i prostornoj organizaciji [200] komponenata koje su ulazile u sastav ispitivanih vakcina [200]. Naime, u CIV-u je sadržaj ssRNK veći i očuvana je struktura virusne partikule, dok prilikom procesa proizvodnje SV-a dolazi do razaranja virusne partikule, a oslobođena RNK postaje podložna degradaciji i procesima njenog aktivnog uklanjanja u živom organizmu [200]. Značaj ssRNK je u tome što se ona, kao molekularni obrazac patogena, vezuje za TLR7 u endozomima i indukuje plazmocitoidne DĆ da sintetišu IFN- α [204], a ovo sa druge strane povoljno utiče na njihovo sazrevanje i povećava njihovu sposobnost usmeravanja Th odgovora u smeru tipa 1 [205]. Takođe, ovaj citokin utiče na diferencijaciju B-ćelija, sintezu antitela i promenu potklasa [206]. Pokazano je i da vezivanje ssRNK za TLR7 u B-ćelijama dovodi do povećanog stvaranja IgG2a antitela [211]. Takođe, smatra se da istovremeno prisustvo i antigena i TLR liganda u istoj ćeliji, što je uslov koji je verovatnije da će se ostvariti kod imunizacije CIV-om, obezbeđuje efikasniji imunski odgovor [208,209].

Polne razlike su uočene u imunskom odgovoru na CIV i na SV kod *Swiss* miševa. Nezavisno od tipa vakcine, titar ukupnih IgG antitela specifičnih za H1N1 soj virusa, kao i titar neutrališućih antitela bio je veći kod ženki u poređenju sa mužjacima. Snažniji humoralni imunski odgovor kod ženki se može, bar delimično, objasniti polnim razlikama u funkcijskim karakteristikama urođenog imunskog odgovora. Naime, pokazano je da plazmocitoidne DC jedinki ženskog pola proizvode značajno veće količine IFN- α kada su stimulirane različitim ligandima za TLR7, uključujući i ssRNK, u odnosu na jedinke muškog pola [204,210]. Sa druge strane, za razliku od IgG odgovora na H1N1 virus, snažniji imunski odgovor na H3N2 virus, u smislu većeg titra specifičnih IgG i neutrališućih antitela u serumu ženki u poređenju sa mužjacima detektovan je samo kod miševa imunizovanih SV-om, dok za ove parametre nisu nađene razlike u odgovoru na stimulaciju antigenima virusa soja B iz vakcine. Ovi rezultati su u skladu sa podacima koji govore da polne razlike u imunskom odgovoru na SV protiv gripa zavise od soja virusa [9]. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu i sa nalazima koji pokazuju da imunizacija kompleksnom suspenzijom T-zavisnih antigena ne dovodi do jednako snažnog odgovora na svaki od antigena u suspenziji [211]. Objasnjenje ovakvih nalaza može biti da će imunski odgovor na T-zavisne antigene pojedinačno zavistiti od imunogenosti samih antigena na T-ćelijskom nivou, a koja veoma varira kod različitih antigena [211]. Ova varijabilnost u sposobnosti antigena da aktiviraju specifične T-ćelije potiče i od same složenosti ovog procesa koji zahteva, pre svega, proteolitičku degradaciju ciljnih proteina na peptide unutar lizozoma antigen prezentujućih ćelija i njihovog vezivanja za molekule MHC II klase čija je dostupnost ograničena. Ovaj proces vezivanja je veoma kompetitivan jer su antigeni peptidi u lizozomu u kompeticiji ne samo međusobno, već i sa velikim brojem drugih proteina (uključujući ligande koji su endocitozom uneti u APC od strane drugih receptora, kao i proteine membranskog porekla). Sama uspešnost ovog procesa će odrediti imunogenost antigena, ne samo na nivou T-ćelija, već i na nivou humoralnog imunskog odgovora na T-zavisne antigene [211]. Za razliku od miševa imunizovanih CIV-om, kod kojih je pokazana polna razlika u titru IgG1 antitela specifičnih za viruse iz vakcine, u serumu miševa koji su bili imunizovani SV-om nisu pokazane polne razlike ni u titru IgG1 ni u titru IgG2a antitela specifičnih za bilo koji od tri vakcinalna soja. U skladu sa tim, bez obzira na soj virusa gripa, količnik IgG2a/IgG1 antitela bio je uporediv kod mužjaka i ženki *Swiss* miševa imunizovanih SV-om. Na osnovu svega prethodno iznetog može se izvesti zaključak da na polne razlike u ukupnom titru IgG antitela kao i u titru neutrališućih antitela (veći kod miševa imunizovanih CIV-om) pored soja virusa gripa koji ulaze u sastav vakcine, utiče i sam tip vakcine. Imunizacija CIV-om usmeravala je imunski odgovor ka IgG2a kod miševa oba pola, te je odnos titra IgG2a/IgG1 titra bio pomećen ka IgG2 antitelima, dok se kod životinja imunizovanih SV-om ovaj odnos IgG2a i IgG1 nije razlikovao između mužjaka i ženki.

5.3. Uticaj genetskih karakteristika miševa na polne razlike u IgG odgovoru na vakcinu protiv gripa

U cilju određivanja uticaja genetskih faktora na polne razlike u odgovoru na vakcinu protiv gripa, u istraživanju su uključeni genetički visokosrodni sojevi BALB/c i C57BL/6 miševa. Mišiji model je najzastupljeniji animalni model u ispitivanjima vezanim za infekciju virusom gripa i u prekliničkim ispitivanjima vakcine protiv gripa. Najčešće korišćeni u ovim istraživanjima su upravo BALB/c i C57BL/6 [212]. Međutim, polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa BALB/c i C57BL/6 soja nisu prethodno upoređeno ispitivane.

Nezavisno od pola miševa, ukupni titri IgG antitela specifičnih za H1N1 i H3N2 sojeve virusa gripa iz SV-e bili su veći kod miševa BALB/c soja u odnosu na miševe C57BL/6 soja. Rezultati Choi i saradnika podržavaju ove nalaze, pokazujući da nakon imunizacije vakcinom AChERV-sH1N1

(engl. *human endogenous retrovirus (HERV) envelope-coated, nonreplicable, baculovirus-based HA vaccine against swine influenza A/California/04/2009(H1N1)*), ženke miševa BALB/c soja imaju veći titar hamaglutinin-specifičnih IgG antitela u odnosu na ženke C57BL/6 [213]. Takođe, nakon infekcije virusom gripa A/HKX31 (H3N2) detektovana je veća ekspresija mnogih gena, uključujući i gene čiji produkti imaju ulogu u imunskom odgovoru, kod miševa BALB/cByJ u poređenju sa C57BL/6J soja[214]. U prilog snažnijeg humoralnog imunskog odgovora na antigene H1N1 i H3N2 virusa iz SV kod BALB/c soja ide i podatak o tome da B-ćelije ovog soja poreklom iz slezine ispoljavaju snažniju aktivnost nakon imunizacije T-zavisnim antigenima [215]. Izostanak sojne razlike u titru IgG antitela specifičnih za antigene B virusa iz vakcine može biti povezan sa različitom kinetikom produkcije antitela na različite T-zavisne antigene [216].

Rezultati koji su dobijeni u ovom segmentu ispitivanja govore u prilog postojanja polnih razlika kod mladih miševa oba ispitivana soja i to u titru IgG specifičnih za antigene A tipa virusa gripa koji je ulazio u sastav SV, ali ne i na antigene B virusa, koji su ulazili u sastav ove vakcine. Takođe je pokazano da je bez obzira na soj miševa, titar IgG odgovora specifičnih za SV antigene bio veći kod ženki u poređenju sa mužjacima. Sa druge strane, pokazano je da profil potklasa specifičnih IgG antitela zavisio od soja miševa, ali ne i pola miševa.

Imajući u vidu da sintezi antitela prethodi klonalna ekspanzija antigen-specifičnih limfocita [217] kao i da razlike u B-ćelijskom odgovoru mogu da odražavaju varijabilnost u T-ćelijskom odgovoru [218], ispitana je proliferacija CD4+ T- i B-splencocita izolovanih iz imunizovanih životinja na restimulaciju antigenima iz SV-a u kulturi. U saglasnosti sa nađenim sojnim i polnim razlikama u titrima antitela u odgovoru na antigene H1N1 i H2N3 sojeva virusa gripa iz SV-e, proliferacija CD4+ i B-ćelija bila je veća u kulturama splencocita BALB/c u poređenju sa C57BL/6 miševima oba pola, kao i kod ženki u odnosu na mužjake istog soja. Veća proliferacija CD4+ i B-splencocita u ćelijskim kulturama stimulisanim vakcinalnim antigenima kod ženki u poređenju sa mužjacima kod oba soja miševa može da odražava veću zastupljenost ćelija koje mogu da odgovore na stimulaciju antigenima iz vakcine protiv gripa kod ženki miša i/ili veći intrinzični proliferativni kapacitet ovih ćelija. Nema podataka koji bi potvrdili prvu tvrdnju, dok postoje podaci koji potvrđuju da splencociti ženki miševa imaju veću proliferativnu sposobnost u poređenju sa splencocitima mužjaka [219]. Takođe je pokazano da CD4+ T-splencociti ženki miševa više proliferišu u poređenju sa splencocitima mužjaka, nakon stimulacije sa anti-CD3/28 antitelima [220].

U skladu sa većim titrom IgG antitela u serumu imunizovanih BALB/c miševa u odnosu na C57BL/6 miševe, detektovane su niže vrednosti odnosa broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B-ćelija, kao rezultat relativno veće zastupljenosti Tfh i GC B-ćelija u odnosu na Tfr ćelije koje kontrolišu sintezu antitela delujući direktno na B-ćelije ili indirektno kontrolom odgovora Tfh ćelija [226-229], u slezinama BALB/c miševa u poređenju sa slezinama C57BL/6 soja. Dakle, svi prethodno izneti nalazi sugerišu da je kontrola GC B-ćelija od strane Tfr ćelija manje efikasna kod BALB/c miševa u poređenju sa C57BL/6 miševima, kao i kod ženki u poređenju sa mužjacima ovih životinja. Ovi nalazi su podržani i podacima koji ukazuju na sojne razlike u kontroli GC odgovora i na druge strane antigene kod miševa [221]. Ispitivanja mehanizama koji se nalaze u osnovi polnih razlika u titru IgG antitela specifičnih za sojeve virusa iz vakcine, sudeći prema odnosu broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B-ćelija, kontrola B-ćelijskog odgovora od strane Tfr ćelija bila je manje efikasna kod ženki u poređenju sa mužjacima miševa i BALB/c i C57BL/6 soja (relativno veći broj Tfh i B-ćelija kod ženki). Ovi nalazi su u skladu sa podacima koji pokazuju da je kod ženki miševa u poređenju sa mužjacima efikasnije formiranje GC u odgovoru na antigene iz vakcine protiv gripa [222].

Profil IgG potklasa se razlikovao između miševa BALB/c i C57BL/6 sojeva, što je u skladu sa nalazima koji ističu uticaj soja miševa na produkciju različitih potklasa IgG antitela na T-ćelijski zavisne antigene [223]. Kod BALB/c miševa oba pola IgG1 potklasa antitela bila je dominantna u IgG odgovoru na antigene iz vakcine, dok je kod C57BL/6 miševa zastupljenost IgG2c i IgG1 antitela bila gotovo jednaka. Stoga je odnos IgG2a(c)/IgG1 potklasa antitela bio značajno veći kod C57BL/6 miševa u poređenju sa BALB/c miševima.

Kao što je prethodno navedeno, sinteza različitih potklasa IgG antitela od strane B-ćelija u odgovoru na novi antigen, prvenstveno je određena obrascem produkcije citokina od strane antigen-specifičnih Th ćelija [224]. Produkcija IgG2a/c antitela je stimulirana citokinima Th1 tipa, dok je produkcija antitela IgG1 potklase stimulirana citokinima Th2 tipa [224]. U skladu sa ovim, u supernatantima kultura splenocita izolovanim iz imunizovanih C57BL/6 miševa i restimuliranih u kulturi antigenima iz SV, izmerene su veće koncentracije IFN- γ u poređenju sa supernatantima odgovarajućih kultura splenocita imunizovanih BALB/c miševa. Manji količnik titra IgG2a/IgG1 antitela kod BALB/c miševa u poređenju sa odnosom IgG2c/IgG1 antitela iz seruma C57BL/6 miševa, korelira sa većom koncentracijom IL-4 u supernatantima kultura splenocita stimuliranih vakcinalnim antigenima BALB/c miševa. Ovi nalazi su u potpunosti u skladu sa podacima koji ukazuju da miševi C57BL/6 soja imaju sklonost da razvijaju Th1 tip imunskog odgovora, dok BALB/c miševi razvijaju Th2 tip imunskog odgovora [225]. Na osnovu ovih nalaza očekuje se da će miševi BALB/c soja imunizovani vakcinom protiv gripa imati jači imunski odgovor protiv virusa gripa u poređenju sa vakcinisanim miševima C57BL/6 soja.

Zaključak koji se može izvesti na osnovu ovih rezultata je da intenzitet IgG odgovora na SV zavisi kako od tipa antigena koji se nalaze u sastavu vakcine, tako i od pola i soja miševa, što odražava barem delimično razlike u kontroli GC reakcije koja je posredovana Tfr ćelijama [72]. Dakle, ovi rezultati podržavaju strategije vakcinacije kojima se ciljaju Tfh i Tfr ćelije. Pored toga, rezultati su pokazali da profil IgG potklasa, koji ukazuje na funkcionalnu sposobnost IgG antitela, zavisi samo od genetske osnove, a ne od pola. Time je takođe ukazano da identifikacija faktora povezanih sa varijacijama imunskog odgovora na SV može doprineti ne samo adekvatnoj zaštiti oba pola od infekcije gripom, već i u dalekosežnoj perspektivi modelovanja strategije personalizovane vakcinacije za različite polove ili čak za određene populacije primaoca vakcina.

5.4. Uticaj starenja na polne razlike u imunskom odgovoru na vakcinu protiv gripa kod miševa sa različitim genetskom osnovom

Ispitivanje uticaja starenja na polne razlike na imunskom odgovoru na SV kod BALB/c i C57BL/6 sojeva miševa sprovedeno je u poslednjem segmentu ispitivanja. Rezultati su pokazali značajne razlike u odgovoru IgG antitela na SV između mladih i starih BALB/c miševa. Manji titar IgG antitela u serumu starih u poređenju sa mladim miševima detektovan je kod miševa oba pola. Ovaj efekat starenja, koji ne zavisi od pola životinja, može se povezati sa smanjenjem broja B-ćelija u slezini i sa smanjenim proliferativnim kapacitetom koji je pokazan u *in vitro* uslovima. U prilog smanjenju proliferativne sposobnosti B limfocita starenjem govore i podaci iz literature [127,226], a koji se mogu objasniti, između ostalog, i intrinzičnim defektima koji se javljaju kod B-ćelija starenjem [226–228]. Rezultati brojnih studija ukazuju na to da glavni defekti u imunskom odgovoru kod starih potiču od smanjenog odgovora CD4+ T-ćelija [114,229,230]. Promene koje pogađaju T-ćelije starenjem, naročito u slezini, negativno utiču i na sposobnost proliferacije GC B-ćelija [127,230,231]. Naši rezultati su pokazali smanjen proliferativni odgovor CD4+ T-ćelija iz slezine starih jedinki oba pola na restimulaciju vakcinalnim antigenima *in vitro*, u poređenju sa mladim jedinkama i u skladu su sa rezultatima drugih grupa [230,232]. Takođe, dobijeni rezultati pokazuju manji porast zastupljenosti i manji broj Tfh ćelija kod starih u odnosu na mlade miševе istog pola. Ovakav smanjeni odgovor Tfh ćelija je u korelaciji sa manjom produkcijom specifičnih IgG [233].

Ovi rezultati, koji se odnose na zastupljenost i broj Tfh ćelija se mogu povezati i sa većim Tfr/Tfh odnosom kod starih miševa [76,234,235]. Treba napomenuti da osim smanjenog broja Tfh ćelija, negativan uticaj na proliferaciju GC B-ćelija može imati i poremećaj na nivou interakcije ova dva tipa ćelija, koji može biti posledica, između ostalog i smanjene produkcije IL-21 [236,237], koji je detektovan kod starih životinja. Naime, imajući u vidu ključnu ulogu IL-21 u održavanju proliferacije GC B-ćelija, smanjenje proliferativnog kapaciteta ovih ćelija može biti posledica i smanjene zastupljenosti CD4+ splenocita koji produkuju ovaj citokin. Takođe, poznat je i supresivni efekat Tfr ćelija na efektorske funkcije Tfh, a jedna od njih je i produkcija IL-21 [238]. Za ostvarivanje supresivnog efekta od značaja je i odnos Tfr/Tfh ćelija [235] i on je kod starih miševa usmeren ka Tfr ćelijama. Imajući u vidu da IL-21 može uticati na ćelijski metabolizam Tfr ćelija i time smanjiti njihovu supresivnu funkciju [238], može se očekivati da ove ćelije imaju snažniju supresivnu funkciju kod starih. Snažniji supresivni efekat ove ćelije ispoljavaju i u odnosu na GC B-ćelije [239], što isto može biti objašnjenje za smanjenu produkcija specifičnih IgG kod starih, u poređenju sa mladim jedinkama istog pola.

Kada je reč o polnim razlikama kod starih miševa, a u skladu i sa literaturnim podacima [240], rezultati pokazuju da ženke imunizovane SV-om imaju više titre specifičnih IgG antitela u serumu u odnosu na mužjake. Ovakav nalaz se može objasniti većim povećanjem zastupljenosti GC B-ćelija i većim apsolutnim brojem ovih ćelija kod ženki u odnosu na mužjake nakon imunizacije, a u korelaciji je sa većim proliferativnom odgovorom B-ćelija na restimulaciju vakcinalnim antigenima *in vitro* kod ženki. Polne razlike u proliferativnom kapacitetu B-ćelija su odraz i polnih razlika u kapacitetu CD4+ T-ćelija da proliferišu *in vitro* nakon restimulacije vakcinalnim antigenima. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa povećanjem zastupljenosti i većim apsolutnim brojem CD4+ T-ćelija kod ženki u odnosu na mužjake nakon imunizacije. Povećana produkcija specifičnih antitela kod starih ženki u odnosu na mužjake može biti i posledica, ne samo većeg broja B-ćelija, već i njihovog povećanog kapaciteta da produkuju antitela. U prilog ovoj pretpostavci ide i odnos Tfr/GC B-ćelija koji je kod ženki pomeren ka GC B-ćelijama.

Kvalitativne promene u imunskom odgovoru na SV koje su detektovane kod starih miševa su polno-specifične i ogledaju se u značajno većem aviditetu specifičnih IgG ženki. Do ovakvog nalaza je došlo usled porasta aviditeta kod ženki tokom starenja, a izostanka ovog efekta kod mužjaka. Literaturni podaci o uticaju starenja na aviditet antitela nisu konzistentni, neki ukazuju na porast, a neki da do promene nije došlo ili da je došlo do sniženja [241,242]. Polne razlike u aviditetu koje su se javile starenjem su nađene kod ljudi koji su imunizovani pandemijskom H1N1pdm09 vakcinom [243]. Dalje je pokazano da su stari miševi imali manje titre specifičnih antitela IgG1 i IgG2a potklase u poređenju sa mladim BALB/c miševima, bez obzira na pol. Ovo ukazuje da starenje, bez obzira na pol, utiče na smanjenje neutrališuće funkcije imunskog odgovora, za koji je zadužena IgG1 potklasa, ali i efektorske funkcije posredovane Fc receptorima koju obavljaju IgG2a antitela [65]. Druge studije su pokazale smanjenje titra IgG1 i IgG2a antitela specifičnih za antigene virusa gripa kod starih neimunizovanih BALB/c miševa [244] i kod istog soja miševa nakon primarne infekcije virusom gripa [245].

Ispitivanje uticaja pola na ove promene je pokazalo da su ženke imale veće titre IgG1 antitela od mužjaka, bez obzira na starost. Međutim, odgovor IgG2a antitela bio je intenzivniji kod mladih ženki nego kod mladih mužjaka, dok se titar antitela ove potklase nisu razlikovali kod starih ženki i mužjaka. Ovo ukazuje na izraženije smanjenje titra IgG2a antitela kod starih ženki, u poređenju sa mužjacima. Posledično, odnos titra IgG2a/IgG1 antitela bio je pomeren prema IgG1 kod starih ženki u poređenju sa mužjacima. U kontekstu ove promene, treba napomenuti da su IgG2a antitela efikasnija u uklanjanju infekcije nego IgG1 antitela. Može se reći da stare ženke, u poređenju sa mužjacima, razvijaju intenzivniji imunski odgovor u smislu specifičnih antitela G klase i produkuju

antitela većeg aviditeta u odgovoru na imunizaciju, dok mužjaci razvijaju povoljniji profil IgG potklasa.

Manji titar potklasa IgG1 i IgG2a(c) antitela kod starih miševa bio je u skladu sa manjom produkcijom IFN- γ i IL-4 citokina u kulturama splenocita ovih miševa koji su restimulisani *in vitro* vakcinalnim antigenima, u poređenju sa produkcijom ovih citokina kod mladih životinja istog pola. Ovakvi rezultati su u skladu literaturnim [246,247]. Viša koncentracija IL-4 kod starih ženki u poređenju sa mužjacima bila je u skladu sa uočenim pomeranjem ravnoteže IgG2a(c)/IgG1 odnosa antitela ka IgG1 potklasi. Promena u produkciji citokina starenjem koja dovodi do pomeranja ravnoteže od produkcije citokina Th1 tipa kod mladih ka produkciji citokina Th2 tipa kod starih zabeležen je kod nekih sojeva miševa i ljudi [247,248]. Međutim, nijedna studija do sad nije ispitala uticaj pola na ove promene.

Zaključno, rezultati pokazuju da se ukupni serumski titar IgG antitela u odgovoru na SV kod BALB/c miševa oba pola smanjuje starenjem. Međutim, samo kod ženki je starenje uticalo na kvalitativne karakteristike IgG odgovora, što je dovelo do povećanja aviditeta IgG antitela i manje povoljnog profila IgG potklasa. Rezultati takođe sugerišu da su starostne promene u Th ćelijama koje su uključene u GC reakciju doprinele polnim razlikama u humoralnom odgovoru na vakcinu. Stoga, ovi rezultati podržavaju ideju da bi i starost i pol trebalo uzeti u obzir prilikom manipulacije T-ćelijskim odgovorima radi poboljšanja GC reakcije. Ovi nalazi imaju implikacije za prevenciju i lečenje gripa i drugih zaraznih bolesti kod starijih osoba, te ukazuju da bi se pol trebao uzeti u obzir kao biološka varijabla u budućim prekliničkim i kliničkim studijama.

Rezultati pokazuju da je uticaj starenja imao različit efekat kod miševa sa različitom genetskom osnovom. Naime, kao što je i pokazano u studijama na ljudima [249,250], kod miševa oba pola i soja, starenjem dolazi do značajnog sniženja produkcije IgG antitela u odgovoru na SV. Međutim, za razliku od mladih BALB/c miševa koji su razvijali intenzivniji odgovor na imunizaciju u odnosu na C57BL/6 miševе istog pola, ova sojna razlika nije detektovana kod starih miševa. Razlog za ovakav nalaz je izraženije smanjenje titra specifičnih IgG kod BALB/c soja u odnosu na miševе C57BL/6 odgovarajućeg pola. Dakle, može se zaključiti da kinetika sniženja humoralnog imunskog odgovora koje se dešava tokom starenja, zavisi od genetske osnove miševa. U prilog uticaja genetske osnove na kinetiku promena tokom starenja govore podaci o tome da se stepen smanjenja titra specifičnih IgG u serumu miševa nakon imunizacije vakcinom A/PR/8/34 (PR8; H1N1) koja je sadržavala i adjuvans, razlikovao od soja do soja [153]. U prilog ovoj tvrdnji govore i rezultati dobijeni ispitivanjem jačine imunskog odgovora tokom starenja kod BALB/c i C75BL/6 miševa na neke bakterijske antigene [251].

Izraženije opadanje jačine humoralnog imunskog odgovora u odgovoru na SV kod BALB/c u odnosu na C57BL/6 tokom starenja, može se objasniti i većim povećanjem Tfr/GC B-ćelijskog odnosa kod BALB/c miševa, što je odraz izrazitijeg sniženja broja GC B-ćelija. Konačno, starenjem se smanjivao proliferativni odgovor CD4+ T- i B-ćelija specifičnih za vakcinalne antigene u kulturi splenocita na sojno-specifičan način, pri čemu su BALB/c miševi imali veći pad indeksa proliferacije u odnosu na C57BL/6 miševе.

Iako su starenjem sojne razlike u produkciji specifičnih IgG antitela nestale, polne razlike su i dalje bile prisutne kod starih miševa oba soja, tj. ženke su imale veći titar IgG antitela specifičnih za sva tri antigena iz vakcine u poređenju sa starim mužjacima i ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studija sprovedenim na ljudima [9,98]. Sa druge strane, studija Potluri i saradnika, izvedena na podsoju C67BL/6 J, nije pokazala da postoje polne razlike kod starih miševa u titru IgG nakon

imunizacije vakcinom koja sadrži 2009 H1N1 adaptiran za miša, iako su one detektovane kod mladih [138].

Starenje je, nezavisno od specifičnosti IgG antitela, imalo uticaj na odnos potklasa: IgG2a/IgG1 kod mužjaka BALB/c miševa i IgG2c/IgG1 kod ženki C57BL/6 miševa. Ove promene su rezultovale promenom u usmerenosti odnosa potklasa, tako da je kod starih ženki oba ispitivana soja, ovaj odnos bio usmeren ka IgG1 potklasi, u odnosu na mužjake odgovarajućeg soja. Sojne razlike u uticaju starenja na produkciju potklasa IgG pokazane su i kod BALB/c i CBA miševa [252]. U prilog tome da postoje polne razlike u promeni odnosa IgG potklasa starenjem kod miševa i da zavise od soja ovih životinja, govore i rezultati koji pokazuju da kod mužjaka C57BL/6J koji su imunizovani inaktivisanom vakcinom koja sadrži 2009H1N1 adaptiran za miša odnos IgG2c/IgG1 starenjem biva usmeren ka IgG1 potklasi, dok kod ženki ostaje nepromenjen [138].

6.ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti brojni zaključci.

I Postoje **polne razlike** u imunskom odgovoru na CIV, tako da je u serumima ženki genetički nesrodnih *Swiss* miševa, u poređenju sa serumima mužjaka istog soja:

- veći titar IgG specifičnih za H1N1 soj virusa tri i šest nedelja nakon imunizacije, dok su titri IgG specifičnih za H3N2 i B sojeve virusa gripa bili veći samo šest nedelja nakon imunizacije;
- veći titar funkcionalnih antitela specifičnih za H1N1 soj virusa (titri ovih antitela specifičnih za virus gripa H3N2 i B sojevanisu razlikovali između polova);
- dominantna sinteza antitela IgG2a potklase specifičnih za virusne antigene iz vakcine tri nedelje nakon imunizacije, što se moglo povezati sa polnim razlikama u zastupljenosti Th1 i Th2 splenocita, koji sintetišu ključne citokine (IFN- γ i IL-4) za oblikovanje profila IgG potklasa, tri nedelje nakon imunizacije koje su nestajale šest nedelja nakon imunizacije.

II Tip vakcine (CIV ili SV) utiče na imunski odgovor kod *Swiss* miševa:

- utiče na intenzitet imunskog odgovora (niži titar IgG antitela specifičnih za sojeve virusa iz vakcine kod životinja oba pola koje su imunizovane SV-om u poređenju sa onim imunizovanim CIV-om);
- kvalitet IgG odgovora (niži titar funkcionalnih antitela specifičnih za H1N1 soj u serumu miševa oba pola imunizovanih SV-om i antitela specifičnih za H3N2 soj kod mužjaka imunizovanih SV-om u poređenju sa onim imunizovanim CIV-om)
- kod imunizovanih miševa nađene su i polne razlike u humoralnom odgovoru zavisno od tipa vakcine, tako da je kod miševa imunizovanih CIV-om titar IgG antitela specifičnih za H1N1 bio veći u serumu ženki nego mužjaka, dok je kod miševa imunizovanih SV-om titar IgG antitela specifičnih za H3N2 bio niži kod ženki nego mužjaka. Osim toga, polne razlike u profilu potklasa IgG antitela specifičnih za viruse iz vakcine koje su detektovane kod miševa imunizovanih CIV-om, nisu uočene kod onih imunizovanih SV-om (što se povezuje sa razlikama u zastupljenosti Th1 i Th2 ćelija u slezini).

III Istraživanja koja uključuju visokosrodne BALB/c i C57BL/6 miševе, ukazuju da **genetska osnova** miševa ima uticaja na intenzitet i kvalitet IgG odgovora, ali ne i na polne razlike nakon imunizacije SV-om

- titar IgG antitela specifičnih za antigene virusa A tipa iz ove vakcine u serumu imunizovanih BALB/c miševa oba pola u odnosu na C57BL/6 miševе bio je veći kod BALB/c oba pola u odnosu na C57BL/6 miševе odgovarajućeg pola, kod oba soja miševa titri ovih antitela su bili veći u serumu ženki nego kod mužjaka
- u serumu BALB/c miševa su dominirala antitela specifična za viruse iz vakcine potklase IgG1 (što implicira više izražen Th2 imunski odgovor), dok su kod C57BL/6 miševa bila jednako zastupljena antitela IgG1 i IgG2c potklase.

IV Istraživanja koja su uključivala životinje različitog uzrasta su pokazala da **starenje**:

- smanjuje intenzitet IgG odgovora specifičnog za viruse iz SV u serumu imunizovanih BALB/c i C57BL/6 miševa oba pola (manji u serumu starih miševa oba soja, s tim što je kod BALB/c miševa posebno promenjena sinteza antitela specifičnih za tipa A virusa gripa
- povećava aviditet IgG antitela u serumu ženki miševa oba soja imunizovanih SV-om
- menja profil IgG potklasa na (a) polno-specifičan način, budući da sinteza IgG1 antitela specifičnih za antigene iz vakcine u serumu mužjaka opada više nego ženki miševa BALB/c i

C57BL/6 soja miševa i (b) sojno-specifičan način budući da se odnos (količnik titra) IgG2a(c)/IgG1 antitela specifičnih za antigene iz vakcine ne menja u serumu ženki i mužjaka BALB/c soja, dok se kod C57BL/6 ženki smanjuje, a ne menja kod mužjaka C57BL/6 miševa.

V Analiza celularnih i molekularnih mehanizama koji su u osnovi sojnih, polnih i starosnih promena u IgG odgovoru na vakcinu protiv gripa je pokazala da se intenzivniji i kvalitativno drugačiji humoralni odgovor na imunizaciju kod BALB/c u odnosu na C57BL/6 miševa razvija usled:

- intenzivnijeg proliferativnog odgovora slezinskih Th i B-ćelija;
- većeg broja Tfh i GC B splenocita uz sličan broj Tfr splenocita kod BALB/c miševa;
- veće zastupljenosti CD4+ splenocita koji proizvode IL-21 citokin koji ima ključnu ulogu u formiranju GC i regulaciji optimalnog odgovora Tfh i GC B-ćelija;
- razlike u sintezi IL-4 (povećana sinteza) i IFN- γ (smanjena sinteza) od strane Th ćelija slezine, što upućuje na dominaciju Th2 tipa odgovora kod BALB/c miševa.

VI Intenzivniji i kvalitativno drugačiji IgG odgovor na imunizaciju SV-om kod ženki oba ispitivana soja i starosti u odnosu na mužjake razvija se usled:

- snažnijeg proliferativnog odgovora Th i B-ćelija na antigene iz SV vakcine kod ženki u odnosu na mužjake;
- većeg broja Tfh i GC B splenocita i posledično manjeg količnika broja Tfr/Tfh i Tfr/GC B splenocita kod ženki u poređenju sa mužjacima, koji su pokazatelji efikasnosti kontrole GC reakcije;
- veće zastupljenosti CD4+IL-21+ splenocita
- razlike u sintezi IL-4 (smanjena sinteza), što uz odsustvo polnog diergizma u sintezi IFN- γ upućuje na usmerenost diferencijacije Th splenocita u Th1 ćelije kod ženki.

VII Slabiji humoralni odgovor na imunizaciju SV-om kod starih u odnosu na mlade BALB/c i C57BL/6 miševa oba soja može se povezati sa uticajem starenja na:

- smanjenje proliferativnog odgovora Th i B splenocita;
- smanjenje broja Tfh i GC B splenocita, što uz očuvan broj Tfr upućuje na veći supresorski kapacitet Tfr splenocita;
- smanjenje zastupljenosti CD4+IL-21+ splenocita.

U celini, prikazana istraživanja pokazuju da genetske karakteristike miševa, njihov pol i uzrast (a u onoj meri u kojoj su rezultati istraživanja na ogleđnim životinjama primenljivi na čoveka, i individualne razlike, pol i uzrast kod ljudi), kao i tip vakcine mogu uticati na imunski odgovor na vakcinu protiv gripa, što indirektno implicira da se prilikom dizajniranja vakcine protiv gripa mora uzeti u obzir u najmanjem pol primaoca, uzrast, kao i vrsta vakcine, a da je za optimalne rezultate vakcinacije verovatno neophodan i personalizovan pristup vakcinaciji, koji uzima u obzir i genetske karakteristike primaoca. Dodatno, ovi rezultati ukazuju da se u cilju optimizacije efekata vakcinacije mora imati u vidu mogućnost da se utiče na reakciju GC delovanjem, pre svega, na odgovor Tfh i Tfr ćelija.

7.LITERATURA

- [1] H. Jacobsen, S.L. Klein, Sex Differences in Immunity to Viral Infections, *Front. Immunol.* 12 (2021) 3483. [/pmc/articles/PMC8438138/](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.00348) (приступљено 04. Јуни 2023.).
- [2] C. Giefing-Kröll, P. Berger, G. Lepperdinger, B. Grubeck-Loebenstein, How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination., *Aging Cell.* 14 (2015) 309–21. <https://doi.org/10.1111/ace1.12326>.
- [3] V. Taneja, Sex Hormones Determine Immune Response., *Front. Immunol.* 9 (2018) 1931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01931>.
- [4] S.L. Klein, K.L. Flanagan, Sex differences in immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
- [5] S.L. Klein, C. Roberts, *yp.*, Sex Hormones and Immunity to Infection, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02155-8>.
- [6] D.P. Robinson, S.L. Klein, Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis, *Horm. Behav.* 62 (2012) 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>.
- [7] S.L. Klein, A. Hodgson, D.P. Robinson, Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis, *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012) 67–73. <https://doi.org/10.1189/jlb.0811427>.
- [8] D.K. Biswas, S. Singh, Q. Shi, A.B. Pardee, J.D. Iglehart, Crossroads of Estrogen Receptor and NF- κ B Signaling, *Sci. Signal.* 2005 (2005) pe27–pe27. <https://doi.org/10.1126/stke.2882005pe27>.
- [9] D. Furman, B.P. Hejblum, N. Simon, V. Jovic, C.L. Dekker, R. Thiebaut, R.J. Tibshirani, M.M. Davis, R. Thiébaut, R.J. Tibshirani, M.M. Davis, R. Thiébaut, R.J. Tibshirani, M.M. Davis, Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 869–874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321060111>.
- [10] M.C. Ysraelit, J. Correale, Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development, *Immunology.* 156 (2019) 9–22. <https://doi.org/10.1111/imm.13004>.
- [11] R.H. Straub, The complex role of estrogens in inflammation, *Endocr. Rev.* 28 (2007) 521–574. <https://doi.org/10.1210/ER.2007-0001>.
- [12] A. Abbas, A. Lichtman, S. Pillai, Cellular and Molecular Immunology 9th edition, (2016) 608. <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3> (приступљено 17. Новембар 2021.).
- [13] M.G. Torcia, L. Nencioni, A.M. Clemente, L. Civitelli, I. Celestino, D. Limongi, G. Fadigati, E. Perissi, F. Cozzolino, E. Garaci, A.T. Palamara, Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males, *PLoS One.* 7 (2012) e39853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039853>.
- [14] K. Asai, N. Hiki, Y. Mimura, T. Ogawa, K. Unou, M. Kaminishi, Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: Role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model, *Shock.* (2001). <https://doi.org/10.1097/00024382-200116050-00003>.

- [15] A. Bouman, M. Jan Heineman, M.M. Faas, Sex hormones and the immune response in humans, *Hum. Reprod. Update.* (2005). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi008>.
- [16] E.J. Molloy, A.J. O'Neill, J.J. Grantham, M. Sheridan-Pereira, J.M. Fitzpatrick, D.W. Webb, R.W.G. Watson, Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone, *Blood.* (2003). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0649>.
- [17] K.-H. Chuang, S. Altuwajri, G. Li, J.-J. Lai, C.-Y. Chu, K.-P. Lai, H.-Y. Lin, J.-W. Hsu, P. Keng, M.-C. Wu, C. Chang, Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor, *J. Exp. Med.* (2009). <https://doi.org/10.1084/jem.20082521>.
- [18] R.S. Scotland, M.J. Stables, S. Madalli, P. Watson, D.W. Gilroy, Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice, *Blood.* (2011). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340281>.
- [19] K. Li, W. Xu, Q. Guo, Z. Jiang, P. Wang, Y. Yue, S. Xiong, Differential Macrophage Polarization in Male and Female BALB/c Mice Infected With Coxsackievirus B3 Defines Susceptibility to Viral Myocarditis, *Circ. Res.* 105 (2009) 353–364. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.195230>.
- [20] M.R. Gubbels Bupp, Sex, the aging immune system, and chronic disease, *Cell. Immunol.* 294 (2015) 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2015.02.002>.
- [21] G. Pearse, Histopathology of the Thymus:, <http://dx.doi.org/10.1080/01926230600978458>. 34 (2016) 515–547. <https://doi.org/10.1080/01926230600978458>.
- [22] G. Leposavić, B. Karapetrović, S. Obradović, B.V. Danković, D. Kosec, Differential effects of gonadectomy on the thymocyte phenotypic profile in male and female rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1996) 269–276. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02165-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02165-5).
- [23] M. Abdullah, P.-S.S. Chai, M.-Y.Y. Chong, E.R.M. Tohit, R. Ramasamy, C.P. Pei, S. Vidyadaran, Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals, *Cell. Immunol.* 272 (2012) 214–219. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2011.10.009>.
- [24] B.-W. Lee, H.-K. Yap, F.-T. Chew, T.-C. Quah, K. Prabhakaran, G.S.H. Chan, S.-C. Wong, C.-C. Seah, Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: From birth to adulthood, *Cytometry.* 26 (1996) 8–15. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960315\)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960315)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E).
- [25] I.M. Lisse, P. Aaby, H. Whittle, H. Jensen, M. Engelmann, L.B. Christensen, T-lymphocyte subsets in West African children: Impact of age, sex, and season, *J. Pediatr.* 130 (1997) 77–85. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70313-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70313-5).
- [26] S.S. Uppal, S. Verma, P.S. Dhot, Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking, *Cytometry.* 52B (2003) 32–36. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.10011>.
- [27] S.L. Kleina, I. Marriott, E.N. Fish, S.L. Klein, I. Marriott, E.N. Fish, S.L. Kleina, I. Marriott, E.N. Fish, Sex-based differences in immune function and responses to vaccination, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109 (2014) 9–15. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru167>.
- [28] A. Hewagama, D. Patel, ... S.Y.-G. and, U. 2009, Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis, *nature.com.* (2009).

<https://www.nature.com/articles/gene200912> (приступљено 20. Јуни 2019.).

- [29] J. Giron-Gonzalez, F. Moral, ... J.E.-E. journal of, U. 2000, Consistent production of a higher TH1: TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women, *eje.bioscientifica.com*. 143 (2000) 31–36. <https://eje.bioscientifica.com/content/143/1/31.short> (приступљено 20. Јуни 2019.).
- [30] M. Zhang, D. Rego, ... M.M.-P. of the, U. 2012, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ regulate IFN γ and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way, *Natl. Acad. Sci.* (2012). <https://www.pnas.org/content/109/24/9505.short> (приступљено 20. Јуни 2019.).
- [31] M. Butterworth, B. McClellan, M.A.- Nature, undefined 1967, M. Aklansmith, Influence of Sex on Immunoglobulin Levels, *Nature*. 214 (1967) 1224–1225. <https://doi.org/10.1038/2141224a0>.
- [32] I.F. Cook, Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines, *Vaccine*. 26 (2008) 3551–3555. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.054>.
- [33] H. Fan, G. Dong, G. Zhao, F. Liu, G. Yao, ... Y.Z.-J. of immunology, U. 2014, Gender differences of B cell signature in healthy subjects underlie disparities in incidence and course of SLE related to estrogen, *hindawi.com*. (2014). <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/814598/abs/> (приступљено 20. Јуни 2019.).
- [34] S. Fischinger, C.M. Boudreau, A.L. Butler, H. Streeck, G. Alter, Sex differences in vaccine-induced humoral immunity, *Semin. Immunopathol.* 41 (2019) 239. <https://doi.org/10.1007/S00281-018-0726-5>.
- [35] A. Ruggieri, S. Anticoli, A. D’ambrosio, L. Giordani, M. Viora, The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination, *Ann Ist Super Sanità*. 52 (2016) 198–204. https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_11.
- [36] S.L. Klein, A. Jedlicka, A. Pekosz, The Xs and Y of immune responses to viral vaccines, *Lancet Infect. Dis.* 10 (2010) 338–349. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70049-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70049-9).
- [37] G.A. Poland, I.G. Ovsyannikova, R.M. Jacobson, Adversomics: The emerging field of vaccine adverse event immunogenetics, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28 (2009) 431–2. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181a6a511>.
- [38] B.J. Umlauf, I.H. Haralambieva, I.G. Ovsyannikova, R.B. Kennedy, V.S. Pankratz, R.M. Jacobson, G.A. Poland, Associations Between Demographic Variables and Multiple Measles-Specific Innate and Cell-Mediated Immune Responses After Measles Vaccination, *Viral Immunol.* 25 (2012) 29–36. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0051>.
- [39] X. Zhang, F.A. Castelli, X. Zhu, M. Wu, B. Maillère, L. BenMohamed, Gender-dependent HLA-DR-restricted epitopes identified from herpes simplex virus type 1 glycoprotein D, *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (2008) 1436–49. <https://doi.org/10.1128/CVI.00123-08>.
- [40] J. Smetana, R. Chlibek, J. Shaw, In fl uenza vaccination in the elderly, 14 (2018) 540–549.
- [41] J.K. Taubenberger, D.M. Morens, The Patology of Influenza Infections, *Annu Rev Pathol.* 3 (2008) 499–522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- [42] J.S. Tregoning, R.F. Russell, E. Kinnear, Human Vaccines & Immunotherapeutics Adjuvanted influenza vaccines Adjuvanted influenza vaccines, (2018).

<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1415684>.

- [43] N.M. Bouvier, P. Palese, The biology of influenza viruses, *Vaccine*. 26 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>.
- [44] S.-S. Wong, R.J. Webby, Traditional and New Influenza Vaccines, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 476–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>.
- [45] H. Kim, R.G. Webster, R.J. Webby, Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen, *Viral Immunol.* 31 (2018) 174–183. <https://doi.org/10.1089/VIM.2017.0141/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>.
- [46] S.M. Kang, D.G. Yoo, A.S. Lipatov, J.M. Song, C.T. Davis, F.S. Quan, L.M. Chen, R.O. Donis, R.W. Compans, Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles, *PLoS One*. 4 (2009) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004667>.
- [47] R. Chen, E.C. Holmes, Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics, *Mol. Biol. Evol.* 23 (2006) 2336–2341. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl102>.
- [48] C. Hannoun, The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines, *Expert Rev. Vaccines*. 12 (2013) 1085–1094. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.824709>.
- [49] P. Zimmermann, N. Curtis, Factors that influence the immune response to vaccination, *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (2019). <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
- [50] S. Dhakal, S.L. Klein, Host Factors Impact Vaccine Efficacy: Implications for Seasonal and Universal Influenza Vaccine Programs, *J. Virol.* 93 (2019). <https://doi.org/10.1128/JVI.00797-19>.
- [51] Types of seasonal influenza vaccine, (2019). <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/vaccination/types-of-seasonal-influenza-vaccine> (приступљено 20. Јуни 2019.).
- [52] J. Chen, J. Wang, J. Zhang, H. Ly, Advances in Development and Application of Influenza Vaccines, *Front. Immunol.* 12 (2021) 2740. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.711997/BIBTEX>.
- [53] P. Soema, R. Kompier, ... J.A.-E.J. of, U. 2015, Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies, *Elsevier*. 94 (2015) 251–263. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115002556> (приступљено 21. Јуни 2019.).
- [54] S.L. Klein, A. Pekosz, Sex-based Biology and the Rational Design of Influenza Vaccination Strategies, *J. Infect. Dis.* 209 (2014) S114–S119. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu066>.
- [55] L. Denly, The effect of sex on responses to influenza vaccines, <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1830685>. 17 (2020) 1396–1402. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1830685>.
- [56] B. Pulendran, R. Ahmed, Immunological mechanisms of vaccination, (2011). <https://doi.org/10.1038/ni.2039>.
- [57] J.B. Wing, M. Tekgüç, S. Sakaguchi, Control of Germinal Center Responses by T-Follicular Regulatory Cells, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1910. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01910>.

- [58] M. Stebegg, S.D. Kumar, A. Silva-Cayetano, V.R. Fonseca, M.A. Linterman, L. Graca, Regulation of the germinal center response, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>.
- [59] U. Klein, R. Dalla-Favera, Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 22–33. <https://doi.org/10.1038/nri2217>.
- [60] K. Miyauchi, Y. Adachi, K. Tonouchi, T. Yajima, Y. Harada, H. Fukuyama, S. Deno, Y. Iwakura, A. Yoshimura, H. Hasegawa, K. Yugi, S. ichiro Fujii, O. Ohara, Y. Takahashi, M. Kubo, Influenza virus infection expands the breadth of antibody responses through IL-4 signalling in B cells, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24090-z>.
- [61] A. Solomon, D.T. Weiss, Structural and Functional Properties of Human-Light-Chain Variable-Region Subgroups, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2 (1995) 387–394.
- [62] T.T. Wang, S. Bournazos, J. V. Ravetch, Immunological responses to influenza vaccination: lessons for improving vaccine efficacy, *Curr. Opin. Immunol.* 53 (2018) 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.026>.
- [63] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispens, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions., *Front. Immunol.* 5 (2014) 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
- [64] E.S. Balkovic, J.A. Florack, H.R. Six, Immunoglobulin G subclass antibody responses of mice to influenza virus antigens given in different forms, *Antiviral Res.* 8 (1987) 151–160.
- [65] V.C. Huber, R.M. McKeon, M.N. Brackin, L.A. Miller, R. Keating, S.A. Brown, N. Makarova, D.R. Perez, G.H. MacDonald, J.A. McCullers, Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (2006) 981–990. <https://doi.org/10.1128/CVI.00156-06>.
- [66] A.O. Hovden, R.J. Cox, L.R. Haaheim, Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice, *Scand. J. Immunol.* 62 (2005) 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01633.x>.
- [67] G.G.B. Klaus, M.B. Pepys, K. Kitajima, B.A. Askonas, Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody, *Immunology.* 38 (1979) 687–695. [/pmc/articles/PMC1457877/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1457877/) (приступљено 08. Април 2021.).
- [68] C.H. Heusser, C.L. Anderson, H.M. Grey, Receptors for IgG: Subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line*, *J. Exp. Med.* 145 (1977) 1316–1327. <https://doi.org/10.1084/jem.145.5.1316>.
- [69] T.J. Kipps, P. Parham, J. Punt, L.A. Herzenberg, Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.* 161 (1985) 1–17. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.1>.
- [70] J. Choi, H. Diao, C.E. Faliti, J. Truong, M. Rossi, S. Bélanger, B. Yu, A.W. Goldrath, M.E. Pipkin, S. Crotty, Bcl-6 is the nexus transcription factor of T follicular helper cells via repressor-of-repressor circuits, *Nat. Immunol.* 21 (2020) 777–789. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0706-5>.

- [71] S. Crotty, T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease, *Immunity*. 41 (2014) 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>.
- [72] M.A. Linterman, D.L. Hill, Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy?, *F1000Research*. 5 (2016). <https://doi.org/10.12688/f1000research.7388.1>.
- [73] H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, Y. Usui, N. Harada, T. Yamazaki, J. Ma, K. Tezuka, H. Yagita, K. Okumura, The Role of ICOS in the CXCR5⁺ Follicular B Helper T Cell Maintenance In Vivo, *J. Immunol.* 175 (2005) 2340–2348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2340>.
- [74] R. Elgueta, M.J. Benson, V.C. De Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, R.J. Noelle, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 152–172. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>.
- [75] R. Goenka, L.G. Barnett, J.S. Silver, P.J. O’Neill, C.A. Hunter, M.P. Cancro, T.M. Laufer, Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation, *J. Immunol.* 187 (2011) 1091–1095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100853>.
- [76] P.T. Sage, C.L. Tan, G.J. Freeman, M. Haigis, A.H. Sharpe, Defective TFH Cell Function and Increased TFR Cells Contribute to Defective Antibody Production in Aging, *Cell Rep.* 12 (2015) 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.015>.
- [77] J.K. Krishnaswamy, S. Alsén, U. Yrlid, S.C. Eisenbarth, A. Williams, Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2169. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02169/BIBTEX>.
- [78] J.K. Krishnaswamy, U. Gowthaman, B. Zhang, J. Mattsson, L. Szeponik, D. Liu, R. Wu, T. White, S. Calabro, L. Xu, M.A. Collet, M. Yurieva, S. Alsén, P. Fogelstrand, A. Walter, W.R. Heath, S.N. Mueller, U. Yrlid, A. Williams, S.C. Eisenbarth, Migratory CD11b⁺ conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses, *Sci. Immunol.* 2 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9169>.
- [79] Y.S. Choi, R. Kageyama, D. Eto, T.C. Escobar, R.J. Johnston, L. Monticelli, C. Lao, S. Crotty, ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6, *Immunity*. 34 (2011) 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.023>.
- [80] S. Crotty, Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}), *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011) 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>.
- [81] I. Yusuf, R. Kageyama, L. Monticelli, R.J. Johnston, D. DiToro, K. Hansen, B. Barnett, S. Crotty, Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150), *J. Immunol.* 185 (2010) 190–202. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903505>.
- [82] R.I. Nurieva, Y. Chung, Understanding the development and function of T follicular helper cells, *Cell. Mol. Immunol.* 7 (2010) 190–197. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.24>.
- [83] H. Ueno, Tfh cell response in influenza vaccines in humans: What is visible and what is invisible, (без датыма). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.02.007>.
- [84] J.J.S. Lefebvre, A.R.A. Masters, J.J.W. Hopkins, L. Haynes, L.H.-S. reports, undefined 2016, Age-related impairment of humoral response to influenza is associated with changes in antigen specific T follicular helper cell responses, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25051.

<https://doi.org/10.1038/srep25051>.

- [85] D. Frasca, A. Diaz, M. Romero, A.M. Landin, B.B. Blomberg, Age effects on B cells and humoral immunity in humans, *Ageing Res. Rev.* 10 (2011) 330. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2010.08.004>.
- [86] L. Rocamora-Reverte, F. Leonard Melzer, R. Würzner, B. Weinberger, The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging, (без датума). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.616949>.
- [87] K.H.G. Mills, Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection?, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 841–855. <https://doi.org/10.1038/nri1485>.
- [88] M.M. Xie, A.L. Dent, Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center, *Front. Immunol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01536>.
- [89] T. Ding, H. Niu, X. Zhao, C. Gao, X. Li, C. Wang, T-Follicular Regulatory Cells: Potential Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2709. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02709/BIBTEX>.
- [90] J.B. Wing, Y. Kitagawa, M. Locci, H. Hume, C. Tay, T. Morita, Y. Kidani, K. Matsuda, T. Inoue, T. Kurosaki, S. Crotty, C. Coban, N. Ohkura, S. Sakaguchi, A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E6400–E6409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705551114>.
- [91] J.J. O’Shea, M. Gadina, R.M. Siegel, *Cytokines and Cytokine Receptors*, y: Clin. Immunol., Elsevier, 2019: crp. 127-155.e1. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6896-6.00009-0>.
- [92] Y. Ding, J. Li, P.A. Yang, B. Luo, Q. Wu, A.J. Zajac, O. Wildner, H.C. Hsu, J.D. Mountz, Interleukin-21 promotes germinal center reaction by skewing the follicular regulatory T cell to follicular helper T cell balance in autoimmune BXD2 mice, *Arthritis Rheumatol.* 66 (2014) 2601–2612. <https://doi.org/10.1002/art.38735>.
- [93] A.R. Maceiras, V.R. Fonseca, A. Agua-Doce, L. Graca, T follicular regulatory cells in mice and men, *Immunology.* 152 (2017) 25–35. <https://doi.org/10.1111/imm.12774>.
- [94] M.A.U. Rasheed, D.R. Latner, R.D. Aubert, T. Gourley, R. Spolski, C.W. Davis, W.A. Langley, S.-J. Ha, L. Ye, S. Sarkar, V. Kalia, B.T. Konieczny, W.J. Leonard, R. Ahmed, Interleukin-21 Is a Critical Cytokine for the Generation of Virus-Specific Long-Lived Plasma Cells, *J. Virol.* 87 (2013) 7737–7746. <https://doi.org/10.1128/jvi.00063-13>.
- [95] W.E. Beyer, A.M. Palache, R. Kerstens, N. Masurel, Gender differences in local and systemic reactions to inactivated influenza vaccine, established by a meta-analysis of fourteen independent studies., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (1996) 65–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641306> (приступљено 16. Август 2019.).
- [96] R.J.M. Engler, M.R. Nelson, M.M. Klote, M.J. VanRaden, C.Y. Huang, N.J. Cox, A. Klimov, W.A. Keitel, K.L. Nichol, W.W. Carr, J.J. Treanor, Half- vs Full-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine (2004-2005): Age, Dose, and Sex Effects on Immune Responses, *Arch. Intern. Med.* 168 (2008) 2405–2414. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTERNMED.2008.513>.
- [97] S.S.A. Plotkin, Immunologic correlates of protection induced by vaccination, *Pediatr. Infect. Dis.* 20 (2001) 63–75. <https://doi.org/10.1097/00006454-200101000-00013>.

- [98] R.J.M. Engler, M.R. Nelson, M.M. Klote, M.J. VanRaden, C.-Y. Huang, N.J. Cox, A. Klimov, W.A. Keitel, K.L. Nichol, W.W. Carr, J.J. Treanor, Walter Reed Health Care System Influenza Vaccine Consortium, Half- vs Full-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine (2004-2005), *Arch. Intern. Med.* 168 (2008) 2405. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.513>.
- [99] R. Booy, G. Khandaker, L.G. Heron, J. Yin, B. Doyle, K.K. Tudo, L. Hueston, G.L. Gilbert, C.R. MacIntyre, D.E. Dwyer, Cross-reacting antibodies against the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in older Australians, *Med. J. Aust.* 194 (2011) 19–23. <https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.2011.TB04139.X>.
- [100] M.E. Lorenzo, A. Hodgson, D.P. Robinson, J.B. Kaplan, A. Pekosz, S.L. Klein, Antibody responses and cross protection against lethal influenza A viruses differ between the sexes in C57BL/6 mice, *Vaccine.* 29 (2011) 9246–9255. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.110>.
- [101] P.T. Sage, A.H. Sharpe, T follicular regulatory cells., *Immunol. Rev.* 271 (2016) 246–59. <https://doi.org/10.1111/imr.12411>.
- [102] A.L. Fink, K. Engle, R.L. Ursin, W.Y. Tang, S.L. Klein, Biological sex affects vaccine efficacy and protection against influenza in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 12477–12482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805268115>.
- [103] J.E. McElhaney, Influenza vaccine responses in older adults, *Ageing Res. Rev.* 10 (2011) 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.10.008>.
- [104] D. Kostova, C. Reed, L. Finelli, P.-Y. Cheng, P.M. Gargiullo, D.K. Shay, J.A. Singleton, M.I. Meltzer, P. Lu, J.S. Bresee, Influenza Illness and Hospitalizations Averted by Influenza Vaccination in the United States, 2005–2011, *PLoS One.* 8 (2013) e66312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066312>.
- [105] C.A. DiazGranados, A.J. Dunning, M. Kimmel, D. Kirby, J. Treanor, A. Collins, R. Pollak, J. Christoff, J. Earl, V. Landolfi, E. Martin, S. Gurunathan, R. Nathan, D.P. Greenberg, N.G. Tornieporth, M.D. Decker, H.K. Talbot, Efficacy of High-Dose versus Standard-Dose Influenza Vaccine in Older Adults, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 635–645. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1315727>.
- [106] P.D.D. of E. and S.A. United Nations, World Aging Population 2017, 2017. <https://doi.org/10.1049/el:20000788>.
- [107] C.R. Gomez, E.D. Boehmer, E.J. Kovacs, The aging innate immune system, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 457–462. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2005.07.013>.
- [108] T.P. Plackett, E.D. Boehmer, D.E. Faunce, E.J. Kovacs, Aging and innate immune cells, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 291–299. <https://doi.org/10.1189/jlb.1103592>.
- [109] A.K. Schröder, L. Rink, Neutrophil immunity of the elderly, *Mech. Ageing Dev.* 124 (2003) 419–425. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(03\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(03)00017-4).
- [110] J. Plowden, M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman, J. Katz, S. Sambhara, Innate immunity in aging: impact on macrophage function, *Aging Cell.* 3 (2004) 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x>.
- [111] E. Mocchegiani, M. Malavolta, NK and NKT cell functions in immunosenescence, *Aging Cell.* 3 (2004) 177–184. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00107.x>.

- [112] A.C. Shaw, Effects of Aging on Human Toll-Like Receptor Function, y: *Handb. Immunosenescence*, Springer International Publishing, 2019: стр. 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1_98-1.
- [113] C.P. Wong, K.R. Magnusson, E. Ho, Increased inflammatory response in aged mice is associated with age-related zinc deficiency and zinc transporter dysregulation, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2012.07.005>.
- [114] J.E. McElhaney, G.A. Kuchel, X. Zhou, S.L. Swain, L. Haynes, T-cell immunity to influenza in older adults: A pathophysiological framework for development of more effective vaccines, *Front. Immunol.* 7 (2016) 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00041>.
- [115] S. Vasto, G. Candore, C.R. Balistreri, M. Caruso, G. Colonna-Romano, M.P. Grimaldi, F. Listi, D. Nuzzo, D. Lio, C. Caruso, Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity, *Mech. Ageing Dev.* 128 (2007) 83–91. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2006.11.015>.
- [116] M.E. Bauer, M. De la Fuente, The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence, *Mech. Ageing Dev.* 158 (2016) 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.01.001>.
- [117] E. Biagi, M. Candela, S. Fairweather-Tait, C. Franceschi, P. Brigidi, Ageing of the human metaorganism: The microbial counterpart, *Age (Omaha)*. 34 (2012) 247–267. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9217-5>.
- [118] C. Franceschi, P. Garagnani, G. Vitale, M. Capri, S. Salvioli, Inflammaging and ‘Garb-aging’, *Trends Endocrinol. Metab.* 28 (2017) 199–212. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2016.09.005>.
- [119] F. Sanada, Y. Taniyama, J. Muratsu, R. Otsu, H. Shimizu, H. Rakugi, R. Morishita, Source of Chronic inflammation in Aging, 5 (2018) 12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>.
- [120] T. Fulop, J.M. Witkowski, F. Olivieri, A. Larbi, The integration of inflammaging in age-related diseases, *Semin. Immunol.* 40 (2018) 17–35. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2018.09.003>.
- [121] B. Pereira, X.-N. Xu, A.N. Akbar, Targeting Inflammation and Immunosenescence to Improve Vaccine Responses in the Elderly, (без датума). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583019>.
- [122] J. Nikolich-Žugich, The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article, *Nat. Immunol.* 19 (2018) 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x>.
- [123] D. Allman, J.P. Miller, B cell development and receptor diversity during aging, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 463–467. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.002>.
- [124] H. Min, E. Montecino-Rodriguez, K. Dorshkind, Effects of aging on early B- and T-cell development, *Immunol. Rev.* 205 (2005) 7–17. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00263.x>.
- [125] G.H. Kline, T.A. Hayden, N.R. Klinman, B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation., *J. Immunol.* 162 (1999) 3342–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092788> (приступљено 28. Август 2019.).
- [126] M.P. Cancro, S.H. Smith, Peripheral B Cell Selection and Homeostasis, *Immunol. Res.* 27

(2003) 141–148. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:141>.

- [127] R.L. Whisler, I.S. Grants, Age-related alterations in the activation and expression of phosphotyrosine kinases and protein kinase C (PKC) among human B cells., *Mech. Ageing Dev.* 71 (1993) 31–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8309282> (приступљено 28. Август 2019.).
- [128] V. Souvannavong, C. Lemaire, K. Andréau, S. Brown, A. Adam, Age-associated modulation of apoptosis and activation in murine B lymphocytes., *Mech. Ageing Dev.* 103 (1998) 285–299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9723904> (приступљено 28. Август 2019.).
- [129] R.L. Yung, CHANGES IN IMMUNE FUNCTION WITH AGE, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 26 (2000) 455–473. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(05\)70151-4](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70151-4).
- [130] X. Yang, J. Stedra, J. Cerny, Relative contribution of T and B cells to hypermutation and selection of the antibody repertoire in germinal centers of aged mice, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 959–970. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.959>.
- [131] L. Lazuardi, B. Jenewein, A.M. Wolf, G. Pfister, A. Tzankov, B. Grubeck-Loebenstein, Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes., *Immunology.* 114 (2005) 37–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02006.x>.
- [132] L. Haynes, A.C. Maue, Effects of aging on T cell function., *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2009) 414–417. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.009>.
- [133] D. Aw, A.B. Silva, D.B. Palmer, Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population., *Immunology.* 120 (2007) 435–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x>.
- [134] S. Han, K. Yang, Z. Ozen, W. Peng, E. Marinova, G. Kelsoe, B. Zheng, Enhanced Differentiation of Splenic Plasma Cells but Diminished Long-Lived High-Affinity Bone Marrow Plasma Cells in Aged Mice, *J. Immunol.* 170 (2003) 1267–1273. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1267>.
- [135] X. Yu, T. Tsibane, P.A. McGraw, F.S. House, C.J. Keefer, M.D. Hicar, T.M. Tumpey, C. Pappas, L.A. Perrone, O. Martinez, J. Stevens, I.A. Wilson, P. V. Aguilar, E.L. Altschuler, C.F. Basler, J.E.C. Jr, Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors, *Nature.* 455 (2008) 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature07231>.
- [136] L. Haynes, S.M. Eaton, E.M. Burns, T.D. Randall, S.L. Swain, CD4 T cell memory derived from young naïve cells functions well into old age, but memory generated from aged naïve cells functions poorly, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 15053–15058. <https://doi.org/10.1073/pnas.2433717100>.
- [137] S. Merani, G. Pawelec, G.A. Kuchel, J.E. McElhaney, Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection, *Front. Immunol.* 8 (2017) 784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00784>.
- [138] T. Potluri, A.L. Fink, K.E. Sylvia, S. Dhakal, M.S. Vermillion, L. vom Steeg, S. Deshpande, H. Narasimhan, S.L. Klein, Age-associated changes in the impact of sex steroids on influenza vaccine responses in males and females, *npj Vaccines.* 4 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0124-6>.
- [139] G.G. STEINMANN, B. KLAUS, H.-K. MULLER-HERMELINK, The Involution of the

- Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty., *Scand. J. Immunol.* 22 (1985) 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01916.x>.
- [140] J.J. Goronzy, C.M. Weyand, T cell development and receptor diversity during aging, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.020>.
- [141] G. Pfister, D. Weiskopf, L. Lazard, R.D. Kovaiov, D.P. Cioca, M. Keller, B. Lorbeg, W. Parson, B. Grubeck-Loebenstein, Naive T Cells in the Elderly: Are They Still There?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067 (2006) 152–157. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.018>.
- [142] S. Kohler, U. Wagner, M. Pierer, S. Kimmig, B. Oppmann, B. Möwes, K. Jülke, C. Romagnani, A. Thiel, Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 1987–1994. <https://doi.org/10.1002/eji.200526181>.
- [143] A.N. Vallejo, CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence, *Immunol. Rev.* 205 (2005) 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00256.x>.
- [144] A. Jagger, Y. Shimojima, J.J. Goronzy, C.M. Weyand, Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review., *Gerontology.* 60 (2014) 130–137. <https://doi.org/10.1159/000355303>.
- [145] B. Posteraro, R. Pastorino, P. Di Giannantonio, C. Ianuale, R. Amore, W. Ricciardi, S. Boccia, The link between genetic variation and variability in vaccine responses: Systematic review and meta-analyses, *Vaccine.* 32 (2014) 1661–1669. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2014.01.057>.
- [146] J.E. Linnik, A. Egli, Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response, *Hum. Vaccin. Immunother.* 12 (2016) 907–915. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1119345>.
- [147] G.A. Poland, I.G. Ovsyannikova, R.M. Jacobson, D.I. Smith, Heterogeneity in Vaccine Immune Response: The Role of Immunogenetics and the Emerging Field of Vaccinomics, *Clin. Pharmacol. Ther.* 82 (2007) 653–664. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100415>.
- [148] M.R. Castrucci, Factors affecting immune responses to the influenza vaccine, *Hum. Vaccin. Immunother.* 14 (2018) 637–646. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1338547>.
- [149] K.L. Bucasas, L.M. Franco, C.A. Shaw, M.S. Bray, J.M. Wells, D. Niño, N. Arden, J.M. Quarles, R.B. Couch, J.W. Belmont, Early patterns of gene expression correlate with the humoral immune response to influenza vaccination in humans, *J. Infect. Dis.* 203 (2011) 921–929. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq156>.
- [150] L.M. Pennell, C.L. Galligan, E.N. Fish, Sex affects immunity, *J. Autoimmun.* 38 (2012) J282–J291. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.013>.
- [151] L.K. Case, L. Toussaint, M. Moussawi, B. Roberts, N. Saligrama, L. Brossay, S.A. Huber, C. Teuscher, Chromosome Y Regulates Survival Following Murine Coxsackievirus B3 Infection, *G3: Genes|Genomes|Genetics.* 2 (2012) 115–121. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001610>.
- [152] R.S. Sellers, C.B. Clifford, P.M. Treuting, C. Brayton, Immunological Variation Between Inbred Laboratory Mouse Strains, *Vet. Pathol.* 49 (2012) 32–43. <https://doi.org/10.1177/0300985811429314>.

- [153] H. Asanuma, K. Hirokawa, M. Uchiyama, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, T. Sata, S. ichi Tamura, Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine, *Vaccine*. 19 (2001) 3981–3989. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00129-3).
- [154] W. H., N. K., I. T., T. K., M. A., Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains, *Shock*. 22 (2004) 460–466.
- [155] R.M. Martin, J.L. Brady, A.M. Lew, The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice, *J. Immunol. Methods*. 212 (1998) 187–192. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00015-5).
- [156] F.L. Gross, Y. Bai, S. Jefferson, C. Holiday, M.Z. Levine, Measuring Influenza Neutralizing Antibody Responses to A(H3N2) Viruses in Human Sera by Microneutralization Assays Using MDCK-SIAT1 Cells, *J. Vis. Exp.* (2017) 56448. <https://doi.org/10.3791/56448>.
- [157] K.M. McKinnon, Flow Cytometry: An Overview, *Curr. Protoc. Immunol.* 120 (2018) 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>.
- [158] K.L. Flanagan, A.L. Fink, M. Plebanski, S.L. Klein, Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060718>. 33 (2017) 577–599. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100616-060718>.
- [159] A.H. Tuttle, V.M. Philip, E.J. Chesler, J.S. Mogil, Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice, *Nat. Methods*. 15 (2018) 994–996. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0224-7>.
- [160] A. Domnich, I. Manini, D. Panatto, G.E. Calabrò, E. Montomoli, Immunogenicity Measures of Influenza Vaccines: A Study of 1164 Registered Clinical Trials, *Vaccines*. 8 (2020) 325. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8020325>.
- [161] A. Mosterín Höpping, J. McElhaney, J.M. Fonville, D.C. Powers, W.E.P. Beyer, D.J. Smith, The confounded effects of age and exposure history in response to influenza vaccination, *Vaccine*. 34 (2016) 540–546. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.11.058>.
- [162] A. Reber, J. Katz, Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection, 12 (2013) 519–536. <https://doi.org/10.1586/erv.13.35.Immunological>.
- [163] C.P. Verschoor, P. Singh, M.L. Russell, D.M.E. Bowdish, A. Brewer, L. Cyr, B.J. Ward, M. Loeb, Microneutralization assay titres correlate with protection against seasonal influenza H1N1 and H3N2 in children, *PLoS One*. 10 (2015) e0131531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131531>.
- [164] J.J. Smucny, E.P. Kelly, P.O. Macarthy, A.D. King, Murine immunoglobulin G subclass responses following immunization with live Dengue virus or a recombinant dengue envelope protein, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53 (1995) 432–437. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.432>.
- [165] B. Hjertner, T. Bengtsson, B. Morein, S. Paulie, C. Fossum, A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine, *Vaccine*. 36 (2018) 3340–3344. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.054>.

- [166] D.A.G. Skibinski, B.J. Hanson, Y. Lin, V. Von Messling, A. Jegerlehner, Enhanced Neutralizing Antibody Titers and Th1 Polarization from a Novel Escherichia coli Derived Pandemic Influenza Vaccine, *PLoS One*. 8 (2013) 76571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076571>.
- [167] D. Marshall, R. Sealy, M. Sangster, C. Coleclough, TH Cells Primed During Influenza Virus Infection Provide Help for Qualitatively Distinct Antibody Responses to Subsequent Immunization, *J. Immunol.* 163 (1999) 4673–4682. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.163.9.4673>.
- [168] A. Sabbaghi, M. Zargar, M.R. Zolfaghari, F. Motamedi-Sedeh, A. Ghaemi, Protective cellular and mucosal immune responses following nasal administration of a whole gamma-irradiated influenza A (subtype H1N1) vaccine adjuvanted with interleukin-28B in a mouse model, *Arch. Virol.* 166 (2021) 545–557. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04900-3>.
- [169] S. Hauge, A. Madhun, R.J. Cox, L.R. Haaheim, Quality and kinetics of the antibody response in mice after three different low-dose influenza virus vaccination strategies, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (2007) 978–983. <https://doi.org/10.1128/CVI.00033-07/ASSET/05BFB5A2-9E0F-40B9-B262-4A898789B0BB/ASSETS/GRAPHIC/ZCD0080730280003.JPEG>.
- [170] X. Chen, G.J.P. Fernando, A.P. Raphael, S.R. Yukiko, E.J. Fairmaid, C.A. Primiero, I.H. Frazer, L.E. Brown, M.A.F. Kendall, Rapid kinetics to peak serum antibodies is achieved following influenza vaccination by dry-coated densely packed microprojections to skin, *J. Control. Release.* 158 (2012) 78–84. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2011.10.026>.
- [171] D. Yadav, G.K. Khuller, Evaluation of the T cells and costimulatory molecules in the protective efficacy of 30 kDa secretory protein against experimental tuberculosis, *Immunol. Cell Biol.* 79 (2001) 207–212. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.00998.x>.
- [172] J.D. Gorham, M.L. Güler, R.G. Steen, A.J. Mackey, M.J. Daly, K. Frederick, W.F. Dietrich, K.M. Murphy, Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 12467–12472. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12467>.
- [173] J. Yagi, Y. Arimura, H. Takatori, H. Nakajima, I. Iwamoto, T. Uchiyama, Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells, *Int. Immunol.* 18 (2006) 1681–1690. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXL102>.
- [174] G. V. Trunova, O. V. Makarova, M.E. Diatroptov, I.M. Bogdanova, L.P. Mikchailova, S.O. Abdulaeva, Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57Bl/6 mice, *Bull. Exp. Biol. Med.* 151 (2011) 99–102. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1268-1>.
- [175] J. Linnik, M. Syedbasha, Y. Hollenstein, J. Halter, A. Egli, J. Stelling, Model-based inference of neutralizing antibody avidities against influenza virus, *bioRxiv.* (2021) 2020.10.05.326215. <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326215>.
- [176] D. Baumjohann, S. Preite, A. Reboldi, F. Ronchi, K.M. Ansel, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype, *Immunity.* 38 (2013) 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.020>.

- [177] H. Hao, S. Nakayamada, Y. Tanaka, Differentiation, functions, and roles of T follicular regulatory cells in autoimmune diseases, *Inflamm. Regen.* 41 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41232-021-00164-9>.
- [178] J.D. Pagan, H. Vlamakis, A. Gaca, R. Xavier, R.M. Anthony, Functional modulation of T follicular cells in vivo enhances antigen-specific humoral immunity, *bioRxiv.* (2020) 2020.11.17.387100. <https://doi.org/10.1101/2020.11.17.387100>.
- [179] Y. Gong, J. Tong, S. Wang, Are follicular regulatory T cells involved in autoimmune diseases?, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1790. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01790>.
- [180] P.T. Sage, A.H. Sharpe, T follicular regulatory cells, *Immunol. Rev.* 271 (2016) 246–259. <https://doi.org/10.1111/imr.12411>.
- [181] M. Auladell, X. Jia, L. Hensen, B. Chua, A. Fox, T.H.O. Nguyen, P.C. Doherty, K. Kedzierska, Recalling the future: Immunological memory toward unpredictable influenza viruses, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01400>.
- [182] A. Pizzolla, T.H.O. Nguyen, S. Sant, J. Jaffar, T. Loudovaris, S.I. Mannering, P.G. Thomas, G.P. Westall, K. Kedzierska, L.M. Wakim, Influenza-specific lung-resident memory t cells are proliferative and polyfunctional and maintain diverse TCR profiles, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 721–733. <https://doi.org/10.1172/JCI96957>.
- [183] E.E. Waffarn, N. Baumgarth, Protective B Cell Responses to Flu—No Fluke!, *J. Immunol.* 186 (2011) 3823–3829. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002090>.
- [184] S. Crotty, Follicular Helper CD4 T Cells (TFH), *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011) 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>.
- [185] Y. Tian, A.J. Zajac, IL-21 and T cell differentiation: consider the context HHS Public Access, *Trends Immunol.* 37 (2016) 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.001>.
- [186] D.S. Mehta, A.L. Wurster, M.J. Grusby, Biology of IL-21 and the IL-21 receptor, *Immunol. Rev.* 202 (2004) 84–95. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00201.x>.
- [187] L. Moens, S.G. Tangye, K. Warnatz, Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage, (2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00065>.
- [188] M.J. Hocart, J.S. Mackenzie, G.A. Stewart, The immunoglobulin G subclass responses of mice to influenza A virus: the effect of mouse strain, and the neutralizing abilities of individual protein A-purified subclass antibodies, *J. Gen. Virol.* 70 (1989) 2439–2448. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-9-2439>.
- [189] A. Shanko, M. Shuklina, A. Kovaleva, Y. Zabrodskaya, I. Vidyaeva, A. Shaldzhyan, A. Fadeev, A. Korotkov, M. Zaitceva, L. Stepanova, L. Tsybalova, L. Kordyukova, A. Katlinski, Comparative immunological study in mice of inactivated influenza vaccines used in the Russian immunization program, *Vaccines.* 8 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040756>.
- [190] S. Nazeri, S. Zakeri, A.A. Mehrizi, S. Sardari, N.D. Djadid, Measuring of IgG2c isotype instead of IgG2a in immunized C57BL/6 mice with *Plasmodium vivax* TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 versus Th2 immune response, *Exp. Parasitol.* 216 (2020) 107944. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107944>.
- [191] C. Kaplan, J.C. Valdez, R. Chandrasekaran, H. Eibel, K. Mikecz, T.T. Glant, A. Finnegan, Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis,

Parasite Immunol. 16 (1994) 521–527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00306.x>.

- [192] K.L. Good-Jacobson, M.J. Shlomchik, Plasticity and Heterogeneity in the Generation of Memory B Cells and Long-Lived Plasma Cells: The Influence of Germinal Center Interactions and Dynamics, *J. Immunol.* 185 (2010) 3117–3125. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001155>.
- [193] D. Furman, B.P. Hejblum, N. Simon, V. Jovic, C.L. Dekker, R. Thiebaut, R.J. Tibshirani, M.M. Davis, Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 869–874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321060111>.
- [194] J.C. Unkeless, H.N. Eisen, Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages, *J. Exp. Med.* 142 (1975) 1520–1533. <https://doi.org/10.1084/jem.142.6.1520>.
- [195] V.C. Huber, J.M. Lynch, D.J. Bucher, J. Le, D.W. Metzger, Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Makes a Significant Contribution to Clearance of Influenza Virus Infections, *J. Immunol.* 166 (2001) 7381–7388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7381>.
- [196] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Immunology: Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding, *Science* (80-.). 310 (2005) 1510–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1118948>.
- [197] T.L. Stevens, A. Bossie, V.M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R.L. Coffman, T.R. Mosmann, E.S. Vitetta, Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells, *Nature.* 334 (1988) 255–258. <https://doi.org/10.1038/334255a0>.
- [198] S. Winkler, M. Willheim, K. Baier, D. Schmid, A. Aichelburg, W. Graninger, P.G. Kremsner, Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria, *Infect. Immun.* 66 (1998) 6040–6044. <https://doi.org/10.1128/iai.66.12.6040-6044.1998>.
- [199] F. Geeraedts, N. Goutagny, V. Hornung, M. Severa, A. de Haan, J. Pool, J. Wilschut, K.A. Fitzgerald, A. Huckriede, Superior Immunogenicity of Inactivated Whole Virus H5N1 Influenza Vaccine is Primarily Controlled by Toll-like Receptor Signalling, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000138. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000138>.
- [200] N. Hagensars, E. Mastrobattista, H. Glansbeek, J. Heldens, H. van den Bosch, V. Schijns, D. Betbeder, H. Vromans, W. Jiskoot, Head-to-head comparison of four nonadjuvanted inactivated cell culture-derived influenza vaccines: Effect of composition, spatial organization and immunization route on the immunogenicity in a murine challenge model, *Vaccine.* 26 (2008) 6555–6563. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.057>.
- [201] R.J. Cox, A.O. Hovden, K.A. Brokstad, E. Szyszko, A.S. Madhun, L.R. Haaheim, The humoral immune response and protective efficacy of vaccination with inactivated split and whole influenza virus vaccines in BALB/c mice, *Vaccine.* 24 (2006) 6585–6587. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.040>.
- [202] Y. Hofmeister, C.B. Planitzer, M.R. Farcet, W. Teschner, H.A. Butterweck, A. Weber, G.W. Holzer, T.R. Kreil, Human IgG Subclasses: In Vitro Neutralization of and In Vivo Protection against West Nile Virus , *J. Virol.* 85 (2011) 1896–1899. <https://doi.org/10.1128/JVI.02155-10>.

- [203] M.J. Hocart, J.S. Mackenzie, G.A. Stewart, The IgG subclass responses induced by wild-type, cold-adapted and purified haemagglutinin from influenza virus A/Queensland/6/72 in CBA/CaH mice, *J. Gen. Virol.* 69 (1988) 1873–1882. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1873>.
- [204] S.S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis E Sousa, Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA, *Science* (80-.). 303 (2004) 1529–1531. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1093616/SUPPL_FILE/DIEBOLD.SOM.PDF.
- [205] M. Colonna, G. Trinchieri, Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1219–1226. <https://doi.org/10.1038/ni1141>.
- [206] G. Jego, A.K. Palucka, J.P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, J. Banchereau, Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6, *Immunity.* 19 (2003) 225–234. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00208-5).
- [207] A.K. Heer, A. Shamshiev, A. Donda, S. Akira, M. Kopf, J. Benjamin, A.K. Heer, A. Shamshiev, A. Donda, S. Uematsu, S. Akira, M. Kopf, B.J. Marsland, without Regulating Effector T Cell Responses 1, *J. Immunol.* 178 (2014) 2182–2191.
- [208] J.W. Huleatt, A.R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E.B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar, T.J. Powell, Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity, *Vaccine.* 25 (2007) 763–775. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.08.013>.
- [209] X.Q. Zhang, C.E. Dahle, G.J. Weiner, A.K. Salem, A comparative study of the antigen-specific immune response induced by co-delivery of CpG ODN and antigen using fusion molecules or biodegradable microparticles, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3283–3292. <https://doi.org/10.1002/jps.20978>.
- [210] B. Berghöfer, T. Frommer, G. Haley, L. Fink, G. Bein, H. Hackstein, TLR7 Ligands Induce Higher IFN- α Production in Females, *J. Immunol.* 177 (2006) 2088–2096. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.4.2088>.
- [211] K.V. Rao, *Antigens, y: Encycl. Life Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000499>.
- [212] T.Q. Nguyen, R. Rollon, Y.K. Choi, Animal models for influenza research: Strengths and weaknesses, *Viruses.* 13 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.3390/v13061011>.
- [213] Y.S. Choi, J.A. Yang, I. Yusuf, R.J. Johnston, J. Greenbaum, B. Peters, S. Crotty, Bcl6 Expressing Follicular Helper CD4 T Cells Are Fate Committed Early and Have the Capacity To Form Memory, *J. Immunol.* 190 (2013) 4014–4026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202963>.
- [214] M. Ding, L. Lu, L.A. Toth, Gene expression in lung and basal forebrain during influenza infection in mice, *Genes. Brain. Behav.* 7 (2008) 173–183. <https://doi.org/10.1111/J.1601-183X.2007.00335.X>.
- [215] A. Pellegrini, N. Guiñazú, M.P. Aoki, I.C. Calero, E.A. Carrera-Silva, N. Girones, M. Fresno, S. Gea, Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain, *Int. Immunol.* 19 (2007) 1395–1402. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXM107>.
- [216] J.W. McBride, R.E. Corstvet, S.D. Gaunt, C. Boudreaux, T. Guedry, D.H. Walker, Kinetics

of Antibody Response to Ehrlichia canis Immunoreactive Proteins, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2516. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2516-2524.2003>.

- [217] D.D. Chaplin, Overview of the immune response, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S345. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.002>.
- [218] G. Leroux-Roels, E. Van Hecke, W. Michielsen, P. Voet, P. Hauser, J. Pêtre, Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines, *Vaccine.* 12 (1994) 812–818. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90290-9](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90290-9).
- [219] V. Rodriguez-Lara, A. Muñoz-Rivera, A. Cambas, V. González, T.I. Fortoul, Sex-based differences in lymphocyte proliferation in the spleen after vanadium inhalation, *J. Immunotoxicol.* 13 (2016) 498–508. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1134731>.
- [220] M.A. De León-Nava, K. Nava, G. Soldevila, L. López-Griego, J.R. Chávez-Ríos, J.A. Vargas-Villavicencio, J. Morales-Montor, Immune sexual dimorphism: Effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 113 (2009) 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.11.003>.
- [221] K.N. Gibson-Corley, P.M. Boggiatto, M.M. Bockenstedt, C.A. Petersen, T.J. Waldschmidt, D.E. Jones, Promotion of a functional B cell germinal center response after leishmania species Co-infection is associated with lesion resolution, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 2009–2017. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2012.01.012>.
- [222] R.L. Ursin, S. Dhakal, H. Liu, S. Jayaraman, H.S. Park, H.R. Powell, M.L. Sherer, K.E. Littlefield, A.L. Fink, Z. Ma, A.L. Mueller, A.P. Chen, K. Seddu, Y.A. Woldetsadik, P.J. Gearhart, H.B. Larman, R.W. Maul, A. Pekosz, S.L. Klein, Greater Breadth of Vaccine-Induced Immunity in Females than Males Is Mediated by Increased Antibody Diversity in Germinal Center B Cells, *MBio.* 13 (2022). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01839-22/ASSET/19CF7DDC-F753-4258-B923-FDB2169531E9/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/MBIO.01839-22-F005.GIF>.
- [223] J.H. Slack, Strain-dependent IgG subclass response patterns., *J. Immunol.* 139 (1987).
- [224] M.I. Vazquez, J. Catalan-Dibene, A. Zlotnik, B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment, *Cytokine.* 74 (2015) 318. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2015.02.007>.
- [225] H. Watanabe, K. Numata, T. Ito, K. Takagi, A. Matsukawa, Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains, *Shock.* 22 (2004) 460–466. <https://doi.org/10.1097/01.SHK.0000142249.08135.E9>.
- [226] A. Blaeser, K. McGlauchlen, L.A. Vogel, Aged B lymphocytes retain their ability to express surface markers but are dysfunctional in their proliferative capability during early activation events, *Immun. Ageing.* 5 (2008). <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-15>.
- [227] C.-A.A. Siegrist, R. Aspinall, B-cell responses to vaccination at the extremes of age, 9 (2009) 185–194. <https://doi.org/10.1038/nri2508>.
- [228] N.H. Son, S. Murray, J. Yanovski, R.J. Hodes, N. Weng, Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age, *J. Immunol.* 165 (2000) 1191–1196. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.165.3.1191>.

- [229] P.J. Linton, L. Haynes, N.R. Klinman, S.L. Swain, Antigen-independent changes in naive CD4 T cells with aging, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 1891–1900. <https://doi.org/10.1084/JEM.184.5.1891>.
- [230] L. Haynes, P.J. Linton, S.M. Eaton, S.L. Tonkonogy, S.L. Swain, Interleukin 2, but Not Other Common γ Chain–Binding Cytokines, Can Reverse the Defect in Generation of Cd4 Effector T Cells from Naive T Cells of Aged Mice, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1013–1024. <https://doi.org/10.1084/JEM.190.7.1013>.
- [231] J.D. Ansell, C.M. McDougall, H.S. Micklem, C.J. Inchley, Age-related changes in cell localization and proliferation in lymph nodes and spleen after antigenic stimulation, *Immunology.* 40 (1980) 687–694. [/pmc/articles/PMC1458099/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1458099/) (приступљено 01. Април 2021.).
- [232] M.A. Moro-García, R. Alonso-Arias, C. López-Larrea, When aging reaches CD4+ T-cells: Phenotypic and functional changes, *Front. Immunol.* 4 (2013) 107. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00107/BIBTEX>.
- [233] R.S. Herati, M.A. Reuter, D. V. Dolfi, K.D. Mansfield, H. Aung, O.Z. Badwan, R.K. Kurupati, S. Kannan, H. Ertl, K.E. Schmader, M.R. Betts, D.H. Canaday, E.J. Wherry, Circulating CXCR5+PD-1+ Response Predicts Influenza Vaccine Antibody Responses in Young Adults but not Elderly Adults, *J. Immunol.* 193 (2014) 3528–3537. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1302503>.
- [234] P.T. Sage, D. Alvarez, J. Godec, U.H. Von Andrian, A.H. Sharpe, Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 5191–5204. <https://doi.org/10.1172/JCI76861>.
- [235] P.T. Sage, L.M. Francisco, C. V. Carman, A.H. Sharpe, The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood, *Nat. Immunol.* 2012 142. 14 (2012) 152–161. <https://doi.org/10.1038/ni.2496>.
- [236] M. Yu, G. Li, W.W. Lee, M. Yuan, D. Cui, C.M. Weyand, J.J. Goronzy, Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E879–E888. https://doi.org/10.1073/PNAS.1109797109/SUPPL_FILE/PNAS.201109797SI.PDF.
- [237] C.M. Weyand, J.J. Goronzy, Aging of the immune system: Mechanisms and therapeutic targets, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 (2016) S422–S428. https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201602-095AW/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF.
- [238] N. Fazilleau, M. Aloulou, Several follicular regulatory T cell subsets with distinct phenotype and function emerge during germinal center reactions, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1792. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01792/BIBTEX>.
- [239] A. Caro-Maldonado, R. Wang, A.G. Nichols, M. Kuraoka, S. Milasta, L.D. Sun, A.L. Gavin, E.D. Abel, G. Kelsoe, D.R. Green, J.C. Rathmell, Metabolic Reprogramming Is Required for Antibody Production That Is Suppressed in Anergic but Exaggerated in Chronically BAFF-Exposed B Cells, *J. Immunol.* 192 (2014) 3626–3636. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1302062>.
- [240] D. Furman, B.P. Hejblum, N. Simon, V. Jojic, C.L. Dekker, R. Thiebaut, R.J. Tibshirani, M.M. Davis, Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111

(2014) 869–874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321060111>.

- [241] K.K. Yam, J. Gupta, E.K. Allen, K.R. Burt, É. Beaulieu, C.P. Mallett, D.S. Burt, B.J. Ward, Comparison of AS03 and Alum on immune responses elicited by A/H3N2 split influenza vaccine in young, mature and aged BALB/c mice, *Vaccine*. 34 (2016) 1444–1451. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2016.02.012>.
- [242] B.J. Rogerson, D.P. Harris, S.L. Swain, D.O. Burgess, Germinal center B cells in Peyer's patches of aged mice exhibit a normal activation phenotype and highly mutated IgM genes, *Mech. Ageing Dev.* 124 (2003) 155–165. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(02\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(02)00115-X).
- [243] S. Khurana, N. Verma, K.R. Talaat, R.A. Karron, H. Golding, Immune response following H1N1pdm09 vaccination: differences in antibody repertoire and avidity in young adults and elderly populations stratified by age and gender, *J. Infect. Dis.* 205 (2012) 610–620. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIR791>.
- [244] S. Natsuume-Sakai, K. Motonishi, M. Takahashi, Quantitation of β 1c/1A Globulin (C3) in Inbred Mice: Variation Dependent upon Strain, Age, Sex and Environment, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 53 (1977) 269–278. <https://doi.org/10.1159/000231762>.
- [245] Z. Y, W. Y, Restoration of Retarded Influenza Virus-specific Immunoglobulin Class Switch in Aged Mice, *J. Clin. Cell. Immunol.* 07 (2016). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000403>.
- [246] D. Frasca, S. Pucci, C. Goso, P. Barattini, S. Barile, C. Pioli, G. Doria, Regulation of cytokine production in aging: use of recombinant cytokines to upregulate mitogen-stimulated spleen cells, *Mech. Ageing Dev.* 93 (1997) 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(96\)01825-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(96)01825-8).
- [247] A. Wagner, E. Garner-Spitzer, J. Jasinska, H. Kollaritsch, K. Stiasny, M. Kundi, U. Wiedermann, Age-related differences in humoral and cellular immune responses after primary immunisation: Indications for stratified vaccination schedules, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28111-8>.
- [248] M. V. Hobbs, W.O. Weigle, D.N. Ernst, Interleukin-10 production by splenic CD4+ cells and cell subsets from young and old mice, *Cell. Immunol.* 154 (1994) 264–272. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1076>.
- [249] G. Del Giudice, B. Weinberger, B. Grubeck-Loebenstein, Vaccines for the Elderly, *Gerontology*. 61 (2015) 203–210. <https://doi.org/10.1159/000366162>.
- [250] S. Sasaki, M. Sullivan, C.F. Narvaez, T.H. Holmes, D. Furman, N.Y. Zheng, M. Nishtala, J. Wrammert, K. Smith, J.A. James, C.L. Dekker, M.M. Davis, P.C. Wilson, H.B. Greenberg, X.S. He, Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3109–3119. <https://doi.org/10.1172/JCI57834>.
- [251] C. Nicoletti, J. Cerny, The repertoire diversity and magnitude of antibody responses to bacterial antigens in aged mice: I. Age-associated changes in antibody responses differ according to the mouse strain, *Cell. Immunol.* 133 (1991) 72–83. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90180-J](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90180-J).
- [252] T.N. Harris, S. Harris, Age-related difference by IgG subclass in the response of mice to allogeneic spleen cells, *Immunology*. 37 (1979) 631–636.

8.BIOGRAFIJA

Raisa Petrović je rođena 09.11.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu, a školske 2006/2007. godine upisala je osnovne akademske studije - studijski profil diplomirani molekularni biolog i fiziolog, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,36 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Školske 2014/2015. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Modul: Imunobiologija. Od februara 2014. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik u Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. U periodu 2013-2019. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena (OI175050, MPNTR RS), oblast Medicina, pod rukovodstvom dr Gordane Leposavić, redovnog profesora na Katedri za patobiologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon toga, u periodu 2020-2021. godine, istraživački rad Raisa Petrović je finansiran na osnovu Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO između Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu Raisa Petrović je kao autor ili koautor objavila 16 radova, i to 11 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), 5 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22). Na skupovima međunarodnog značaja učestvovala je sa 2 saopštenja.

9.IZJAVE

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Раиса Петровић

број индекса МБ3018/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полне разлике у имунском одговору на вакцину против грипа код мишева различитих

сојева и узраста

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Раиса Петровић _____

Број индекса _____ МБ3018/2014 _____

Студијски програм _____ Имунобиологија _____

Наслов рада _____ Полне разлике у имунском одговору на вакцину против грипа код мишева различитих сојева и узраста _____

Ментор _____ др Биљана Буфан _____

Потписани/а _____ Раиса Петровић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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 имунском одговору на вакцину против грипа код мишева различитих сојева и узраста

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.